



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

ESTUDIO DE REACTIVIDAD Y CARACTERIZACIÓN
ELECTROQUÍMICA DE NITROINDAZOLES CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTICHAGÁSICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

PAULINA ALEJANDRA SÁNCHEZ
NÚÑEZ

PATROCINANTE
DIRECTOR DE TESIS

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, CHILE, 2008

A ti, que te has ido dejando tu rastro y amor, a ti que desde lejos aún me das tu cariño
y protección..., a ti papá.

Agradecimientos

Quiero agradecer con todo el cariño del mundo, a mi profesor, director de tesis, amigo y consejero, el Dr. Claudio Olea-Azar. El cual me apoyo académicamente y como amigo durante años, por confiar en mí, escucharme y ayudarme a crecer en lo personal y profesional. Y también agradecer a la Dra. Carolina Jullian por su apoyo, ayuda y simpatía en todo momento y a todo el grupo de trabajo del laboratorio de electroanalítica.

Parte importante de este proceso ha sido mi familia, en especial mis abuelos Rosa y Neno, y a mis hermanos Patty y Daniel, a los cuales les agradezco por creer en mí, tratar de entenderme y apoyarme durante estos años. Aunque nos han tocado tiempos difíciles siempre han estado ahí. Así como también mis tíos y primos y por supuesto agradecer a mis dos ángeles que me han dado fe y tranquilidad cuando lo he necesitado, a mi papá Patricio y a mi tía Mabel.

Agradezco en especial a Roberto quien me ayudó y apoyó en los últimos años de este camino, justo cuando más lo necesité, estuvo ahí para escucharme, enseñarme y darme tranquilidad. Gracias también a su familia por su apoyo.

A mis amigas Cristi y Feña, quienes estuvieron conmigo desde primer año, a mi amigo Fito y a todos los amigos que conocí en este camino. Gracias por hacerme más fácil la estadía en la universidad.

Agradezco también a todos los profesores quienes aportaron a mi educación como químico y a todas las personas que ayudaron a que llegara este día.

Tabla de Contenido

	Página
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi-vii
Resumen	viii
Summary	ix
Introducción	1-7
Hipótesis	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
Materiales y Métodos	9-18
Resultados y discusión	19-34
Conclusión	35
Bibliografía	36-38

Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Parámetros electroquímicos obtenidos para las cuplas de reducción aisladas, a 2000mV/s	24
Tabla 2 Parámetros correspondientes al ajuste lineal del área bajo la curva en relación a la concentración de los compuestos estudiados	27
Tabla 3 Valores de equivalentes Trolox obtenidos, correspondiente a los compuestos derivados de 5NI estudiados.	29
Tabla 4 a) Datos y resultados experimentales de la obtención de las constantes observadas a distintas concentraciones de los distintos compuestos. b) Constantes de segundo orden obtenidas experimentalmente para cada compuesto.	32
Tabla 5 Tabla comparativa; valores de k_2 , equivalentes Trolox y potencial de reducción.	34

Índice de figuras

	Página
Figura 1	Ciclo vital T. Cruzi 2
Figura 2	Estructura de Nifurtimox 4
Figura 3	Estructura de Benznidazol 4
Figura 4	Estructura de moléculas en estudio 11-12
Figura 5	Estructura del ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) 16
Figura 6	a) Voltamograma cíclico del compuesto Va5-5a, b) Voltamograma del compuesto Va5-5b, c) Voltamograma del compuesto Va5-5c, d) Voltamograma del compuesto Va5-8, e) Voltamograma del compuesto Va5-8pre, f) Voltamograma del compuesto Vacl-3, g) Voltamograma del compuesto Va4-27b 19-20
Figura 7	a) Voltamograma del compuesto Va5-5a, con la cupla de reacción electrónica aislada. b) la razón de corrientes vs velocidad de barrido, y c) la variación del potencial vs velocidad de barrido. 21
Figura 8	Tratamiento del compuesto Va5-8 con NaOH, a distintos volúmenes de base y velocidad de barrido 2000 mV/s 23
Figura 9	Mecanismo de reducción 24
Figura 10	a) Curva de decaimiento del compuesto Va5-8pre b) Ajuste lineal entre el área bajo la curva y la concentración 26
Figura 11	a) Curva de decaimiento de Trolox b) Ajuste lineal entre el área bajo la curva y la concentración de Trolox 28

Figura 12	Gráfico absorbancia versus tiempo, de distintas alícuotas del compuesto Va5-8	30
Figura 13	Gráfico constantes k observada versus la concentración de compuesto Va5-8	31

Resumen

Estudio de reactividad y caracterización electroquímica de nitroindazoles con potencial actividad antichagásica.

Este estudio fue desarrollado para investigar los mecanismos de reducción y reactividad de compuestos derivados de 5-nitroindazol, los cuales podrían tener actividad antitripanocida a través de un análisis de capacidad antioxidante por medio de la técnica de fluorescencia ORAC-FL y un estudio cinético UV-Vis, además de un estudio electroquímico. La formación del anión radical nitro fue estudiada por medio de voltametría cíclica, a través del cual se propuso un mecanismo de reducción común para todos los compuestos en estudio; una reducción monoelectrónica, seguido de una reacción ácido base y finalmente una segunda reducción monoelectrónica. Este mecanismo es debido a que estos compuestos poseen un hidrógeno lábil en sus estructuras. Para determinar la reactividad del hidrógeno lábil presente, se realizó un estudio de la capacidad antioxidante, a través del estudio ORAC-FL el cual determinó que el hidrogeno lábil presente en las estructuras de los compuestos estudiados es donado al radical libre AAPH en razón 1:1, por lo tanto se comprueba la labilidad de este hidrógeno. Por otra parte, se realizó el estudio de reactividad a través de la determinación de las constantes cinéticas de reacción por medio de la espectroscopia UV-Vis. En este estudio se pudo ver que la reacción de donación del hidrogeno lábil de los compuestos estudiados al radical DPPH es lenta, ya que se mostraron valores bajos de constantes de velocidad.

Summary

Reactivity study and electrochemical behaviour of potential antitrypanosoma cruzi activity nitroindazole

This study was undertaken to investigate the reduction mechanism and the reactivity of nitroindazole derivatives, which have antitrypanosida activity through a free radical-scavenging analysis by ORAC-FL assay and an UV-Vis kinetic study, moreover an electrochemical study. The nitro radical's species formation was studied by cyclic voltametric, through which a common reduction mechanism was proposed; a monoelectronic reduction, followed by an acid-base equilibrium and finally a second monoelectronic reduction. The mechanism by which these compounds possess labile hydrogen in its structures. The antioxidant capacity of these compounds was determined by the oxygen radical absorbing capacity assay using fluorescein (ORAC-FL), it showed that the labile proton present in these structures is given to the free radical AAPH in a 1:1 ratio therefore it is found the lability of this hydrogen. On the other hand, the reactivity of the nitroindazole derivatives was studied through a kinetic study, by this assay were obtained the rate constants of the reduction reaction of DPPH radical for the antioxidant, it was obtained under pseudo-first-order conditions, to which is studied by UV-Vis. The experimental results showed that the labile donation reaction of the hydrogen of the compounds studied the DPPH radical are slow, as it showed low rate constants.

Introducción

Enfermedad de Chagas

Las tripanosomiasis son producidas por flagelados del género *Trypanosoma*. La forma más conocida es la de tripomastigote circulante en la sangre. Los cuales en la mayoría de los casos se transmiten principalmente mediante la participación de un vector biológico. La patología de mayor importancia en Chile y producida por tripanosomas es la enfermedad de chagas. La tripanosomiasis americana o enfermedad de chagas, es producida por *Trypanosoma cruzi*, enfermedad crónica que afecta principalmente a las personas desde el norte de México hasta la rivera norte del Lago Rapel.¹

En la zona norte de nuestro país, esta patología es de carácter endémico, y constituye en la actualidad, uno de los problemas de salud pública importante que aún no tienen solución. Según datos de la organización mundial de la salud cerca de 24 millones de personas están infectadas o son portadoras del *T. Cruzi*.²

El vector biológico del *T. cruzi*, *triatoma infestans*, vulgarmente conocido como “Vinchuca”, ingiere sangre infectada con el protozoo, el cual en el intestino del vector se transforma en un epimastigote que se reproduce en gran número. Este sigue hasta el intestino del huésped hasta transformarse en tripomastigotes los que salen del huésped a través de sus fecas. Al momento de picar a sus huéspedes, la vinchuca defeca introduciendo los tripomastigotes en el tejido donde se transforman en amastigotes, donde se multiplican para luego

volver a la forma de tripomastigotes y entrar a la circulación (Fig 1). Por medio de la circulación sanguínea estas estructuras se distribuyen en el organismo.¹

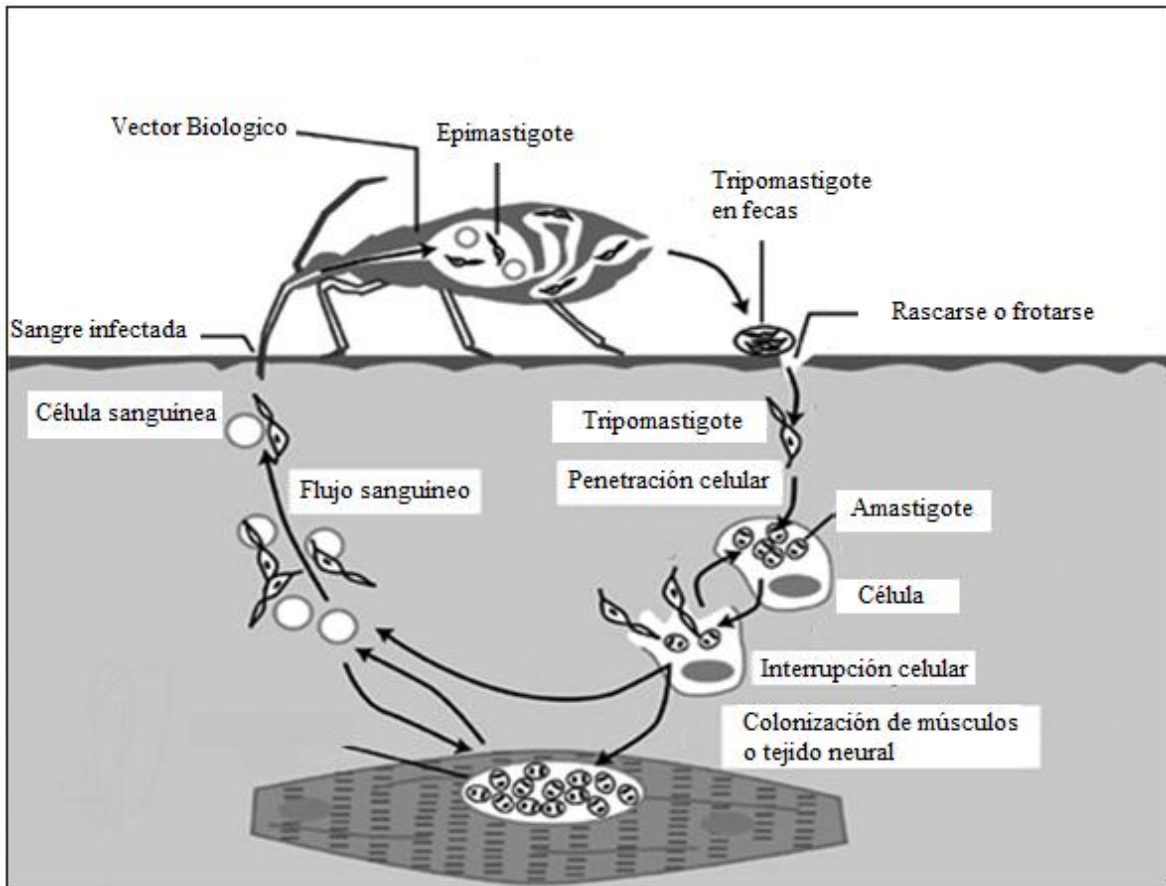


Figura 1: Ciclo vital T. Cruzi

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad de chagas y de los numerosos ensayos realizados por diferentes investigadores, no se ha obtenido hasta ahora un medicamento absolutamente satisfactorio para la cura de esta enfermedad, especialmente en su fase crónica. Cuando el *T. Cruzi* se encuentra en la sangre en la fase tripomastigote, es posible de tratar en las personas, generalmente se usa Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bnz),³ los

cuales son nitrocompuestos heterocíclicos que muestran efectos similares en la etapa aguda de la enfermedad, estos actúan a través de una bio-reducción del grupo nitro, mientras que los amastigotes no son afectados por ningún fármaco conocido.

En estudios de Gillette y col. (1981)⁴ se comprobó que los fármacos utilizados para combatir estos parásitos basan su acción en un ciclo redox monoelectrónico el cual genera especies oxigenadas activas que originan estrés oxidativo. Estas especies oxigenadas reactivas alteran la estructura y función de macromoléculas, tales como proteínas o lípidos, conduciendo a necrosis celular y carcinogénesis. Los mecanismos de defensa contra los radicales libres son variados. Los tripanosomátidos, a diferencia de los mamíferos, son deficientes en mecanismos defensivos contra radicales libres. Estos parásitos no presentan actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa dependientes de selenio, muestran muy baja actividad de superóxido dismutasa, y no se ha informado acerca de la presencia en sus células de antioxidantes naturales como α -tocoferol, β -caroteno o ácido ascórbico Morello (1988)⁵. Por consiguiente, son mucho más susceptibles que las células de los mamíferos a estrés oxidativo. Este se presenta como el mecanismo para explicar las complejas reacciones que producen lipoperoxidación por consiguiente un daño biológico. Los mamíferos presentan una mayor variedad de mecanismos de defensa en los cuales intervienen muchos compuestos bioquímicos y enzimas entre las cuales se destacan: α -tocoferol, ácido ascórbico, GR, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Estudios de Docampo y Morello^{6,7,8} demostraron que el Nifurtimox Fig. 2, presenta actividad antiparasitaria a través de la formación del correspondiente radical nitro el cual, consecutivamente produce especies reactivas de oxígeno que matan al parásito. La presencia del radical de este nitrocompuesto fue detectada a través de la espectroscopía de resonancia de espín electrónica (REE), en un medio que contenía nifurtimox en presencia de *T.cruzi* homogeneizado y NADP-H. En medio aeróbico el radical nitro produjo varias especies tóxicas tales como O_2^- y H_2O_2 .

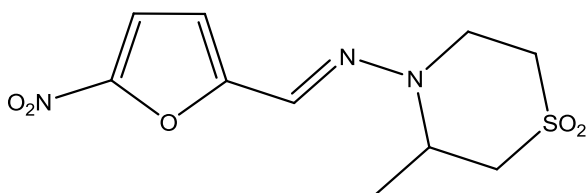


Figura 2: Nifurtimox

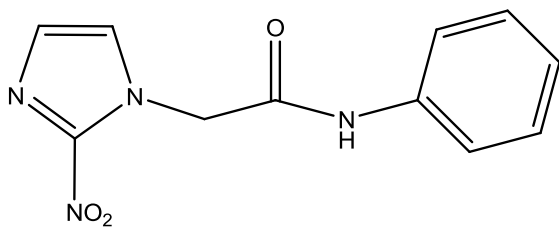


Figura 3: Benznidazol

En los mencionados estudios se demostró que el Benznidazol (derivado de nitroimidazol) Fig. 3, en presencia de *T. Cruzi* y NADPH también presenta una señal débil en el espectro de REE, correspondiente al nitro-anión radical. Bajo estas condiciones, este nitrocompuesto no estimuló la generación de O_2^- o H_2O_2 . El Benznidazol, inhibe el crecimiento de *T. Cruzi* a concentraciones que no estimulan la generación de derivados oxigenados tóxicos, lo cual indicaría

que el efecto antiparasitario de este fármaco no depende de los radicales oxigenados como en el caso de Nifurtimox. Se postula, que Benznidazol reducido se enlaza covalentemente a la enzima provocando así los efectos tóxicos. Sin embargo, a pesar de que estos compuestos son los únicos medicamentos indicados para esta parasitosis, su eficiencia está limitada a la fase aguda de la enfermedad, y son probablemente inútiles en la fase crónica y producen efectos tóxicos graves en un elevado porcentaje de los pacientes tratados.

Nitrocompuestos

Los nitrocompuestos han sido previamente estudiados como agentes antiparasitarios, antibactericida y anticancerígenos, los cuales basan su acción en la generación del anión radical nitro.^{3,9,13,15}

Uno de estos compuestos es el Megazol [1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol)-5-nitroimidazol] el cual es un derivado de 5-nitroimidazol con actividad antibactericida y antiparasitaria, el cual genera especies de oxígeno reactivas (ROS). Sin embargo se ha comprobado que este compuesto produce mutagénesis del ADN, por lo cual no es utilizado como antitripanocida. Por esto se ha buscado desarrollar nuevos agentes antiparasitarios utilizando derivados de 5-nitroimidazol (Megazol), 2-nitroimidazol (Benznidazol) y nitrofuranos (Nifurtimox); los cuales muestran distintos mecanismos de acción, ya sea como inhibidores enzimáticos como por stress oxidativo.²⁴

Por otra parte también se han estudiado nuevas drogas como las Nitrofurazonas como quimioterapia en la enfermedad de chagas.²⁵

A pesar de la toxicidad de los nitrocompuestos aromáticos, estos son generalmente potentes agentes contra el *T. Cruzi* y sus modificaciones moleculares han sido importantes blancos de estudio.

Familia de 5-nitroindazol

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de indazoles han sido ampliamente estudiadas y correlacionadas con sus propiedades farmacológicas. Estas familias tienen propiedades antiinflamatorias, actividad agonista y antagonista de receptores de serotoninas, actividad anticancerígena y actividad antiparasitaria entre otras.⁹

Como se dijo anteriormente, las diversas familias de nitrocompuestos ha sido extensamente estudiada por ser efectivos antiprotozoario, no obstante el estudio de nitroindazoles como potenciales antiprotozoario no ha sido muy explorado.

Olea-Azar y col. 2005¹⁴ caracterizaron electroquímicamente algunos derivados de 5-nitroindazoles (5-NI) usando Voltametría cíclica y ESR (Resonancia de Espín Electrónico) y propusieron que los mecanismos de reducción para este tipo de compuestos depende de la presencia de hidrógenos lábiles en la estructura de la molécula. Observaron procesos de auto protonación, los cuales implicarían una protonación del grupo nitro. Además los 5-NI se estudiaron frente a glutatión (antioxidante natural), indicando que el anión radical nitro ($R-NO_2^{\cdot-}$) obtenido electroquímicamente es inmediatamente re-oxidado a la especie neutra por la acción del glutatión. Mediante la técnica de ESR se

confirmó la presencia de un intermediario paramagnético estable producto de la reducción electroquímica del grupo nitro.

Arán y col. (2005)¹⁵ realizaron un estudio con respecto a las propiedades tricomonocida, antichagásica y antineoplásica de una serie de 5-nitroindazoles análogos a los 5-nitroazoles tales como Metronidazol, Tinidazole o Nifutimox que son efectivos agentes antiprotozo. Mediante estudios QSAR se observó una importante relación entre los datos biológicos de actividad in vitro, usando *Trypanosoma Cruzi* (agente etiológico del mal del Chagas), expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito, y las propiedades lipofílicas de los 5-nitroindazoles estudiados. Algunos de estos compuestos mostraron interesantes propiedades como tripanosomicidas, indicando que este podría ser un punto de partida en el estudio de este tipo de nitroheterociclos, con algunas modificaciones químicas que mejoren su actividad como agentes antichagásicos

En esta tesis se estudiará una familia nueva de Nitroindazoles con potencial actividad antichagásica, a través de estudios electroquímicos, espectroscópicos y medición de reactividad.

Hipótesis

Se espera que un fármaco ideal tripanomicida, se podría obtener en base a un mecanismo de acción que involucre la generación de radicales libres, los cuales producirían el daño vía estrés oxidativo. Las familias estudiadas en esta tesis tendrían el grupo generador de radicales libres y un sistema aromático que estabiliza el nitro anión radical y que proporciona una lipofilia adecuada para su posible acción.

Objetivo general

Evaluar la capacidad generadora de radicales libres de siete derivados de 5-nitroindazol (Fig. 4) y su correspondiente mecanismo de reducción y determinar la capacidad antioxidante y reactividad de estos compuestos.

Objetivos Específicos

- Determinación del comportamiento electroquímico de los derivados de 5-nitroindazol (Fig. 4), utilizando la técnica de voltametría cíclica con electrodo gota colgante de mercurio.
- Determinación de las constantes de velocidad de los compuestos antirradicales estudiados, por medio de ensayos UV-Vis.
- Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos por medio de estudios de fluorescencia por el método ORAC-FL.

Materiales y Métodos

REACTIVOS

Los compuestos en estudio fueron sintetizados por Vicente Arán, perteneciente al Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), España.

Los reactivos *2,2'-azobis(2-metilpropilamida)di-hidroclorido* (AAPH), *2,2-difenil-1-picryl-hidrazyl* (DPPH), *Fluoresceina sal sódica* (FL) y *Acido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico* (Trolox) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. *Perclorato de tetrabutilamonio* (PTBA) fue adquirido a fluka y los solventes utilizados *dimetilsulfoxido* (DMSO) y *1-butanol* fueron adquiridos a Merck.

EQUIPOS

Voltametría Cíclica

Para las mediciones electroquímicas se empleó un equipo Metrohm 693 VA provisto de un convertor 694 VA Stand, un procesador 693 VA Processor y una celda de tres electrodos. Utilizando DMSO como solvente aprótico, bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Como electrolito soporte se utilizó PTBA, de concentración 0.1M. Se dispuso un electrodo de gota colgante de mercurio como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de calomelano saturado como electrodo de referencia.

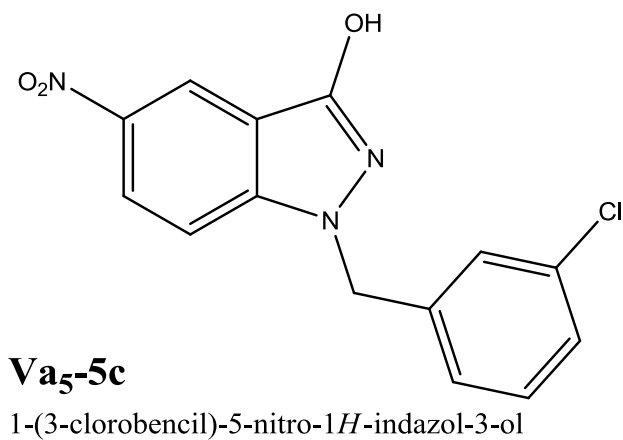
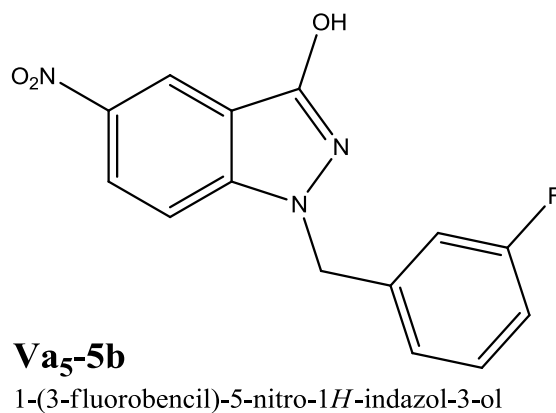
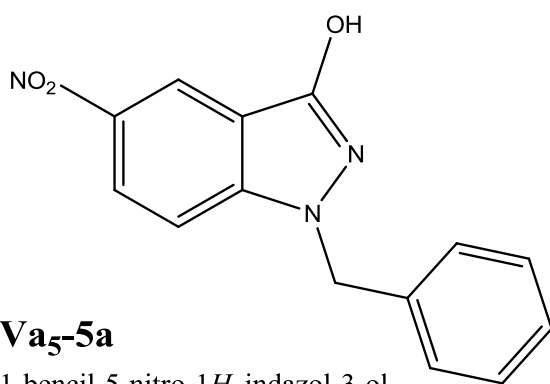
Espectroscopia de absorción molecular (UV-VIS)

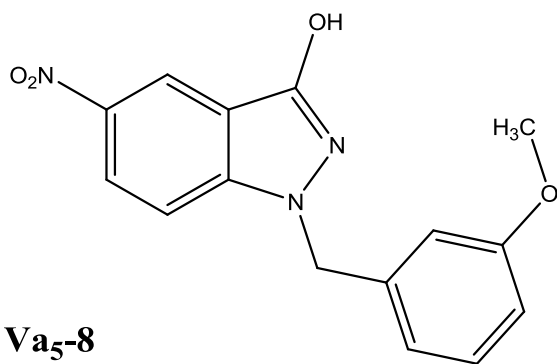
Para registrar los espectros de UV-Vis para la obtención de las constantes de velocidad se utilizó un equipo Espectrómetro 6405UV/Vis Spectrometer JENWAY, provisto del software Dataway versión 1.1, usando celdas de cuarzo de 1 cm a una longitud de onda de 517 nm y 25°C. Se utilizó como solvente 1-butanol, el cual también es el blanco cinético. Para medir la capacidad antioxidante, se evaluó el consumo del radical DPPH en concentración final en la celda de 51.0 µM.

ORAC-FL

Para las mediciones de capacidad antioxidante a través del método ORAC-FL se utilizó un equipo Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader con una lámpara halógena de tungsteno y filtros para interferencias para longitudes de onda específicas junto con un detector PMT. Provisto del programa Gen5™ Data Analysis Software para el tratamiento de datos y una celda Nunc 96 flat bottom generic.

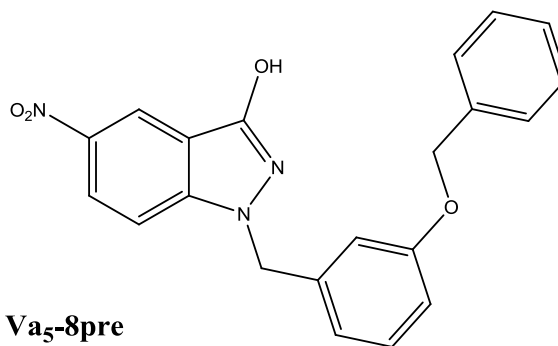
Moléculas en estudio





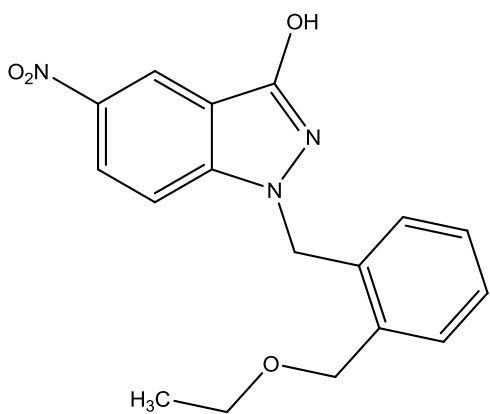
Va₅₋₈

1-(3-metoxibencil)-5-nitro-1*H*-indazol-3-ol



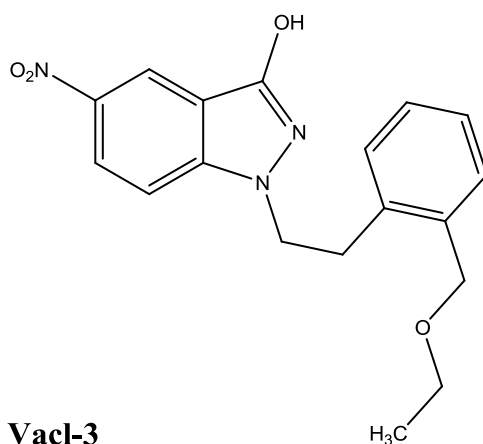
Va_{5-8pre}

1-(3-(benciloxi)benzyl)-5-nitro-1*H*-indazol-3-ol



Va_{4-27b}

1-(2-(etoximetil)bencil)-5-nitro-1*H*-indazol-3-ol



Vacl-3

1-(2-(etoximetil)fenetil)-5-nitro-1*H*-indazol-3-ol

Figura 4: Estructuras de las moléculas estudiadas

METODOLOGIA

Voltametría cíclica²³

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica de microelectrólisis, de tipo transitorio, utilizada para la información mecanística sobre las reacciones químicas asociadas a procesos de transferencia electrónica. Esta consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección hasta alcanzar un potencial fijado, potencial de switching, para luego realizar el barrido en dirección opuesta. Un potenciostato mide la corriente resultante en función del potencial aplicado, registrándose la curva I-E, que son comúnmente denominadas voltamogramas. El potencial aplicado en el electrodo de trabajo se mide respecto a un electrodo de referencia. Los parámetros característicos de un voltamograma cíclico son el potencial de pico catódico E_{pc} , el potencial de pico anódico E_{pa} , la corriente de pico catódica I_{pc} y la corriente de pico anódica I_{pa} .

Un proceso de transferencia electrónica reversible, se caracteriza porque el valor de la intensidad de pico anódica es igual al catódico ($I_{pa}=I_{pc}$) y por la obtención de los valores de E_{pc} y E_{pa} constantes en todo el rango de velocidades de barrido de potencial. En este caso el potencial de reducción normal es la semisuma de E_{pc} y E_{pa} . Al obtener una onda totalmente reversible indica que no hay reacciones asociadas, por lo tanto, se genera un radical estable.

Esta técnica es útil, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo y representa una herramienta en el estudio de mecanismos electroquímicos. Diferencia si la

reacción de transferencia de electrones es reversible o irreversible mediante criterios de diagnósticos.

En la realización de los estudios electroquímicos, se utilizó para la obtención de los voltamogramas de los compuestos estudiados, soluciones de concentración 1mM en solvente DMSO. Se realizaron barridos de potencial entre 0 y -2000 mV a distintas velocidades de barridos, entre 100 mV/s y 2000 mV/s.

Ensayo ORAC-FL

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) fluoresceína es un método muy utilizado para la estimación de la capacidad antioxidante de compuestos puros o de mezclas complejas. ORAC-FL fue determinado como describe Dávalos y col.¹⁸ con algunas modificaciones. La reacción fue llevada a cabo en una solución de buffer sodio fosfato 75mM (pH 7.4) y etanol (70:30), y la mezcla final fue de 200 μ L. FL (150 μ L; concentración final 52 nM) y los compuestos derivados de 5NI (25 μ L) fueron dispuestos en el microplato. La mezcla fue preincubada por 15 minutos a 40°C, después se adicionó rápidamente la solución de AAPH (25 μ L; concentración final 375 μ M) usando una pipeta multicanal. La fluorescencia fue registrada cada 1 min por 40 min. El microplato es automáticamente agitado antes de la lectura. En cada ensayo, fueron utilizados como blanco una solución con FL y AAPH sin antioxidante. Además de cinco soluciones de calibración usando Trolox como antioxidante. Todas las mediciones fueron hechas en triplicado. Para evitar el efecto de la

temperatura, solo las 60 cubetas interiores fueron utilizadas, mientras las exteriores fueron llenados con 200 μL de agua destilada. Los resultados fueron expresados como fluorescencia relativa con respecto a la lectura inicial. El área bajo la curva de decaimiento de fluoresceína (ABC) fue calculada según la ecuación

$$ABC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde f_0 es la fluorescencia inicial leída al tiempo cero y f_i es la fluorescencia leída al tiempo i . El ABC correspondiente a una muestra fue calculada restando el ABC correspondiente al blanco. Para todas las muestras fue calculada una regresión lineal entre el ABC y la concentración de la muestra.

Los valores de ORAC-FL fueron expresados en Equivalentes Trolox, para lo cual se realizó un ensayo ORAC al compuesto Trolox (Fig 5) a distintas concentraciones (entre 1.0-5.0 μM) siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Para poder comparar la capacidad antioxidante de cada compuesto con la capacidad antioxidante de Trolox, se procedió de la siguiente manera:

$$n^\circ \text{ equivalentes} = \frac{ABC_{XH} - ABC_0}{ABC_{Trolox} - ABC_0} \cdot \frac{[trolox]}{[XH]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde ABC_{XH} es el área bajo la curva del antioxidante, ABC_{Trolox} es el área bajo la curva de Trolox y ABC_0 es el área bajo la curva del blanco.

$$\frac{ABC_{XH} - ABC_0}{ABC_{Trolox} - ABC_0} = \frac{Pendiente_{XH}}{Pendiente_{Trolox}} \quad \text{Ecuación 3}$$

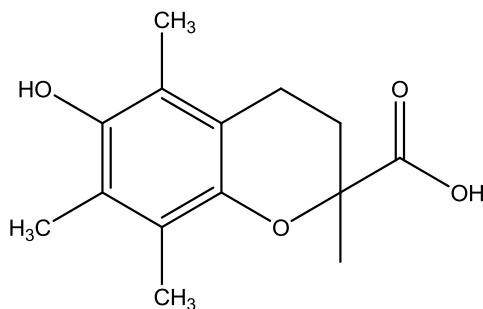


Figura 5: ácido-6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)

Espectroscopía de absorción molecular (UV-Vis)

Las medidas de cinética antiradical de segundo orden se realizaron evaluando el consumo del radical DPPH, mediante ensayos espectrofotométricos.^{19,20}

$$\frac{-d[DPPH]}{dt} = k_2[DPPH][5NI] \quad \text{Ecuación 4}$$

Las constantes de segundo orden (k_2) se obtuvieron teniendo la concentración del compuesto antiradicalario [5NI] en exceso comparada con el compuesto radical [DPPH], forzando a que la reacción se comporte como primer orden

$$\frac{-d[DPPH]}{dt} = k_1[DPPH] \quad \text{Ecuación 5}$$

donde

$$k_1 = k_2[5NI] \quad \text{Ecuación 6}$$

[5NI] es constante durante la reacción, mientras el DPPH es agotado del medio bajo condiciones de pseudo-primer orden siguiendo la ecuación

$$[DPPH] = [DPPH]_0 e^{-k_1 t} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde [DPPH] es la concentración de radical a un tiempo cualquiera (t), [DPPH]₀ es la concentración de radical al tiempo cero, y k_1 es la constante de pseudo primer orden (o constante observada), la cual es linealmente dependiente de la concentración de antioxidante.

Para la obtención experimental de k_2 se agregaron distintas alícuotas de antioxidante a una solución de radical, las soluciones de los compuestos fueron realizadas alrededor de 4 o 5 veces más concentradas que la de DPPH, y obteniendo a través de esta la constante de velocidad de segundo orden para cada compuesto. La concentración final de DPPH en la celda fue de 51.0 μM . Los ensayos cinéticos se realizaron durante cinco minutos para todas las alícuotas, de estas mediciones se obtuvieron los datos de absorbancia en el tiempo. Con los datos de absorbancia obtenidos se calculó el logaritmo natural

de la absorbancia inicial de DPPH dividido por las medidas de absorbancia en el tiempo, mediante la ecuación 5.

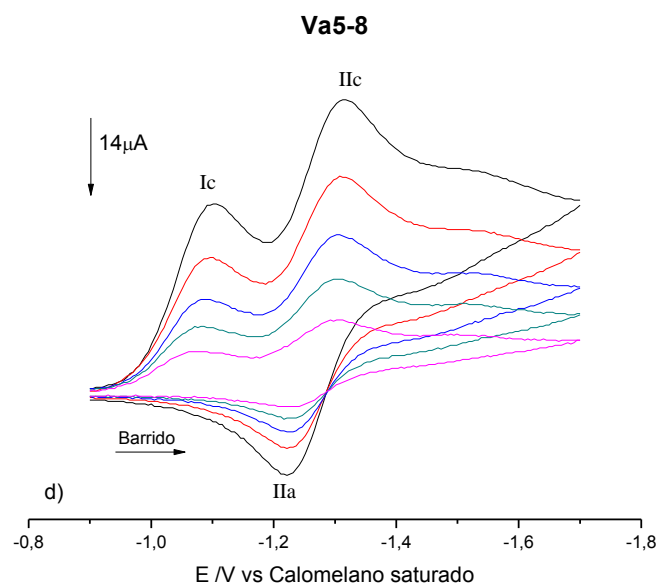
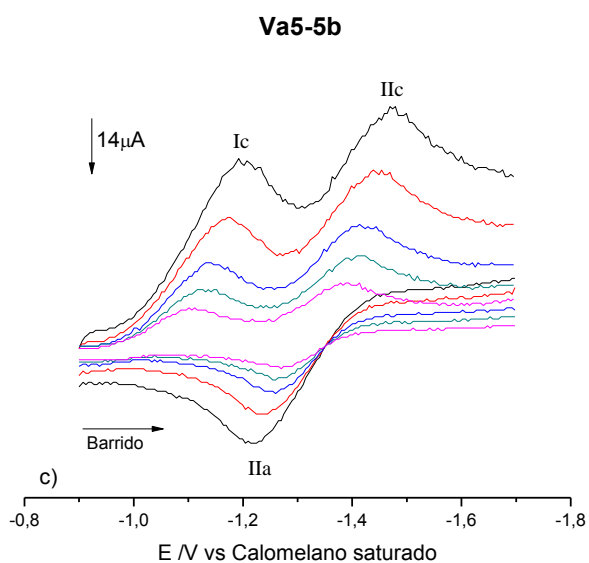
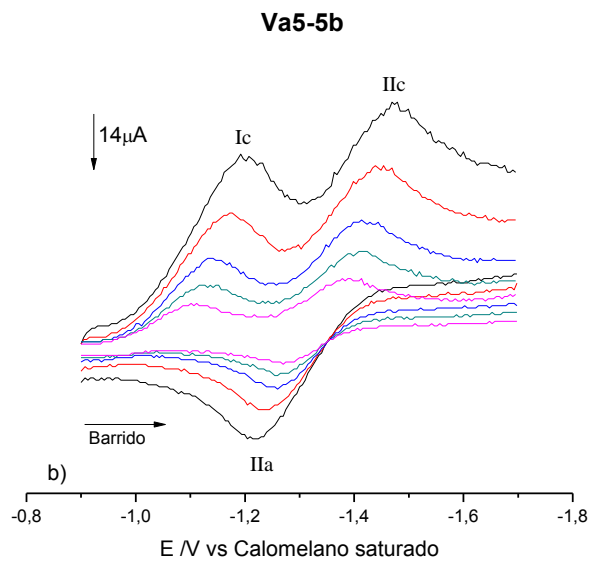
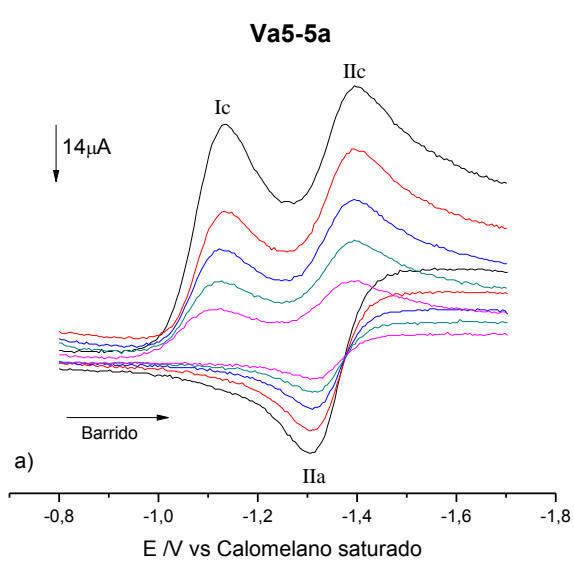
$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_t} = k_{obs} * t \quad \text{Ecuación 8}$$

Luego al obtener las pendientes de cada una de las rectas, se graficó la constante observada versus las concentraciones de compuesto agregadas en cada ensayo a través de la ecuación 6.

Resultados y Discusión

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO

Para determinar el comportamiento electroquímico de los compuestos en estudio, mediante voltametría cíclica, se realizaron barridos de potencial a distintas velocidades de barrido y se obtuvieron los siguientes resultados:



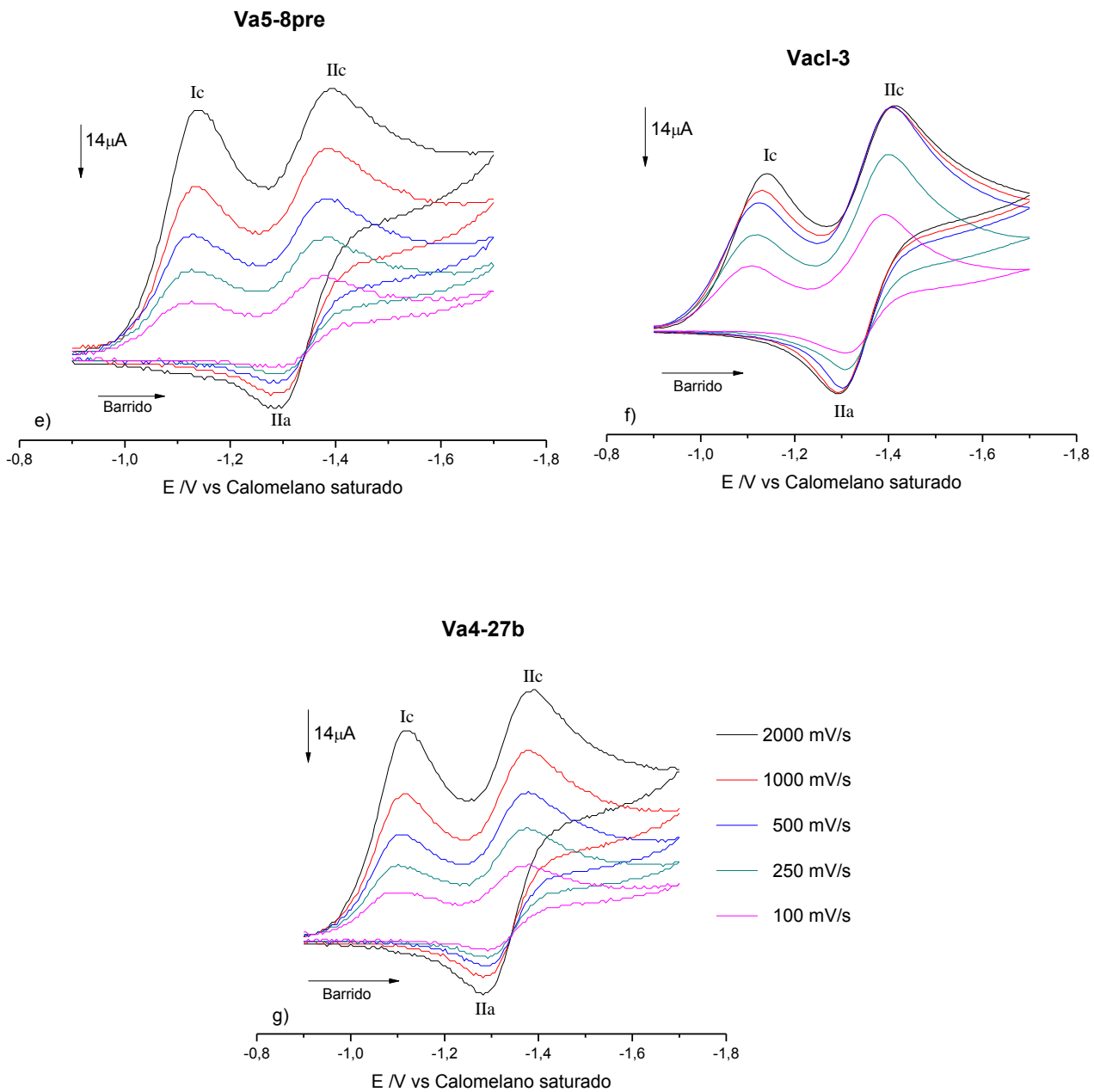


Figura 6: a) Voltamograma cíclico del compuesto Va5-5a, b) Voltamograma del compuesto Va5-5b, c) Voltamograma del compuesto Va5-5c, d) Voltamograma del compuesto Va5-8, e) Voltamograma del compuesto Va5-8pre, f) Voltamograma del compuesto Vacl-3, g) Voltamograma del compuesto Va4-27b

Todos los compuestos estudiados mostraron un voltamograma similar, como se puede ver en la figura 6, donde se presentan dos picos de reducción, uno de ellos de características irreversibles y el segundo pico presenta características cuasireversibles de acuerdo a los criterios de Nicholson and Shain.¹⁷

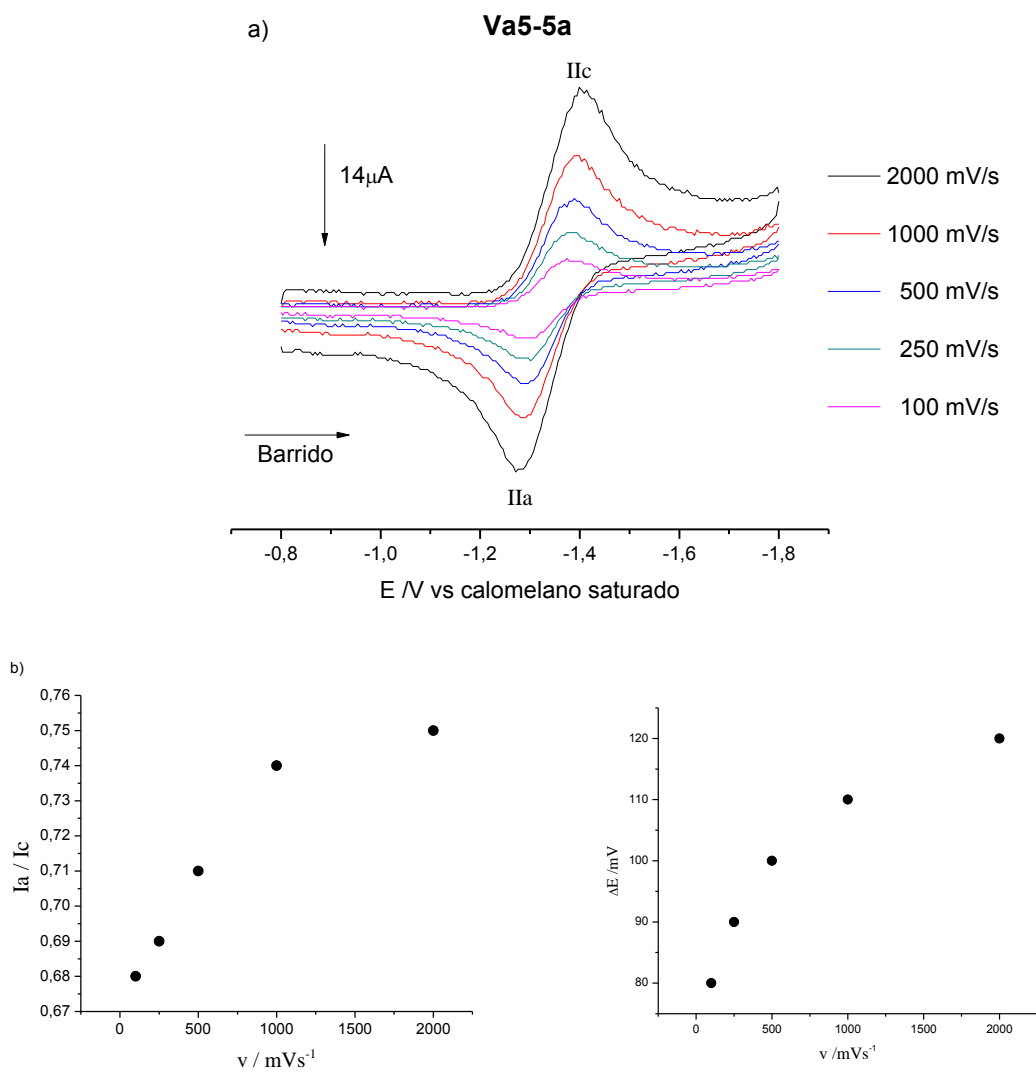


Figura 7: a) Voltamograma del compuesto Va5-5a, con la cupla electrónica de formación del anión radical nitro aislada. b) la razón de corrientes vs velocidad de barrido c) la variación del potencial vs velocidad de barrido.

En la figura 7, se puede ver la culpa electrónica aislada (al adicionar una base a la reacción) correspondiente a la formación del anión radical nitro, además se puede apreciar en las figuras 7.b y 7.c que, a medida que aumenta la velocidad de barrido, la razón de corrientes aumenta asintóticamente a 1.0, además se observa que ΔE es mayor que 57 mV y que tiende a este valor a bajas velocidades. Además se ve en la figura 7.a, que el potencial se desplaza al variar la velocidad y la razón entre la corriente y la raíz de la velocidad es independiente de la velocidad.

Los voltamogramas (fig. 6) muestran una cupla con potencial $E_{1/2}$ alrededor de -1.30 V, correspondiente a la generación del anión radical nitro de la forma $R - NO_2^-$ y un pico de reducción irreversible con un pico catódico cercano a -1.1V (I_{PC}). Este pico I_{PC} corresponde a la reducción de una especie ácida en medio aprótico en presencia de un protón donador en la estructura, generando un radical protonado de la forma $RNO_2^{\cdot}H$.

Para demostrar la presencia de un hidrógeno lábil en las estructuras, se adicionó una base fuerte (NaOH 0.1M) para eliminar la señal correspondiente a la reacción de reducción de la especie ácida. En la figura 8, se puede notar que al aumentar la concentración de base agregada, hay una disminución del pico I_{PC} , hasta lograr una desaparición total de este. En todas las estructuras se vio el mismo comportamiento, lo que demostró que el mecanismo reductivo del primer pico I_{PC} implicaría una reducción de una especie ácida.

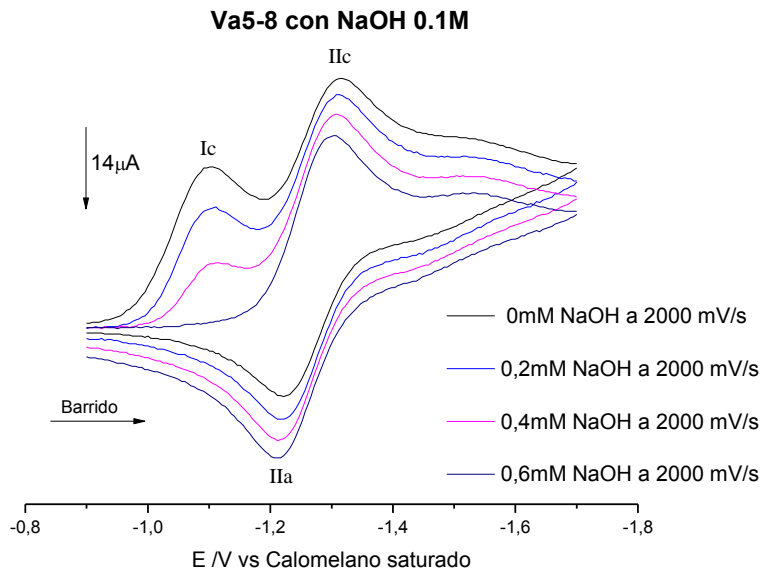


Figura 8: Tratamiento del compuesto Va5-8 con NaOH, a distintos volúmenes de base y velocidad de barrido 2000 mV/s

En base a este estudio, se propuso el siguiente mecanismo de reducción (figura 9) para las moléculas estudiadas, al poseer todas estas, en su estructura un hidroxilo, el cual aporta con un hidrógeno lábil (figura 4).

En una primera etapa electrónica (E1), correspondiente al pico de reducción I_{PC} , se produce la generación anión radical nitro respectivo ($HORNO_2^-$), luego en una siguiente etapa, se produce una reacción química (C1) de autoprotonación, correspondiente a la reducción de la especie anionica $-ORNO_2$, el cual es un comportamiento típico de autoprotonación de compuestos que tienen grupos funcionales ácidos en sus estructuras. El anión radical nitro generado ($HORNO_2^-$), capta un protón lábil formando dos especies, un radical protonado y la molécula inicial no reducida, sin hidrógeno lábil en su estructura; luego la molécula neutra ($-ORNO_2$) es reducida

directamente formando un anión radical en una etapa electrónica (E2). Además se puede ver, que a medida que disminuye el pico de reducción I_{PC} , aumenta la razón de corrientes I_{pa}/I_{pc} hacia 1.0, lo cual estaría de acuerdo con el mecanismo ECE propuesto.

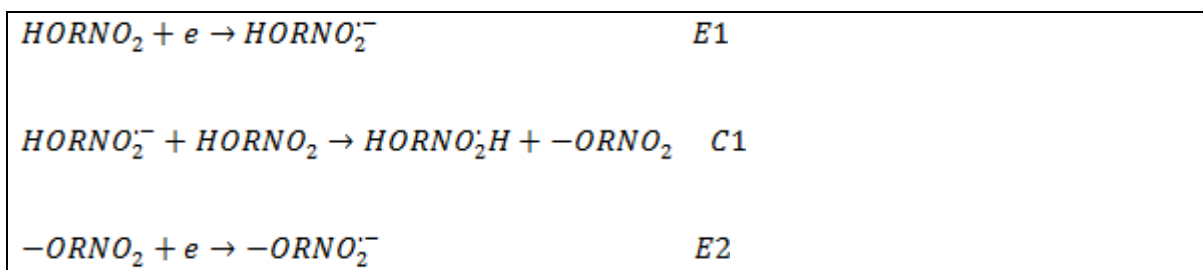


Figura 9: Mecanismo de reducción.

Los estudios electroquímicos permiten obtener los parámetros E_{pa} II y E_{pc} II, $E_{1/2}$ y ΔE_p . Estos fueron obtenidos al aislar la cupla de reducción, luego de la eliminación del pico correspondiente a la reducción de la especie ácida. Como se ve en la figura 7.

5NI	E_{pc} /V	E_{pa} /V	ΔE_p /V	$E_{1/2}$ /V
<i>Va5-5a</i>	-1,38	-1,28	0,10	1,33
<i>Va5-5b</i>	-1,46	-1,18	0,28	1,32
<i>Va5-5c</i>	-1,32	-1,17	0,14	1,25
<i>Va5-8</i>	-1,30	-1,21	0,09	1,26
<i>Va5-8pre</i>	-1,36	-1,28	0,08	1,32
<i>Vacl-3</i>	-1,39	-1,28	0,11	1,34
<i>Va4-27b</i>	-1,36	-1,27	0,09	1,32

Tabla 1: Parámetros electroquímicos obtenidos para las cuplas de reducción aisladas, a 2000mV/s

En la tabla 1, se puede ver que los potenciales anódicos y catódicos correspondientes a la reacción de transferencia electrónica (E), E_{pa} II y E_{pc} II son más negativos que Nifurtimox, el cual se reduce a $-0.91V^{15}$, lo que indica que los compuestos estudiados tienen menor capacidad para ser reducidos.

Ensayo ORAC-FL

Dado que estos compuestos podrían tener una acción biológica vía generación de radicales libres, resulta interesante observar que en la estructura de los nitroindazoles existe un grupo funcional que posee un hidrógeno lábil. Estos grupos podrían apagar los radicales libres, y así disminuir su potencial actividad antiparasitaria.

Para esto, se estudió la capacidad antioxidante de los diferentes compuestos derivados de 5-nitroindazol el cual fue determinado con el método ORAC-FL. En la figura 10, se pueden ver las curvas de decaimiento, que corresponden al tiempo de reacción de FL con AAPH en presencia del compuesto Va5-8pre a distintas concentraciones finales de este (1.0 – 5.0 μM).

El comportamiento que se ve en la figura 10a, resultó ser similar para todos los compuestos, ya que se muestra un tiempo de inducción característico de ORAC-FL. Se observó un aumento en el tiempo de reacción al aumentar la cantidad de antioxidante, traduciéndose esto, en el aumento en el área bajo la curva de cada alícuota. En la figura 10.b, se puede ver que existe una buena correlación lineal entre el área bajo la curva y las concentraciones de antioxidantes utilizadas, además de notar una mínima desviación estándar, lo que nos muestra la precisión de las mediciones (realizadas en triplicado). El ajuste lineal entre el área bajo la curva y la concentración, fue realizado para cada compuesto utilizando concentraciones finales de antioxidante en la celda entre 1.0 y 5.0 μM (tabla 2).

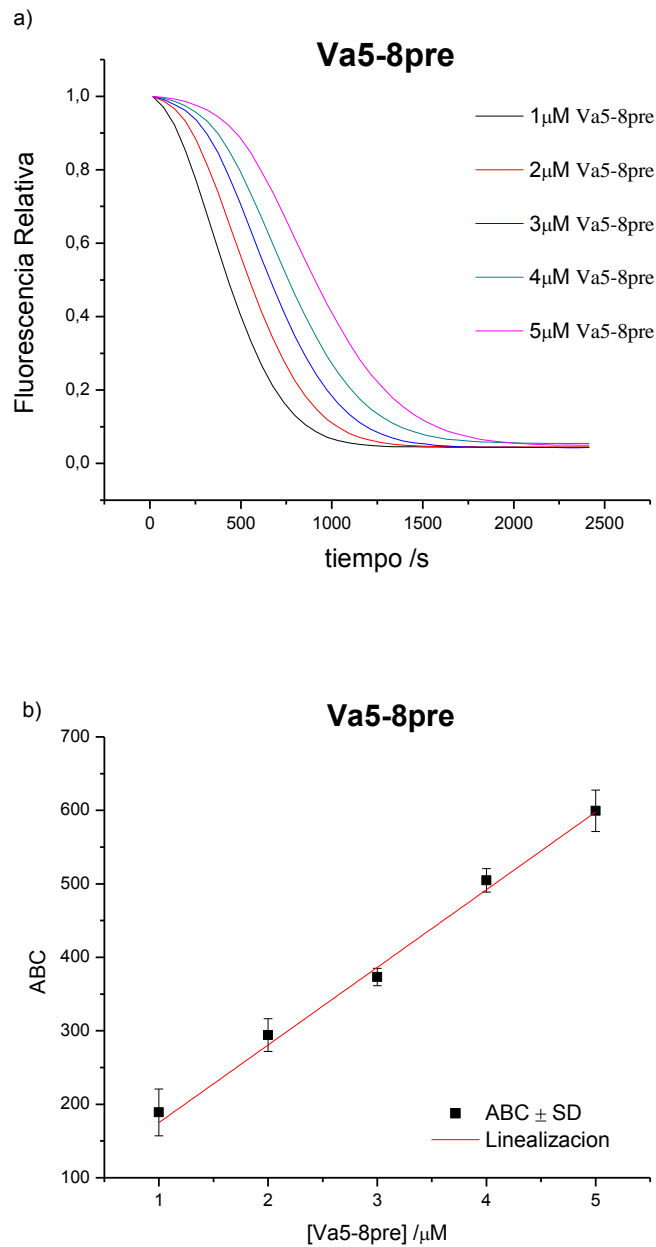


Figura 10: a) Curva de decaimiento del compuesto Va5-8pre b) Ajuste lineal entre el área bajo la curva y la concentración

En la tabla 2, se exponen los parámetros obtenidos de los ajustes lineales entre el ABC y las concentraciones de los compuestos, en los cuales se puede

observar que las pendientes de estos ajustes están dentro de un margen pequeño, entre 100-250; se ve además que la correlación entre las áreas y la concentración (r^2) nos indica que existe un buen grado de dependencia lineal entre estas variables, ya que se están considerando las repeticiones de los ensayos para obtener los valores.

Compuesto (1mM stock)	Pendiente	Intercepto	r^2
Va5-5a	163,6	84,5	0,98
Va5-5b	240,9	124,2	0,99
Va5-5c	225,3	156,2	0,99
Va5-8	154,6	42,7	0,95
Va5-8pre	105,6	69,4	0,98
Va1-3	112,8	340,1	0,95
Va4-27b	138,8	292,5	0,94

Tabla 2: Parámetros correspondientes al ajuste lineal del área bajo la curva en relación a la concentración de los compuestos estudiados.

El ensayo realizado con Trolox, se muestra en la figura 11. En la cual se puede apreciar un comportamiento similar a los vistos para los compuestos en estudio. La figura 11.a, muestra el tiempo de inducción y el tiempo de reacción de FL con AAPH agregando Trolox. Se puede apreciar en la figura 11.b la relación lineal entre las concentraciones utilizadas para este compuesto.

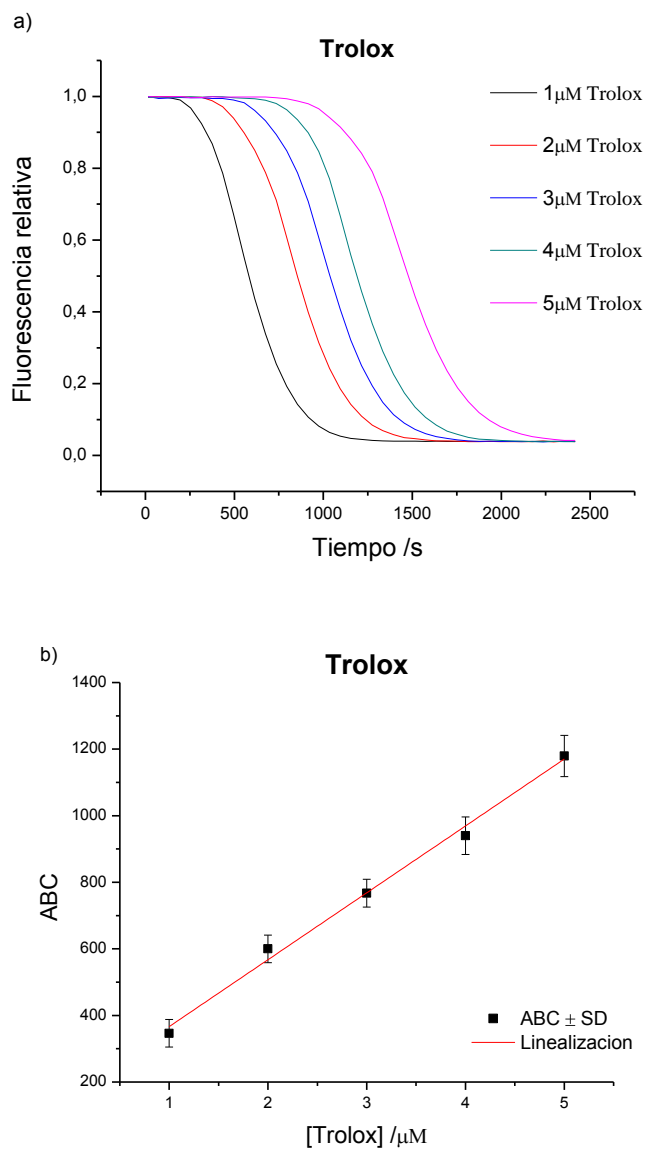


Figura 11: a) Curva de decaimiento Trolox b) Ajuste lineal entre el área bajo la curva y la concentración de Trolox

Los resultados obtenidos en el estudio ORAC-FL presentados como trolox equivalentes, se presentan en la tabla 3, donde se muestran las pendientes de los ajustes lineales de cada compuesto y de Trolox, con los cuales se calculan los Números Equivalentes Trolox, según la ecuación 2 descrita en Metodología.

Compuesto (1mM stock)	Pendiente	Nº equivalentes trolox
Trolox	200,8	1,00
Va5-5a	163,6	0,98
Va5-5b	240,9	1,45
Va5-5c	225,4	1,36
Va5-8	154,6	0,93
Va5-8pre	105,6	0,63
Vacl-3	112,8	0,68
Va4-27b	138,8	0,83

Tabla 3: Valores de equivalentes Trolox obtenidos, correspondiente a los compuestos derivados de 5NI estudiados.

Los valores de equivalentes Trolox pueden ser interpretados como, el número de veces al que equivale la capacidad antioxidante del compuesto, a la capacidad antioxidante de Trolox. Podemos ver, que todos los compuestos muestran una capacidad antioxidante cercana a Trolox (1 equivalente Trolox). Esto, es debido a que la metodología ORAC está directamente relacionada con la estequiometría de la reacción entre los moles de radicales libres y los moles de antioxidante. Por lo tanto, estos resultados nos dicen que la razón entre la cantidad de radicales libres y los hidrógenos lábiles en la estructura es 1; esto se explica, ya que el generador de radicales libres AAPH genera un electrón desapareado (un radical libre) y las moléculas estudiadas presentan en sus estructuras un hidrógeno lábil. Por lo tanto, demuestra que el protón presente en la estructura puede ser cedido a un radical libre.

Estudios cinéticos, espectroscopía de absorción molecular (UV-Vis)

Las constantes de segundo orden (k_2) fueron calculadas para determinar la reactividad y relacionarla así con la capacidad antioxidante de los compuestos derivados de 5-nitroindazol estudiados. DPPH fue apagado en condiciones de pseudo primer orden ($[DPPH]_0 \ll [AH]_0$). La constante de pseudo primer orden (constante observada) obtenida según la metodología descrita (ecuación 5) es linealmente dependiente con la concentración del antioxidante, y de la pendiente de este gráfico se determina la constante de segundo orden (ecuación 6).

En la figura 12, se ve un ejemplo (Va5-8) de los resultados absorbancia en el tiempo, donde todos los compuestos mostraron un comportamiento similar en el decaimiento de la absorbancia.

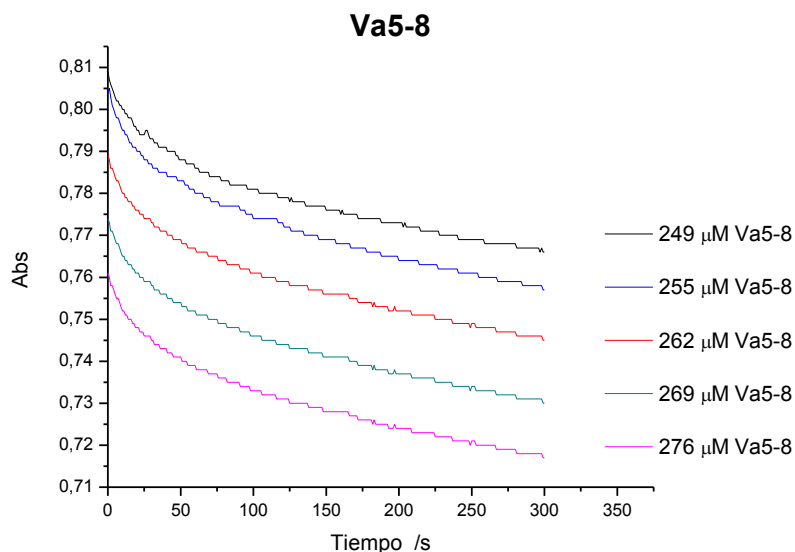


Figura 12: Gráfico absorbancia versus tiempo, de distintas alícuotas del compuesto Va5-8

Luego al aplicar la ecuación 8 y así obtener las pendientes de cada una de las rectas, se graficó la constante observada (pendientes) versus las concentraciones de compuesto agregadas en cada ensayo, obteniendo así la constante de velocidad de segundo orden k_2 , a través de la ecuación 6.

$$k_{obs} = k_2 * [AH]$$

Ecuación 6

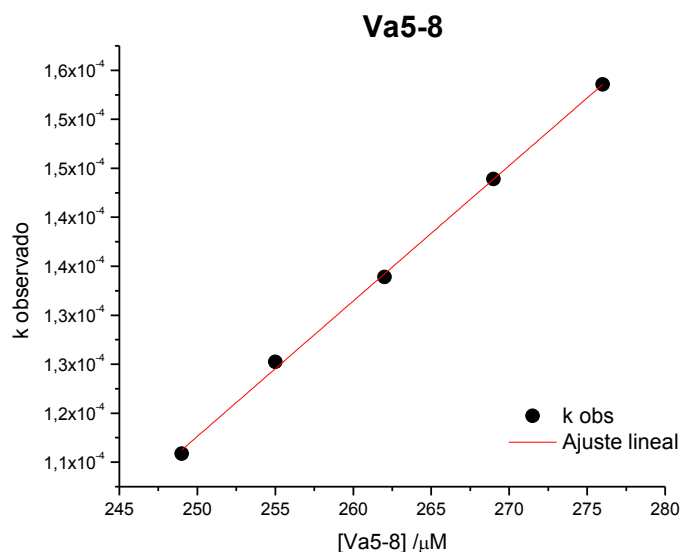


Figura 13: Gráfico constantes K observada versus la concentración de compuesto Va5-8

En la figura 13, se presenta la gráfica de la ecuación 6, con los datos de las constantes observadas obtenidas experimentales para el compuesto Va5-8.

En la tabla 4, se presentan los resultados de las constantes de pseudo primer orden experimentales para todos los compuestos derivados de 5-nitroindazol, donde se muestran las constantes observadas a las distintas concentraciones de compuesto (249, 255, 262, 269, 276 μM respectivamente).

Para cada compuesto se realizó el mismo procedimiento, y luego de obtener las constantes de pseudo-primero orden (constantes observadas), se procedió a graficar las constantes observadas versus la concentración final de compuesto en la celda. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5, en la cual se ven las constantes de segundo orden obtenidas.

a)

Compuesto	k obs 1	k obs 2	k obs 3	K obs 4	K obs 5
Va5-5a	3,4E-05	5,1E-05	5,2E-05	6,4E-05	7,4E-05
Va5-5b	1,9E-04	2,1E-04	2,1E-04	2,1E-04	2,1E-04
Va5-5c	1,8E-04	1,9E-04	1,9E-04	2,0E-04	2,1E-04
Va5-8	1,2E-04	1,2E-04	1,3E-04	1,4E-04	1,5E-04
Va5-8pre	1,4E-04	1,5E-04	1,5E-04	1,6E-04	1,7E-04
Va4-27b	5,6E-05	6,6E-05	7,4E-05	8,5E-05	9,5E-05
Vacl3	4,9E-05	5,8E-05	6,2E-05	6,9E-05	7,6E-05

b)

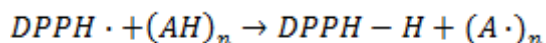
Compuesto	k ₂ /s ⁻¹ μM ⁻¹
Va5-5a	1,3E-06
Va5-5b	7,6E-07
Va5-5c	1,0E-06
Va5-8	1,4E-06
Va5-8pre	1,1E-06
Va4-27b	1,4E-06
Vacl-3	9,4E-07

Tabla 4: a) Datos y resultados experimentales de la obtención de las constantes observadas a distintas concentraciones de los distintos compuestos. b) Constantes de segundo orden obtenidas experimentalmente para cada compuesto.

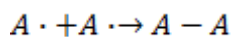
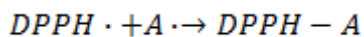
La disminución de la absorbancia es resultado del cambio de color purpura del DPPH a un color mas amarillento, debido a que el radical DPPH es apagado por el antiradical (AH) a través de la donación de un hidrógeno para formar la

forma reducida DPPH-H. El apagamiento del DPPH radical por los diferentes compuestos estudiados en esta tesis, fue muy lento, lo que permitió la caracterización por espectrofotometría convencional UV-Vis.

El apagamiento del DPPH por el antioxidante puede ser representado por la ecuación



Donde el nuevo radical formado ($A \cdot$) sigue principalmente la interacción radical-radical para hacer una molécula estable vía desproporciónación radical, la cual consiste en la colisión de los radicales para formar nuevas moléculas



De acuerdo a los resultados obtenidos de la constante de velocidad k_2 , podemos ordenar los compuestos de acuerdo a sus capacidades de apagar el radical generado, a mayor k_2 mayor reactividad; Va5-5b < Vacl-3 < Va5-5c < Va5-8pre < Va5-5a < Va5-8 < Va4-27b (tabla 4.b). Se puede notar que las constantes obtenidas están dentro de un mismo rango que no hay una gran diferencia entre los valores de estas. Podemos ver que estos valores son bajos (en $s^{-1}M^{-1}$) por lo que se podría decir que esta reacción se produce una velocidad baja.

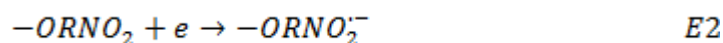
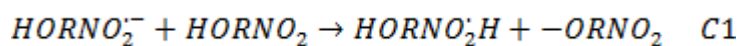
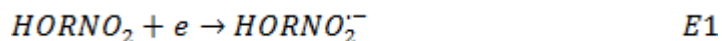
Si comparamos los valores de reactividad y los valores de capacidad antioxidante de los compuestos estudiados, por medio de ORAC-FL y UV-Vis (tabla 5) podemos ver que, de acuerdo a los valores de ORAC-FL, el hidrógeno lábil en sus estructuras, es cedido en razón estequiométrica 1:1 con el DPPH, y que esta acción de ceder el hidrógeno se produce con un valor pequeño de constante de velocidad, por lo que podemos decir que esta reacción es lenta. Al relacionar los valores del potencial de reducción, con lo valores de ORAC-FL, observamos que no existe una relación proporcional entre estos parámetros, aunque se puede ver que el compuesto Va5-5b presenta la mayor capacidad antioxidante, a su vez el potencial de reducción más negativo y la constante de velocidad más baja de todas. Finalmente, cuando correlacionamos todos los parámetros fisicoquímicos estudiados no existe una clara relación entre ellos.

Compuesto	$k_2 / s^{-1} \mu M^{-1}$	Eq. Trolox	E_{pc} / V
Va5-5a	1,368E-06	0,98	-1,38
Va5-5b	7,606E-07	1,45	-1,46
Va5-5c	1,006E-06	1,36	-1,32
Va5-8	1,382E-06	0,93	-1,30
Va5-8pre	1,050E-06	0,63	-1,36
Va4-27b	1,438E-06	0,68	-1,39
Vacl-3	9,429E-07	0,83	-1,36

Tabla 5: Tabla comparativa; valores de k_2 , equivalentes trolox y potencial de reducción.

Conclusiones

- Todos los nitroindazoles estudiados presentaron un mecanismo de reducción similar, el cual involucra una reacción química en un proceso denominado de autoprotónación



- Los potenciales de reducción de los nitroindazoles fueron más negativos que los de la droga utilizada clínicamente en el mal de chagas, Nifurtimox. Lo cual indicaría una mayor dificultad para la generación de la especie radicalaria nitroderivada.
- Los estudios ORAC-FL indicaron que los nitroindazoles presentan una capacidad antioxidante equivalente a Trolox y una razón estequiométrica 1:1 de nitroindazol versus AAPH.
- Los estudios cinéticos indicaron que la donación del hidrógeno lábil es lenta, no existiendo una relación clara con la estructura del nitroindazol.
- Los resultados de ORAC-FL y de las constantes cinéticas indicarían que el hidrógeno lábil no debería afectar la capacidad generadora de radicales libres del nitrocompuesto.
- Todos los parámetros fisicoquímicos estudiados podrían ser relevantes para explicar la posible actividad antiparásita

Bibliografía

1. Campano Díaz, Sergio. Enfermedades parasitarias producidas por protozoos parte 1. En su: Enfermedades Parasitarias. Universidad de Chile / Universidad Pedro de Valdivia. Chile. 2006. pp. 1-55
2. WHO. Chagas disease: Strategic direction for research. Disease Burden and Epidemiological Trends. [En línea] <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>> [Consulta: Septiembre 2008]
3. Silvia N. J. Moreno, R. Docampo, R. P. Mason, W. Leon, A. O. M. Stoppani. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Archives of Biochemistry and Biophysics. Volume 218(2): 585-591. October 1982
4. J. R. Gillette y col. Medicina. 44: 261, 1981
5. Morello A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. Volume 90(1): 1-12. 1988
6. Roberto Docampo, Silvia N.J. Moreno, Andrés O.M. Stoppani, Wilson Leon, Fernando S. Cruz, Fernando Villalta, Ramiro F.A. Muniz. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochemical Pharmacology. Volume 30(14): 1947-1955. July 1981
7. Roberto Docampo, Angela M. Casellas, Eliana D. Madeira, Rita L. Cardoni, Silvia N. J. Moreno, Ronald P. Mason. Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. FEBS Letters. Volume 155(1): 25-30. May 1983
8. Marta Dubin, Silvia N.J. Moreno, Elba E. Martino, Roberto Docampo, A.O.M. Stoppani. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. Biochemical Pharmacology. Volume 32(3): 483-487. February 1983
9. H. Cerecetto, B. Messter, S. Onetto, G. Seoane, M. González y P. Zinola. II Farmaco, 47(9): 1207. 1992
10. H.Ferreira, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 23 (1990) 209-211
11. S.Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P Caputi, D. Salvemini, Pharmacol. Rev 53 (2001) 135-159

12. W.H. Koppenol, *Free Radic. Biol. Med. Chem.* 2 (2002) 1187-1213.
13. C. Olea-Azar, Rigol C, Mendizabal F, Otero L, Gambino D, Gonzalez M, Cerecetto H. *Spectrochimica Acta part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2005) 61, 2933
14. V. J. Arán, C. Ochoa, L. Boiani, P. Buccino, H. Cerecetto, A. Gerpe, M. González, D. Montero, J. J. Nogal, A. Gómez-Barrio, A. Azqueta, A. López de Ceráin, O. E. Piro, E. E. Castellano, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (2005), 13, 3197.
15. C. Olea-Azar, H. Cerecetto, A. Gerpe, M. González, V.J. Arán, C. Rigol, L. Opazo. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochimica Acta Part A*. Volume 63: 36-42. 2005
16. Rodriguez J, C. Olea-Azar, Barriga G, Folch C, Gerpe A, Cerecetto H, Gonzalez M. Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3-hidroxy and 3-oxo derivatives. *Spectrochimica Acta part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* volume 70: 557-563. 2008
17. R.S. Nicholson and I. Shain. *Anal. Chem.* Volume 36: 706. 1964
18. A. Dávalos, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of agricultural and food chemistry*. Volume 52: 48-54. 2004
19. J. Rodriguez, C. Olea-Azar, C. Cavieres, E. Norambuena, T. Delgado-Castro, J. Soto-Delgado, R. Araya-Maturana. Antioxidant properties and free radical-scavenging reactivity of a family of hidroxynaphthalenones and dihydroxyanthracenones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Volume 15: 7058-7065. 2007
20. J.C. Espín, C. Soler-Rivas, H.J. Wichers, C. García-Viguera. Anthocyanin-Based Natural colorant: A new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* Volume 48: 1588-1592. 2000
21. E. Alarcón, A.M. Campos, A.M. Edwards, E. Lissi, C. López-Alarcón. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Foods Chemistry*, (2007), doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.035
22. J. Rodriguez, A Gerpe, G. Aguirre, U. Kemmerling, O.E. Piro, V.J. Arán, J.D. Maya, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto. Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: Electrochemical behaviour and ESR

spectroscopic studies. European Journal of Medicinal Chemistry (2008), doi:10.1016/j.ejmech.2008.07.018

23. Guirado López, Gonzalo. Aproximación electroquímica a la reacción de sustitución nucleófila aromática. Determinación del mecanismo de oxidación de los sigma-complejos. Comportamiento electroquímico de compuestos nitroaromáticos. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002. 245-255
24. J. Maya, S. Bollo, L. Nuñez-Vergara, J. Squella, Y. Repetto, A. Morello, J. Périé, G. Chauvière. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurazone derivatives. Biochemical Pharmacology. Volume 65: 999-1006. 2003
25. Man-Chin Chung, Carvalho Guido, Favaro Martinelli, Ferreira Goncalves, Carneiro Polli, Alves Botelho, Varanda, Colli, Miranda, Ferreira. Synthesis and in vitro evaluation of potential antischistosomal hydroxymethylnitrofurazone: A new nitrofurazone prodrug. Bioorg. Med. Chem. Volume 11: 4779-4783. 2003