

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE NUEVOS COMPUESTOS  
N-ARIL AMIDO CUMARINAS***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Química área de Especialización Tópicos en Química  
Medicinal y Memoria para optar al Título de Química por:

***ANDREA JOANA MUÑOZ CÁCERES***

Directores de Tesis: Dr. Claudio Olea Azar  
Dr. Juan Diego Maya

**Santiago-CHILE**

**Agosto 2015**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## ANDREA JOANA MUÑOZ CÁCERES

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Tópicos en Química Medicinal y Título de Química, en el examen público rendido el día 11 de agosto del 2015.

#### Directores de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

---

Dr. Juan Diego Maya

---

#### Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Hernán Pessoa

---

Dra. Ulrike Kemmerling

---

Dra. Margarita Aliaga

---

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer enormemente a mis directores de tesis Dr. Claudio Olea Azar y Dr. Juan Diego Maya, quienes me apoyaron y orientaron en todo este proceso.

Especialmente agradecer a mi profesor Claudio Olea, a quien conozco desde mis años de estudio en pregrado, tuve la fortuna de tenerlo como profesor y posteriormente como tutor en este proceso final de mi carrera. Siempre me orientó, ayudo, me guio en todo momento incluso cuando estaba muy nerviosa. Muchas gracias de todo corazón por toda su ayuda profe, por aceptarme como tesista y estar siempre preocupado por mí, tanto en lo personal como en lo académico.

Muchas gracias a la comisión evaluadora, por sus observaciones, recomendaciones y críticas constructivas respecto a este trabajo de investigación.

Gracias al laboratorio del Dr. Eugenio Uriarte de Santiago de Compostela, principalmente a María Joao Matos, por sintetizar mis compuestos en estudio.

Agradezco también a todo el grupo del laboratorio de radicales libres y antioxidantes, por todas sus enseñanzas, ayuda, disposición en todo momento, orientación y buenos momentos vividos en el transcurso de este tiempo. Agradecer a Francisco por su ayuda en EPR y VC, a Alejandra en ORAC-FL y VC, Cristian y Benjamín por sus aportes en los ensayos de preparación, Germán en el EPR, Michel y Roberto por toda su ayuda en el estudio tripanocida y Mauricio por su gran voluntad y generosidad.

A la profesora María Carolina, muchas gracias por toda su ayuda, por estar siempre presente en los ensayos de presentación y por estar pendiente de mí.

Muchas gracias a mis amigas lindas, hemos recorrido un largo camino juntas, salimos de varias dificultades, ayudándonos, apoyándonos, subiéndonos el ánimo unas a otras. Tuve la fortuna

que Dios las puso en mi camino, sin ustedes todo hubiera sido mucho más difícil y mucho más aburrido. Espero tenerlas siempre conmigo. Las quiero mucho. Gracias Caro por estar todos estos años a mi lado, apoyándome, ayudándome en muchos ramos, por el cariño, largas conversaciones, por tantas cosas que llenan mi corazón enormemente.

Nati, desde el primer día hasta el final de este camino juntas, eso me hace muy feliz. Gracias por toda la ayuda y apoyo en estos años, esto aumentado en este último tiempo, que tuve la suerte de que estuviéramos juntas en este proceso, gracias a eso, todo fue mucho mejor. Tantas anécdotas y risas por montón. Nunca nos faltó tema de conversación. Gracias amiga querida.

A mis padres les agradezco todo lo que soy, todo el apoyo que siempre me dieron y me han dado, siempre confiando en mí, en mis decisiones, en mis capacidades. Gracias mamita hermosa, por siempre estar a mi lado, por todo su apoyo, por levantarme cuando he estado abajo. Eres mi ídola, te admiro eternamente por ser como

eres. Gracias a mi papi por siempre apoyarme en mis decisiones, por confiar totalmente y por querer siempre lo mejor para mí. Los amo con todo mi corazón.

Muchas gracias a mi hermanita por todo su apoyo, confianza y preocupación infinita. Te amo mucho.

Al amor de mi vida Felipe Figueroa, agradecerle por todos estos años de apoyo, por alegrar mi vida. Cuando el estrés y cansancio se apoderaban de mí, estabas ahí con tu amor, cariño y positivismo, subiéndome el ánimo siempre. Muchas gracias por ayudarme y tomar mi mano en el camino de la vida, sin ti nada sería posible. Te amo con toda mi alma.

Agradezco a Dios por siempre estar conmigo, llenándome de bendiciones siempre. Y por poner a buenas personas en mí camino, en cada una de las etapas de mi vida y más importante en este momento que concluyo una de las etapas más difíciles.

Esta tesis es el cierre de un maravilloso camino y un gran sueño cumplido. Eternamente agradecida a todos los que fueron parte de ella.

## Abreviaturas

**AAPH:** 2,2'-azobis (2-metilpropionamida)

**DMPO:** 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DMF:** dimetilformamida

**DPPH:** radical 1,1 difenil-2-picrilhidrazilo

**REE:** resonancia de espín electrónico

**ECE:** Electrochemical, Chemical, Electrochemical (mecanismo de transferencia electrónica)

**FL:** fluoresceína, ácido 2-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il) benzoico

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

**ORAC-FL:** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando sonda fluoresceína

**ROO•:** radicales peroxilo

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**Trolox:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

**PBN:**  $\alpha$ -fenil-N-terbutil-nitrona

**PTBA:** perclorato de tetrabutilamonio



## Resumen

La Tripanosomiasis americana o mal de Chagas es una enfermedad potencialmente mortal, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), cuya principal vía de infección es a través de las heces del insecto vector comúnmente conocido como vinchuca. Esta enfermedad es endémica de América latina, pero se ha extendido a otros continentes, lo que lo hace un problema a nivel mundial.

Para el tratamiento de la enfermedad existen dos drogas: nifurtimox y benznidazol. Estos medicamentos tienen una mayor efectividad en la fase aguda de la enfermedad, y conllevan a efectos secundarios indeseables. Por estos motivos existe la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de Chagas, como la familia de las cumarinas. Estas se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (también son sintetizadas), son de gran interés, debido a sus numerosas actividades biológicas, actividad antiprotozoaria y una destacada capacidad antioxidante. Por lo que, presentan un potencial uso en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En este trabajo se presenta el estudio electroquímico, capacidad antioxidante y actividad tripanocida de compuestos N-aril amido cumarinas.

Encontrándose, mediante técnica electroquímica (voltametría cíclica), que los compuestos que contienen grupo nitro en su estructura presentaron un proceso de reducción correspondiente a la generación del radical anión nitro, a través del mecanismo ECE. En el estudio oxidativo de los compuestos hay un proceso de oxidación del grupo hidroxilo hacia la formación de un carbonilo, a través de un intermediario radicalario, el que fue detectado y caracterizado por resonancia de espín electrónico (REE). Se observó un pico anódico irreversible en todos los voltamogramas, que indica la oxidación de la amida (en el rango de 0,98-1,48 V).

La capacidad antioxidante fue determinada a través de ORAC-FL, encontrándose valores bajos, atribuidos a la cantidad de grupos hidroxilo en las estructuras de los compuestos estudiados.

En cuanto a la actividad frente a *T. cruzi*, en el estadio epimastigote del parásito, los mejores de la serie fueron el 9 y 10 (los cuales poseen una quinolina en la estructura), con un IC<sub>50</sub> de 22,25 μM y 20,9 μM, respectivamente, siendo ambos mayores a la concentración de nifurtimox (17,4 μM). En el estadio tripomastigote, la familia de cumarinas no resultaron ser potentes, lo máximo logrado fue una disminución de viabilidad del

parásito en un 34,9% a una concentración de 50  $\mu$ M. De acuerdo a la citotoxicidad en células macrófagos, en relación a nifurtimox, todos los compuestos evaluados, son más tóxicos.

Finalmente mediante la técnica de REE y *spin trapping* se determinó que los compuestos N-aril amido cumarina, producen estrés oxidativo y este quizás sea una posible explicación de la toxicidad hacia los parásitos en estadio epimastigote. Sin embargo no se puede descartar otro mecanismo de acción.

## SUMMARY

American Trypanosomiasis or Chagas disease is a potentially fatal disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), the main route of infection is through the feces of the insect vector commonly known as Vinchuca. This disease is endemic in Latin America, but has spread to other continents, which makes it a worldwide problem.

For the treatment of the disease there are two drugs: nifurtimox and benznidazole. These medicines are more effective in the acute phase of the disease, and lead to undesirable secondary effects. For these reasons there is a need to seek new alternatives for the treatment of Chagas, as the family of coumarins. These are widely distributed in nature (they are also synthesized) are of great interest due to its numerous biological activities, antiprotozoal activity and an outstanding antioxidant capacity. Therefore, they have potential use in the treatment of Chagas disease. This paper presents the electrochemical study, antioxidant activity and trypanocidal N-aryl coumarin amide compounds.

Finding, by electrochemical technique (cyclic voltammetry), that compounds containing nitro group in its structure presented a reduction process corresponding to the radical anion generation nitro, through the ECE mechanism. In the oxidative study of compounds there is a process of oxidation of the hydroxyl group to the formation of a carbonyl, through a radical intermediate, which was detected and characterized by electron spin resonance (ESR). An irreversible anodic peak was observed in all voltammograms, indicating the oxidation of the amide (in the range of 0.98 to 1.48 V).

The antioxidant capacity was determined by ORAC-FL, being low values attributed to the amount of hydroxyl groups in the structures of the compounds studied.

As regards the activity against *T. cruzi*, epimastigote stage of the parasite, the best of the series were 9 and 10 (which have a quinoline structure), with an  $IC_{50}$  of 22.25  $\mu\text{M}$  and 20.9  $\mu\text{M}$  respectively, both being greater than the concentration of nifurtimox (17.4  $\mu\text{M}$ ). In the trypomastigote stage, the family of coumarins were not potent, the maximum achieved was a parasite viability decreased by 34.9% at a concentration of 50  $\mu\text{M}$ . According to

macrophage cell cytotoxicity in relation to nifurtimox, all compounds tested are more toxic.

Finally by ESR technique and spin trapping was determined that N-aryl amide compounds coumarin, produce oxidative stress and this may be a possible explanation of the toxicity to the parasites in epimastigote stage. However, cannot discard another mechanism of action.

# Tabla de contenidos

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Aspectos generales de la enfermedad de Chagas. ....	1
1.2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	2
1.3. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas. ....	5
1.4. Nuevas propuestas de compuestos tripanocidas. ....	8
1.5. Cumarinas. ....	16
<b>2. Hipótesis</b> .....	24
<b>3. Objetivos</b> .....	24
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos específicos .....	25
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	26
4.1. Estudio electroquímico. ....	26
4.2. Caracterización de las especies radicalarias generadas a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).....	27
4.3. Estudio de la capacidad antioxidante.....	28
4.3.1. Reactividad frente a radicales libres .....	28
4.3.1.1. Reactividad frente a radical hidroxilo .....	28
4.3.1.2. Reactividad frente a radical anión superóxido .....	30
4.3.2. Ensayo ORAC-FL.....	31
4.2. Estudio de la actividad tripanocida en <i>t. cruzi</i> .....	34
4.2.1. Estudio de la actividad en epimastigotes Dm28c. ....	34
4.2.2. Estudio de la actividad en tripomastigotes Dm28c .....	36
4.2.3. Determinación de la citotoxicidad en células de mamífero.....	37

4.2.4. Detección de radicales libres en parásitos epimastigote de <i>T. cruzi</i> , mediante REE. ....	38
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	<b>39</b>
5.1. Estudio electroquímico .....	39
5.1.1. Estudio del comportamiento catódico de la familia de cumarinas, utilizando voltametría cíclica en medio aprótico.....	39
5.1.2. Estudio del comportamiento anódico de la familia de cumarinas, utilizando voltametría cíclica en medio aprótico.....	47
5.2. Caracterización de las especies radicalarias generadas, a través de REE. ....	57
5.3. Estudio de la reactividad frente a radicales libres .....	59
5.3.1. Estudio de la reactividad frente al radical hidroxilo.....	59
5.3.2. Estudio de la reactividad frente al radical anión superóxido.....	61
5.4. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL.....	64
5.5. Evaluación de la actividad tripanocida selectiva en epimastigotes y tripomastigotes <i>T. cruzi</i> , utilizando la reducción de MTT. ....	70
5.6. Detección de radicales libres generados por cumarinas en un medio parasitario en el estadio epimastigote, por medio de REE. ....	75
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>80</b>
<b>7. Referencias</b> .....	<b>82</b>



## Índice de ecuaciones

Ecuación 1: Determinación del índice ORAC-FL .....	32
--	----

## Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros característicos de VC en DMSO, a velocidad de barrido 2,5 V/s.....	41
--	----

Tabla 2. Potencial de oxidación de los compuestos N-aril amido cumarinas, que presentan picos anódicos irreversibles.....	51
---	----

Tabla 3. Porcentaje de <i>scavenging</i> del radical hidroxilo .....	59
--	----

Tabla 4. Porcentaje de <i>scavenging</i> del radical anión superóxido .....	61
---	----

Tabla 5. Valores de índices ORAC-FL de los compuestos estudiados .....	65
--	----

Tabla 6. Actividad de las N-aril amido cumarinas sobre células RAW 264.7 y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c .....	72
--	----

Tabla 7. Constantes de acoplamiento hiperfinas, teóricas y experimentales del espectro correspondiente al compuesto 2.....	76
--	----

## Índice de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura 2: Estructura química de los fármacos utilizados en enfermedad de Chagas .....	8
Figura 3: Esquema donde; (a) 5-nitrofurilo que contiene tiosemicarbazonas seleccionadas como ligandos (b) las dos series de complejos de platino (II) .....	10
Figura 4: Estructura química de los compuestos en estudio .....	11
Figura 5: (a) Estructura química de los nitroquinoxalina y sus derivados (b). Al lado derecho 4-sustituido y 1,4-disustituido 7-nitroquinoxalina-2-onas. (A) series de derivados; (B) series de derivados.....	12
Figura 6: Estructura química de la serie de híbridos Hidrazona-quinolina en estudio de la actividad antiparasitaria .....	13
Figura 7: Nueve flavonoides de la planta <i>Delphinium staphisagria</i> .....	15
Figura 8: Estructura química de la cumarina (2H-cromen-2-ona).....	16

Figura 9: 4-hidroxycumarina y 4-hidroxi-3-arilcumarinas con actividad antioxidante .....	18
Figura 10: Derivados de hidroxi-3-arilcumarinas con actividad antioxidante y antiparasitaria .....	19
Figura 11: Derivados de cumarinas, 3-amido/carbamatocumarinas con actividad antioxidante y antiparasitaria .....	20
Figura 12: Estructura química de N-aril amido cumarinas.....	22
Figura 13: Espectro con patrón hiperfino característico del <i>spin-trap</i> PBN, cuando reacciona con un radical centrado en carbono .....	27
Figura 14: Reacción entre el 5,5-dimetil-1-pirrolin N-oxido (DMPO) y el radical hidroxilo, con formación de un espín aducto .....	29
Figura 15: (A) Espectro REE del atrapamiento del radical hidroxilo por DMPO en ausencia de antioxidante. (B) Espectro REE con adición de compuesto antioxidante (DMPO-OH) .....	29
Figura 16: (A) Espectro REE del atrapamiento del radical anión superóxido por DMPO en ausencia de antioxidante. (B) Espectro REE con adición de compuesto antioxidante (DMPO-O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	30

Figura 17: Estructura química de los compuestos necesarios en el estudio de ORAC-FL.....	32
Figura 18: Gráfico de decaimiento de la zona fluoresceína versus el tiempo, a distintas concentraciones de antioxidante y el blanco que no posee compuesto .....	32
Figura 19: Ejemplo del gráfico del área bajo la curva neta versus la concentración .....	33
Figura 20: Reducción metabólica del MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) a sales formazán, por células vivas .....	35
Figura 21: Voltamogramas cíclicos de los compuestos 4 y 5 .....	40
Figura 22: Gráfico Log $i_{p,c}$ versus log $v$ del compuesto 4 .....	41
Figura 23: Mecanismo de autoprotónación ECE .....	44
Figura 24: Voltamograma de barridos sucesivos del compuesto 4, a una velocidad de barrido de 2,5 V/s .....	45
Figura 25: Voltamogramas del compuesto 4 en presencia de cantidades crecientes de NaOH 0,1M (de 0 $\mu$ L hasta 34 $\mu$ L).....	46

Figura 26: Voltamogramas cíclicos de algunos compuestos N-aril amido cumarina representativos, a diferentes velocidades de barrido, que varían entre 0,1V/s y 2,5V/s.....	49
Figura 27: Gráfico Log $i_{p,a}$ versus log v del compuesto 1, representativo del resultado obtenido para las cumarinas en estudio.....	50
Figura 28: Mecanismo oxidativo propuesto para los compuestos monohidroxilados.....	52
Figura 29: Voltamograma a distintas velocidades y potencial anódico del compuesto N-(2-oxo-2H-cromona-3-il) benzamida .....	55
Figura 30: Mecanismos propuestos para explicar la oxidación de la amida y modificación química del electrodo .....	56
Figura 31: Espectro REE experimental del espín-aducto formado entre PBN y el radical libre que se genera por la oxidación electroquímica del compuesto 3 .....	58
Figura 32: Estructura química del compuesto estándar Trolox .....	64
Figura 33: Perfiles cinéticos del consumo de FL inducida por radicales peroxilo derivados de AAPH en presencia de los compuestos 3 y 8, a diferentes concentraciones .....	65

Figura 34: Curva de regresión lineal obtenida del compuesto 3, para obtener la pendiente y así calcular el índice ORAC-FL .....	65
Figura 35: Actividad citotóxica de las N-aril amido cumarinas, sobre células RAW 264.7. ....	70
Figura 36: Actividad tripanocida de las N-aril amido cumarinas, sobre epimastigotes (A) y tripomastigotes (B) de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c .....	73
Figura 37: Espectro experimental para los espín-aducto generados en epimastigotes de <i>T.cruzi</i> (cepa Dm28c) en medio DMSO, NADPH y DMPO .....	77
Figura 38: Reducción de la cumarina e interacción de sus productos metabolizados con el <i>spin-trap</i> DMPO.....	79

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Aspectos generales de la enfermedad de Chagas.

La *Tripanosomiasis* americana, más conocida como enfermedad de Chagas, es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Es una zoonosis cuya principal vía de transmisión es por medio de un insecto vector denominado *Triatoma infentans*, comúnmente conocido como vinchuca. También se puede transmitir de forma no vectorial, ya sea por transfusión de sangre, transmisión congénita, por trasplante de órganos o de médula ósea e incluso transmitirse por la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con *T. cruzi* [1]. La enfermedad de Chagas es un grave problema de salud en América Latina y está siendo emergente en países no endémicos, tales como Estados Unidos, países de Europa, Asia y Oceanía. Este cambio se ha debido a los nuevos patrones de inmigración, lo que lleva a la urbanización y la globalización de la enfermedad [2]. Por otro lado, esta enfermedad afecta entre 8-10 millones de personas en América latina; además, los medicamentos disponibles son bastante tóxicos y menos

eficaces en la fase crónica de la enfermedad y no existe vacuna, todo esto hace que sea un problema mundial muy importante [3].

## **1.2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.**

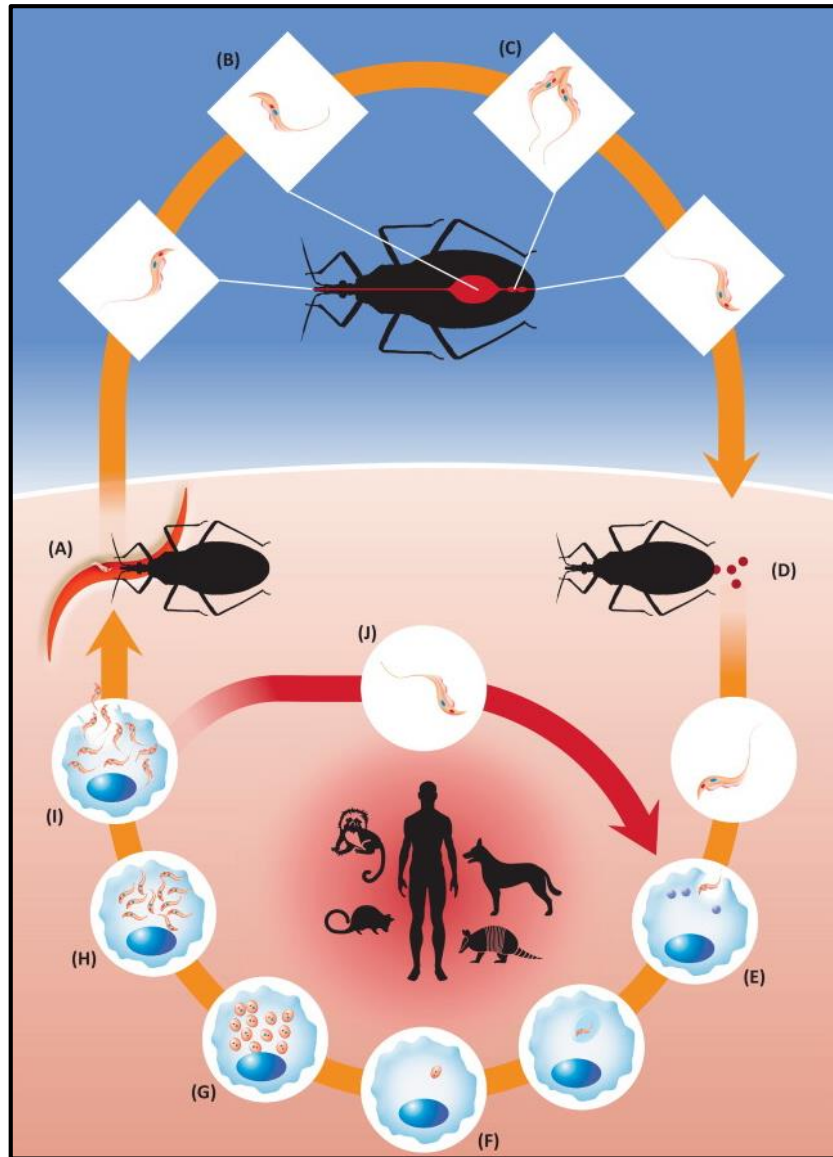
*T. cruzi* es un protozoo de la familia *Trypanosomatidae*, tiene un flagelo y su única mitocondria contiene cinetoplasto, una red de ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial del parásito. El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, variando en el insecto vector (triatomino) y el huésped (Figura 1).

El ciclo biológico comienza cuando el insecto se alimenta con sangre de mamífero infectada con tripomastigotes (Figura 1, A), forma infectiva no replicativa del parásito. Estos parásitos se transforman en el tracto digestivo superior a epimastigotes (forma replicativa no infectiva) (Figura 1, B) cuando llegan al tracto digestivo posterior, se vuelven a transformar en tripomastigotes, denominados metacíclicos (figura 1, C).

Cuando el insecto que contiene al *T. cruzi* pica a otro mamífero, este deposita sus heces cerca de una herida preexistente o provocada por la propia



picadura, permitiendo la entrada de tripomastigotes metacíclicos a los tejidos del mamífero (Figura 1, D). El tripomastigote migra por el tejido intersticial hasta encontrar e infectar a macrófagos y otras células nucleadas (Figura 1, E). Una vez dentro de las células, cambian al estadio amastigote que es la forma replicativa en el huésped. Luego de sucesivas divisiones (Figura 1, G), se transforman nuevamente en tripomastigotes (Figura 1, H), los cuales son capaces de provocar lisis celular y comenzar un nuevo ciclo de infección (Figura 1, I) [4-5].



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* [5].

### **1.3. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas.**

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: aguda y crónica

**Fase aguda:** La fase aguda dura entre 4 a 8 semanas. En esta etapa la mayoría de los pacientes son asintomáticos, pero algunos síntomas se desarrollan alrededor de 8 a 10 días post infección. Estos se manifiestan como fiebre prolongada, malestar general y aumento del tamaño de hígado, bazo y ganglios linfáticos. La mayoría de las muertes producidas en esta fase se deben a una insuficiencia cardíaca por miocarditis [4,6-8].

**Fase crónica:** 2 a 3 meses después de la infección inicial, los pacientes desarrollan la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas, que no tiene síntomas clínicos y puede durar más de 30 años. El 30% de estos pacientes desarrollan la forma determinada, caracterizada por insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas y tromboembolismo venoso o arterial. La insuficiencia cardíaca es la manifestación clínica más frecuente y grave ya que conlleva a altas tasas de mortalidad [7-9].

Un punto coincidente en la patogénesis de varias enfermedades parasitarias es el daño oxidativo, inducido por los propios parásitos o como consecuencia de otros aspectos fisiopatológicos de la enfermedad que causan.

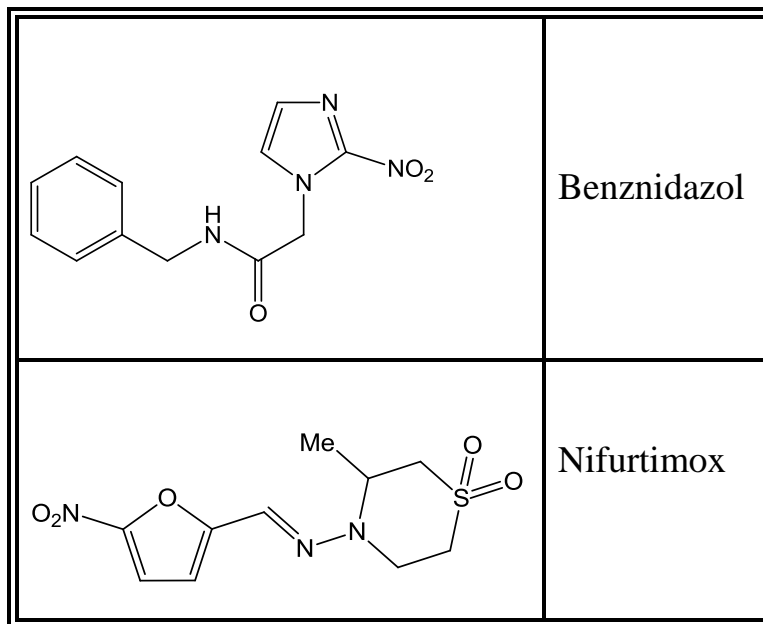
En el caso de la enfermedad de Chagas, la respuesta inmunitaria provocada por el parásito y el daño microvascular observado con la consiguiente isquemia, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), dando lugar a daño oxidativo a través de la peroxidación de lípidos, modificaciones en proteínas y daños en el ADN [10-11]. En el caso de la *leishmaniasis*, la respuesta inmunitaria provocada por la intervención del parásito proporciona un entorno oxidativo, a través de la producción de ROS y RNS, que pueden contribuir a lesiones cutáneas, a través de daños en el ADN de las células no infectadas [12-13].

### **Tratamiento de la enfermedad.**

Principalmente hay dos fármacos que se utilizan como tratamiento para la enfermedad de Chagas: benznidazol y nifurtimox (Figura 2). El objetivo del tratamiento es curar la infección en la fase aguda para evitar daños a los órganos en la fase crónica. Además, su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección. Por otro lado, estos fármacos poseen una serie de efectos secundarios muy dañinos lo que complica más aun el tratamiento [4].

**Benznidazol:** Es un derivado nitroimidazol (N-bencil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida). El efecto adverso más común de este fármaco es una dermatitis alérgica generalizada o localizada, que afecta a alrededor del 20% al 30% de los pacientes y se compone de erupciones eritematosas polimorfas. Otros efectos adversos van desde una neuropatía periférica sensitiva hasta náuseas, vómitos, anorexia, insomnio y pérdida del gusto.

**Nifurtimox:** Es un derivado nitrofurano (3-metil-4-(((5-nitrofurán-2-il)metileno)amino)tiomorfolina 1,1-dioxido). Los síntomas gastrointestinales son los efectos secundarios más comunes, ocurre en aproximadamente un 50% de los pacientes, e incluyen anorexia con pérdida de peso, náuseas, vómitos y malestar abdominal. Otros efectos secundarios comunes incluyen síntomas de toxicidad del sistema nervioso central, manifestándose en insomnio, irritabilidad y desorientación [4,9,14].



**Figura 2:** Estructura química de los fármacos utilizados en enfermedad de Chagas.

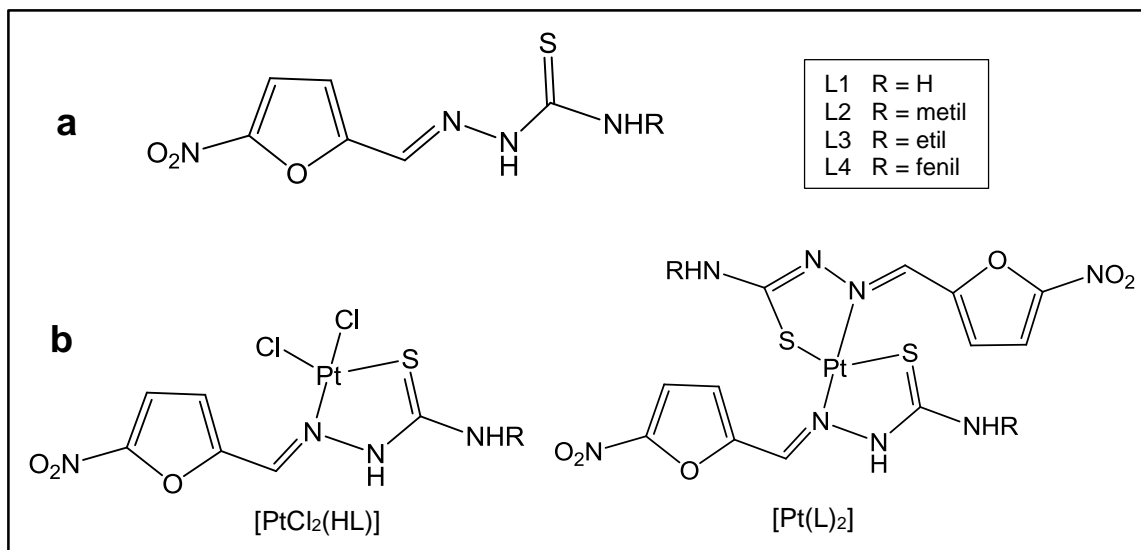
#### 1.4. Nuevas propuestas de compuestos tripanocidas.

Debido a las desventajas de los fármacos que se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y sus limitaciones, se han buscado nuevas alternativas de compuestos antichagásicos. Una propuesta interesante, es definir que por un lado la producción de ROS y el estrés oxidativo no está exclusivamente implicado en la progresión de las enfermedades parasitarias, sino que también están implicados en la biología del parásito. En el *T. cruzi*, la producción de ROS puede ser regulada para ejercer efectos tóxicos que dañen al parásito y que conlleven a la muerte de

este [11]. Este último punto se podría utilizar como una estrategia para diseñar fármacos con potencial actividad tripanocida.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado ampliamente distintos tipos de compuestos, utilizando la propuesta anterior. Aquí se mencionan algunos estudios:

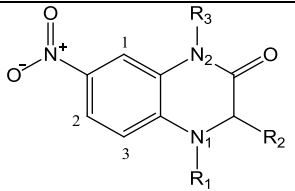
Vieites M. y cols. (2008) realizaron un estudio utilizando complejos de platino II (Fig. 3), obteniendo para la mayoría de los compuestos sintetizados, valores de  $IC_{50}$  en el rango  $\mu M$ , indicando que son tan activos como el fármaco nifurtimox. Sus resultados sugieren que los complejos podrían inhibir el crecimiento del parásito a través de un doble mecanismo de acción, que implica la producción de radicales libres tóxicos por biorreducción y la interacción con el ADN [16].



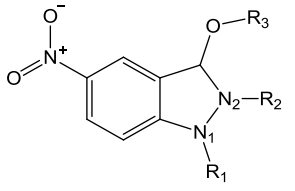
**Figura 3:** Esquema representativo de los complejos (a) Compuesto 5-nitrofurilo con tiosemicarbazonas, seleccionadas como ligandos (b) Las dos series de complejos de platino (II).

Aravena M. y cols. (2010) utilizaron las técnicas de voltametría cíclica y resonancia de espín electrónico (REE) en la investigación de derivados dihidroquinoxalina e indazol, con grupo nitro en su estructura (Fig. 4), potencialmente antiprotozoarios. Se observó un proceso de autoprotónación, que implica la protonación del grupo nitro, debido a la presencia de un protón ácido en la estructura, como primer paso de un mecanismo de reducción. El ensayo ORAC-FL mostró que todos los compuestos estudiados tienen baja capacidad antioxidante, lo que indica que el hidrógeno lábil presente en la estructura de los compuestos no debe interferir con su capacidad para generar radicales aniones libres [17].



Estructura química de derivados Dihidroquinoxalina			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
NQ-1	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -Cl	-H	-H
NQ-2	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>
NQ-3	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -Cl	-H	-CH <sub>3</sub>
NQ-4	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		-H
NQ-5	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -		-H
NQ-6	-CH <sub>2</sub> -Ph-CH <sub>2</sub> -		-H

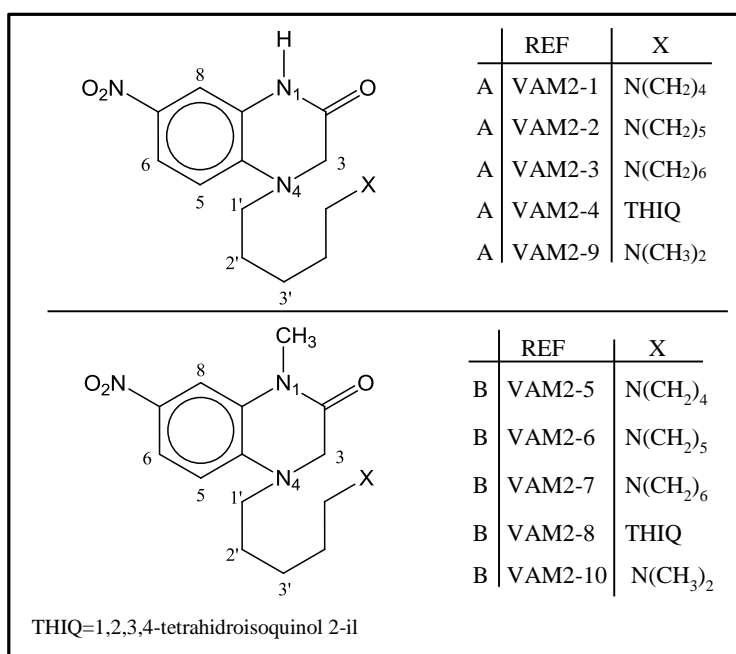
  

Estructura química de derivados 5-Nitroindazol			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
NI-1	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> -O-Cl-Ph)
NI-2	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -		---
NI-3	-(CH <sub>2</sub> -Ph)	-CH <sub>3</sub>	---
NI-4	-CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> -Ph)	---

**Figura 4:** Estructura química de los compuestos estudiados por Aravena y cols.

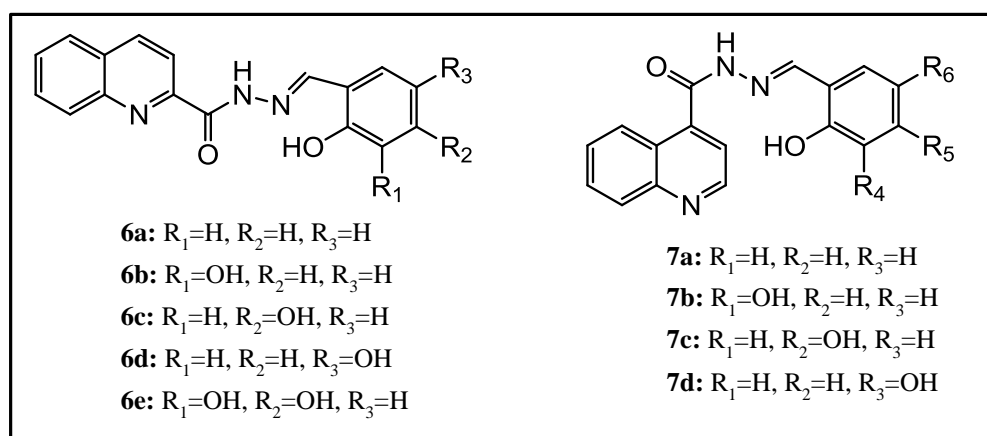
Aguilera-Venegas B. y cols. (2011) llevaron a cabo estudios electroquímicos y de REE con el objetivo de caracterizar los mecanismos de reducción de 7-nitroquinoxalin-2-onas (Fig. 5). Se encontraron dos mecanismos de reducción en estos compuestos: el primero, para compuestos que portan un hidrógeno lábil siguiendo un mecanismo de autoprotonación y el segundo, para los compuestos sin hidrógeno lábil, basado en un mecanismo

de reducción electroquímica. Todos estos compuestos se ensayaron como inhibidores del crecimiento de *T. cruzi*, encontrándose cuatro nuevos compuestos altamente activos contra el parásito. Por último, los ensayos biológicos REE mostraron que estos compuestos no están relacionados con los mecanismos de nifurtimox o benznidazol, por lo cual se realizó un estudio de modelado molecular para definir el posible mecanismo, el cual sugirió la inhibición de la tripanotión reductasa como uno de los posibles mecanismos implicados en la acción tripanocida [18].



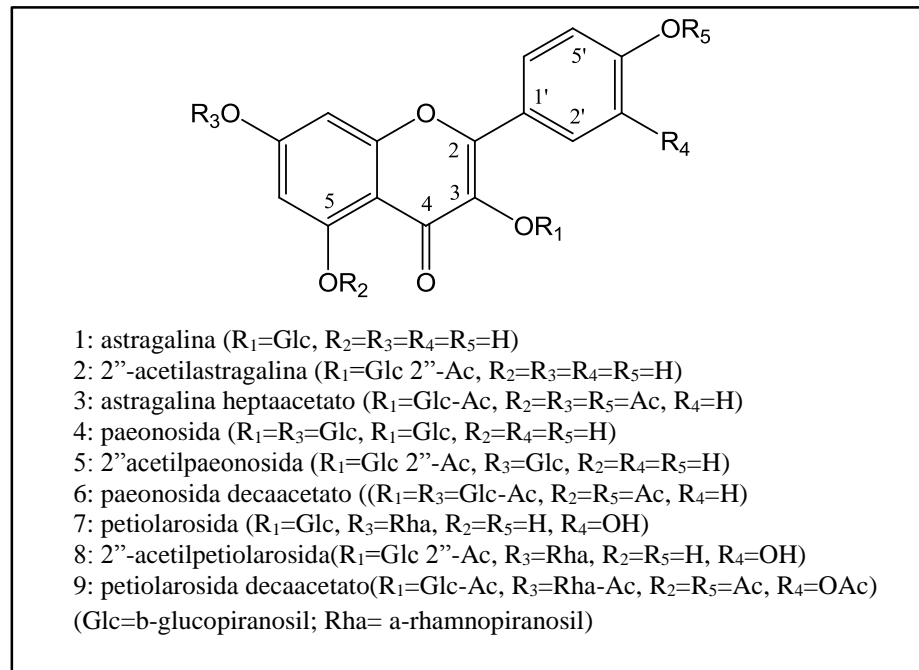
**Figura 5:** Con las letras (A) y (B) se representa a los derivados 7-nitroquinolina-2-onas.

Coa J.C. y cols. (2015) sintetizaron una serie de híbridos hidrazona-quinolina (Fig. 6), en los cuales se evaluó la actividad en *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y macrófagos. Resultando tener alta capacidad tripanocida y leishmanicida. Destacando el compuesto 6a el cual mostró mejor actividad contra *T. cruzi*, incluso mejor que el fármaco Benznidazol. La actividad antiparasitaria y la selectividad mostrada por estos compuestos sugieren que tienen alto potencial como agentes antiparasitarios. La presencia de una quinolina 2-sustituida o isoquinolina y grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático aumenta la actividad leishmanicida [19].



**Figura 6:** Estructura química de una serie de híbridos Hidrazona-quinolina, en estudio de la actividad antiparasitaria.

Por otra parte, existe una gran variedad de moléculas antioxidantes con actividad antiparasitaria. Los flavanoles como la catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina y algunos de sus galatos se han estudiado como potenciales agentes tripanocidas, mediante la inhibición de la actividad de la carboxilasa de acetyl-CoA en *T. brucei* [20]. Una actividad similar se informó en *Leishmania amazonensis*, la cual sugiere que flavonoides actúan a través de un colapso mitocondrial, esto debido a la disminución en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) [21]. Por otro lado, nueve flavonoides aislados (figura 7), fueron capaces de disminuir significativamente el contenido de *T. cruzi* en ratones, después de 40 días de post-tratamiento, durante la fase aguda de la infección [22].

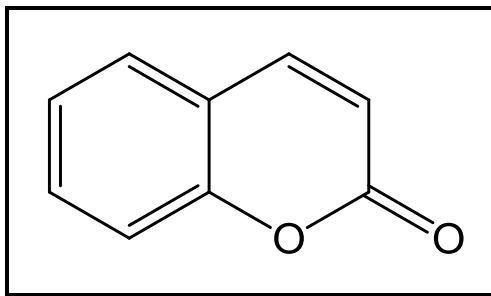


**Figura 7:** Nueve flavonoides aislados de la planta *Delphinium staphisagria*.

Junto a los flavonoides, se han probado varios antioxidantes como agentes anti-protozoarios. Existe una amplia demostración de la actividad antiparasitaria de derivados de chalconas [23], estilbenoides [24], curcuminas [25] y lignanos [26] contra los principales parásitos protozoarios, incluyendo *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Dentro de los compuestos análogos de flavonoides, existen las cumarinas, las cuales también han sido objeto de estudio.

## 1.5. Cumarinas.

Las cumarinas son compuestos naturales que se encuentran principalmente en frutas [27] y semillas [28]. Su estructura principal se compone de un anillo de benceno condensado a un anillo de pirona, con un grupo carbonilo en la posición 2 (Figura 8) [29].



**Figura 8:** Estructura química de la cumarina (2H-cromen-2-ona o 2H-benzopiran-2-ona)

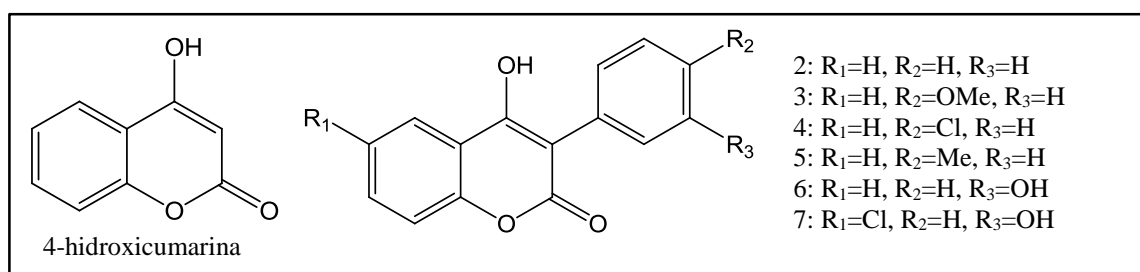
La mayoría de los estudios farmacológicos y bioquímicos se han hecho sobre la cumarina y su principal metabolito, 7-hidroxycumarina [30,31]. Sin embargo, otros derivados de esta benzopirona son de interés, ya que varios trabajos describen diferentes cumarinas como anticancerígenas [32], anti-inflamatorias [30], antibacterianas [33], antivíricas [34], antituberculosas [35] y como agentes antioxidantes [36-38]. También se realizaron estudios

de relación estructura-actividad, donde se dedujo que los derivados de cumarina con un grupo hidroxilo en la posición 4, tienen actividad anticoagulante, espasmolítica, anti-inflamatoria y antiviral [39-41]. Además, 5-hidroxicumarina, 7-hidroxicumarina, piranocumarina y 7,8-dihidroxi-4-metil-cumarina son activos contra el cáncer de mama [42] y la leucemia [43]. Además, la presencia del grupo catecol y el anillo alfa-pirona contribuyen significativamente al aumento de la actividad antioxidante de estos compuestos [44,45].

Debido al papel que pueden desempeñar las cumarinas en diversas áreas, la síntesis, caracterización y estudio de sus derivados son temas de interés en la actualidad. En nuestro grupo de investigación, diferentes cumarinas se han sintetizado y evaluado como agentes antioxidantes y tripanocidas.

Pérez-Cruz F. y cols. (2012) sintetizaron una serie de seis derivados de 4-hidroxicumarina e isómeros de quercetina (Figura 9), con el objetivo de evaluar la actividad tripanocida contra *T. cruzi*. Solo tres compuestos de la serie tenían una actividad apreciable, pero menor que nifurtimox; sin embargo, se demostró que tienen buena capacidad antioxidante, la cual se vio

afectada por la introducción de un grupo fenilo en la posición C<sub>3</sub>. Además, cuando un sustituyente con efecto donador de electrones se posiciona en el grupo fenilo, la capacidad antioxidante aumentó [46].

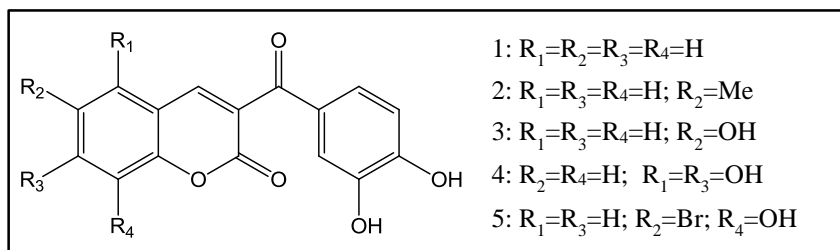


**Figura 9:** 4-hidroxicumarina y 4-hidroxi-3-arilcumarinas con actividad antioxidante.

Vázquez-Rodríguez S. y cols. (2013) sintetizaron una serie de híbridos cumarina-chalcona (Fig. 10), presentando una buena actividad antioxidante, obteniendo mejores valores de ORAC-FL que la quercetina y la catequina (compuestos de referencia). La actividad tripanocida fue evaluada en la forma epimastigote de *T. cruzi*. Todos los compuestos presentaron actividad tripanocida moderada. Sin embargo, estos compuestos tienen una actividad menor que nifurtimox. Vale la pena mencionar que las moléculas con actividades tripanocidas más altas mostraron un índice de ORAC-FL inferior,



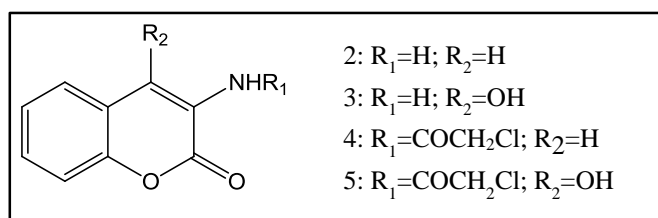
que puede ser una clave en la comprensión del mecanismo de acción de los compuestos sobre el *T. cruzi* [23].



**Figura 10:** Derivados de hidroxi-3-arilcumarinas con actividad antioxidante y antiparasitaria.

Figuroa-Guñez R. y cols. (2013) describió la síntesis y caracterización de una serie seleccionada de derivados de cumarina (Fig. 11) con el fin de evaluar sus propiedades antioxidantes y su actividad contra *T. cruzi*. Los resultados indicaron que estas moléculas tenían mejores valores ORAC-FL que el estándar, Trolox. La presencia del hidroxilo en posición 4 en la cumarina resultó en un aumento de la actividad antioxidante. Los resultados de REE demostraron reactividad contra el radical hidroxilo para todos los compuestos. Un resultado interesante es que los compuestos con alta capacidad antioxidante determinada por el ensayo ORAC-FL también presentan alta reactividad contra el radical hidroxilo. Finalmente, se concluyó

que la presencia conjunta de un grupo hidroxilo en la posición 4 y de un grupo amino en la posición 3, aumenta el valor de ORAC-FL y la actividad tripanocida, la cual se explica por un mecanismo de inhibición en la función mitocondrial del *T. cruzi* [47].

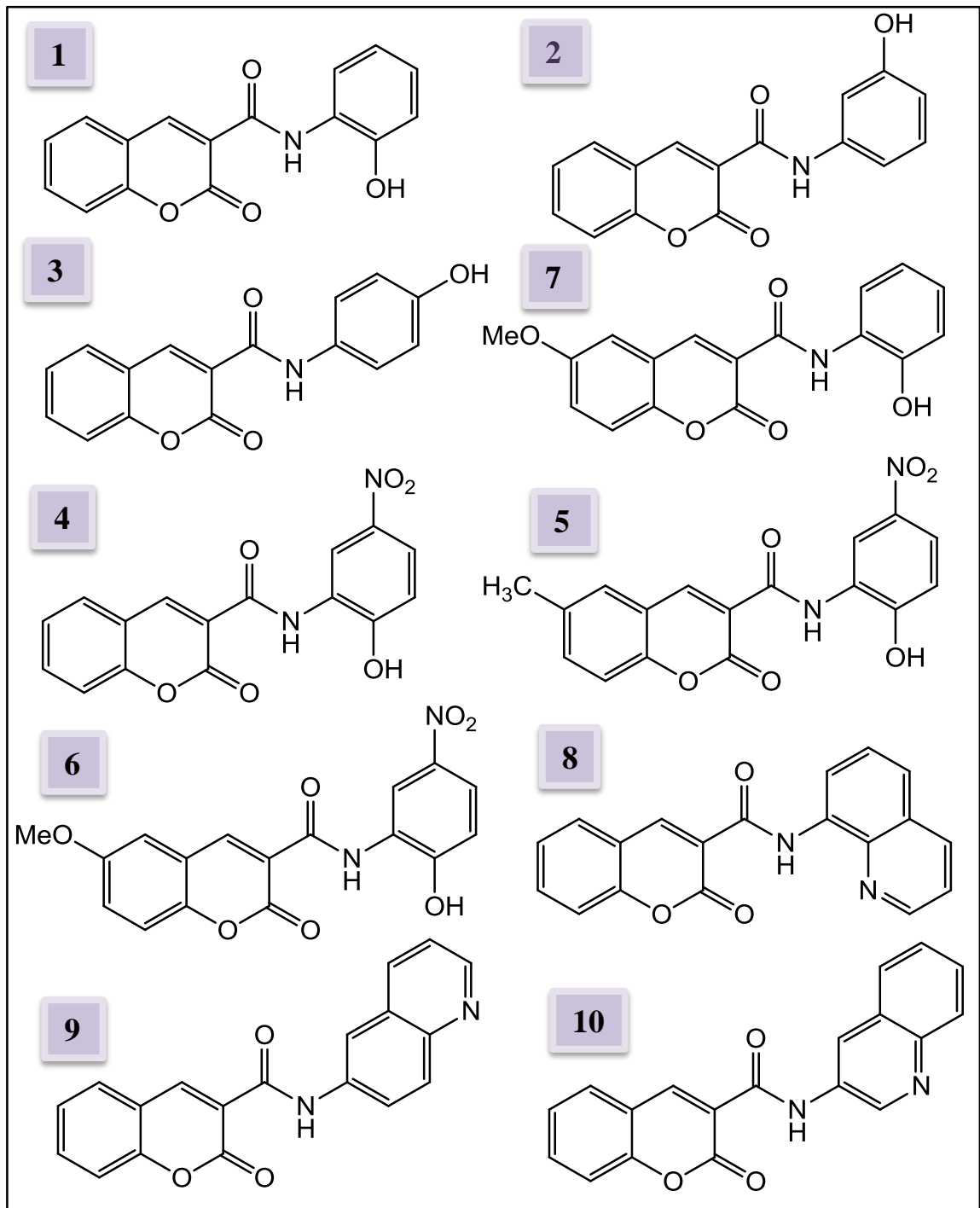


**Figura 11:** Derivados de cumarinas, 3-amido/carbamatocumarinas con actividad antioxidante y antiparasitaria.

De acuerdo a los antecedentes presentados, se concluye que las cumarinas tienen un alto potencial antioxidante y tripanocida, pero es necesario profundizar en el conocimiento de cómo la introducción de grupos hidroxilos fenólicos, grupo nitro o quinolina, en el esqueleto de la cumarina, alteran su actividad antioxidante y antiparasitaria, respectivamente. Por ello se planteó estudiar una nueva familia de compuestos derivados de cumarina que se presenta en la figura 12.

Estos compuestos fueron sintetizados y caracterizados en el laboratorio del Dr. Eugenio Uriarte de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

## Moléculas estudiadas



**Figura 12:** Estructura química de N-aryl amido cumarinas.

Número de molécula	Nombre IUPAC
1	N-(2-hidroxifenil)-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
2	N-(3-hidroxifenil)-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
3	N-(4-hidroxifenil)-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
4	N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
5	N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-6-metil-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
6	N-(2-hidroxi-5-nitrofenil)-6-metoxi-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
7	N-(2-hidroxifenil)-6-metoxi-2-oxo-2H-cromona-3-carboxamida
8	2-oxo-N-(quinolin-8-il)-2H-cromona-3-carboxamida
9	2-oxo-N-(quinolin-6-il)-2H-cromona-3-carboxamida
10	2-oxo-N-(quinolin-3-il)-2H-cromona-3-carboxamida

## **2. HIPÓTESIS**

De acuerdo a los antecedentes previos:

La presencia de grupos hidroxilos fenólicos y las diferentes posiciones de ellos, permitiría mejorar la capacidad antioxidante del esqueleto cumarínico. Por otro lado, la estructura base de la cumarina y la incorporación de nuevos grupos funcionales, como la quinolina y grupo nitro, permitiría mejorar la actividad tripanocida.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General.**

Evaluar la capacidad antioxidante y actividad tripanocida de los compuestos N-aril amido cumarinas, mediante diversas técnicas.

### **3.2. Objetivos Específicos.**

1. Estudiar el comportamiento anódico y catódico de la familia de cumarinas, utilizando voltametría cíclica en medio aprótico.
2. Caracterizar las posibles especies radicalarias generadas en voltametría cíclica a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).
3. Evaluar la capacidad antioxidante de la familia de cumarinas a través de la técnica de spin trapping y REE mediante la generación del radical hidroxilo y radical anión superóxido.
4. Determinar la actividad antioxidante a través del ensayo ORAC-FL, para la familia en estudio.
5. Evaluar la actividad tripanocida selectiva en epimastigotes y tripomastigotes, utilizando la metodología de reducción de MTT.
6. Detectar los posibles radicales libres generados por las cumarinas en un medio parasitario en el estadio epimastigote, por medio de REE.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Estudio electroquímico.

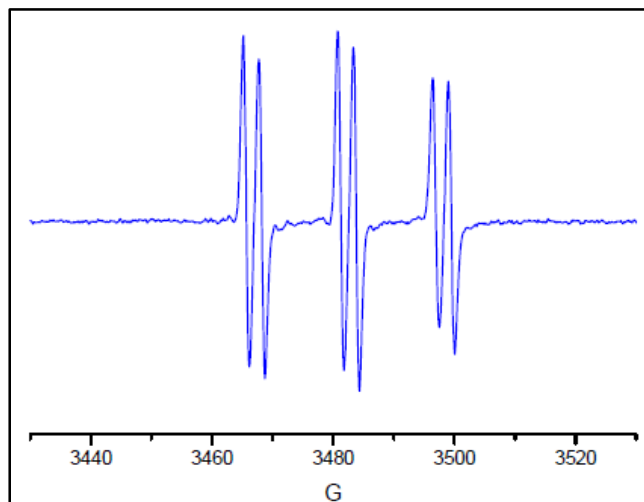
Se estudiaron los mecanismos de oxidación y reducción de los compuestos N-aril amido cumarinas, mediante voltametría cíclica (VC). El estudio se realizó utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) y perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito soporte. Se trabajó a concentraciones de muestra de 1 mM y de 0,1 M de electrolito de soporte. Los barridos se efectuaron a velocidades entre 100 y 2500 mV/s. Además, se utilizó un electrodo auxiliar de carbón y como electrodo de referencia Ag/AgCl con una solución saturada de KCl 3 M. El electrodo de trabajo fue de carbón vítreo para evaluar oxidaciones y electrodo de gota colgante de mercurio para evaluar reducciones.

En el caso de las reducciones se trabajó bajo una atmósfera de nitrógeno, en las condiciones antes señaladas.



## 4.2. Caracterización de las especies radicalarias generadas a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).

Las especies radicalarias fueron generadas a los potenciales obtenidos en voltametría cíclica, es así que se realizó una oxidación electrolítica *in situ* utilizando las mismas condiciones que para los estudios de voltametría cíclica, es decir disolviendo los compuestos en DMSO, agregar PTBA como electrolito de soporte. Para la detección de los radicales formados en la oxidación, se utilizó el *spin-trap* PBN (Fig. 12).



**Figura 13:** Espectro con patrón hiperfino característico del *spin-trap* PBN, cuando reacciona con un radical centrado en carbono.

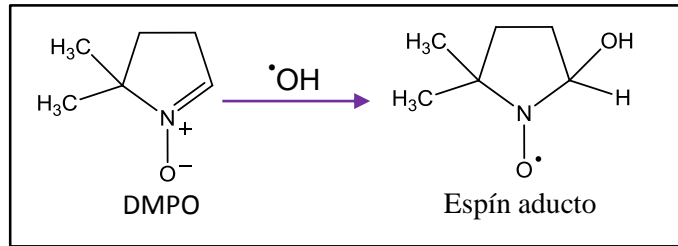
Los espectros de REE fueron registrados usando un espectrómetro Broker ECS 106 de banda X (9,8 GHz) equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

### **4.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

#### **4.3.1. Reactividad frente a radicales libres**

##### **4.3.1.1. Reactividad frente a radical hidroxilo**

La capacidad de reacción del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) con los compuestos estudiados, fue determinada mediante medidas de REE. El ensayo se basa en la competencia entre un agente atrapador (*spin trap*) y los compuestos, por la especie reactiva. Se utilizó DMPO como atrapador (Fig. 14). Para obtener el valor de *scavenging* del radical hidroxilo, se utiliza como control la mezcla de la solución sin el antioxidante, posteriormente al agregar los compuestos en estudio, se calcula la disminución en la intensidad de las líneas hiperfinas (Fig. 15).



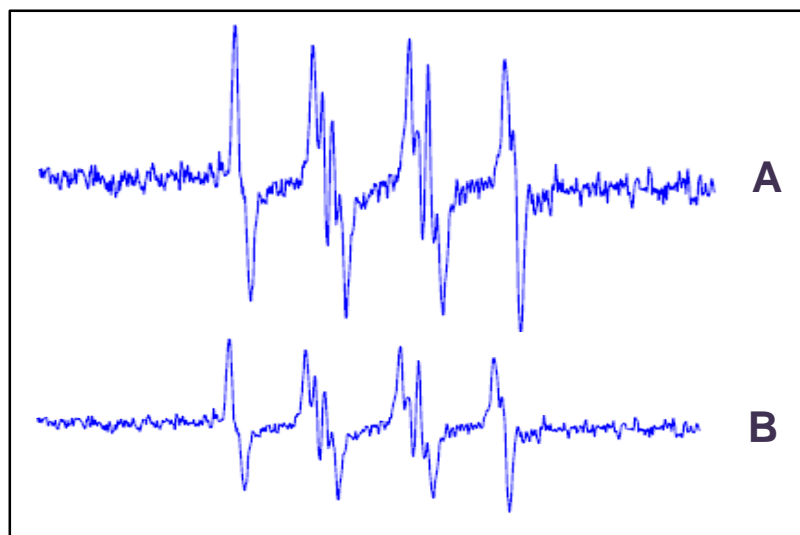
**Figura 14:** Reacción entre el 5,5-dimetil-1-pirrolin N-oxido (DMPO) y el radical hidroxilo, con formación de un espín aducto (DMPO-OH).



**Figura 15:** (A) Espectro REE del atrapamiento del radical hidroxilo por DMPO en ausencia de antioxidante. (B) Espectro REE con adición de compuesto antioxidante.

#### 4.3.1.2. Reactividad frente a radical anión superóxido

La capacidad de reacción del radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) con los compuestos estudiados, fue determinada mediante medidas de REE. El ensayo se basa en la competencia entre un agente atrapador (*spin trap*) y los compuestos, por la especie reactiva. Se utilizó DMPO como atrapador. Para obtener el valor de *scavenging* del radical anión superóxido, se utiliza como control la mezcla de la solución sin el antioxidante, posteriormente al agregar los compuestos en estudio, se calcula la disminución en la intensidad de las líneas hiperfinas (Fig. 16).

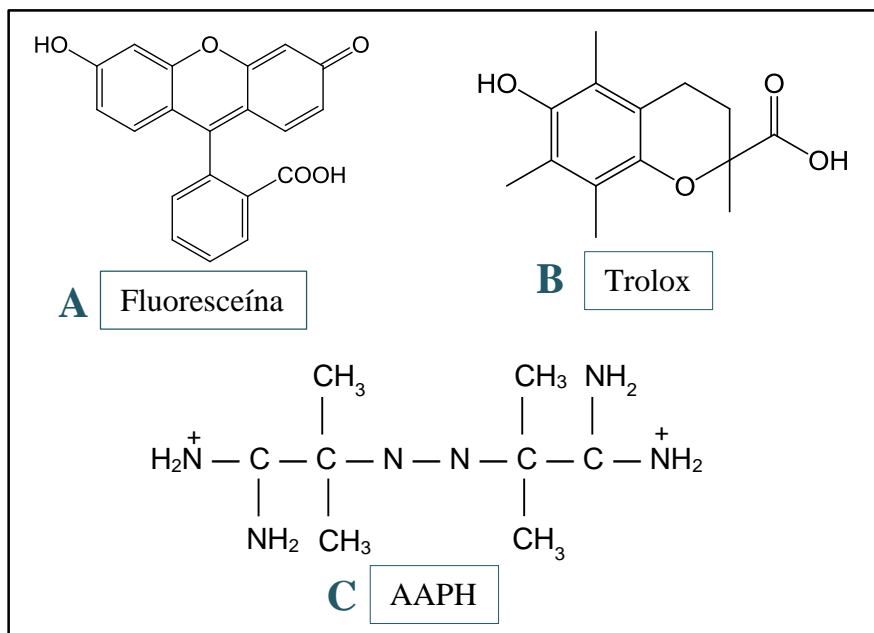


**Figura 16:** (A) Espectro REE del atrapamiento del radical anión superóxido por DMPO en ausencia de antioxidante. (B) Espectro REE con adición de compuesto antioxidante.

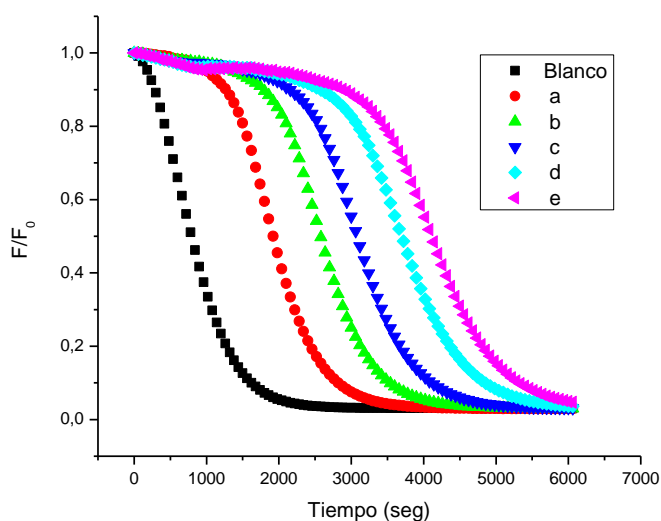
### 4.3.2. Ensayo ORAC-FL.

Se determinó el índice ORAC mediante el ensayo ORAC-FL, técnica correspondiente a un ensayo de competencia por una especie sonda, la cual es Fluoresceína (FL), cuya disminución de intensidad de emisión a 585 nm es monitoreada mediante fluorescencia. Los radicales peroxilo (especie reactiva) son obtenidos a partir de la termólisis del compuesto AAPH, el cual oxida a la sonda. Se determinó un índice, el cual es relativo a una molécula estándar, llamada Trolox. Sus estructuras químicas están representadas en la figura 17.

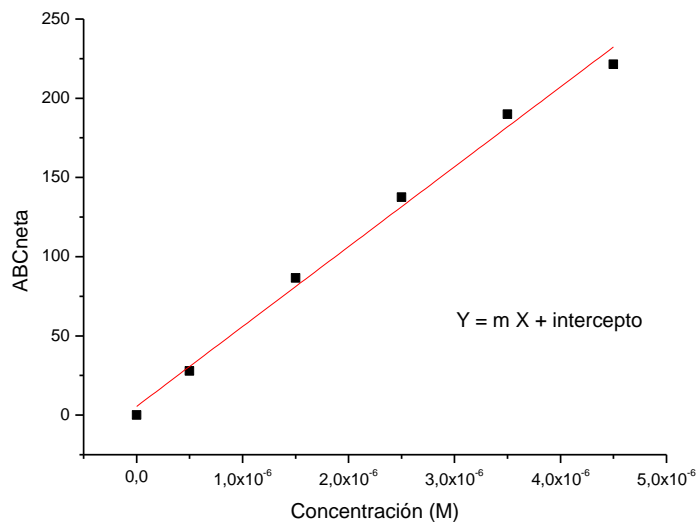
Al consumirse la molécula sonda FL, asociado a su incubación en presencia de AAPH, se obtienen las medidas de fluorescencia (F). El valor  $(F/F_0)$  fue graficado en función del tiempo (segundos) (Fig. 18). Posteriormente se obtuvo la integración del área bajo la curva (ABC), este valor vs la concentración es graficado (Fig. 19), obteniéndose una curva de regresión lineal, en la cual la pendiente (m) es utilizada para obtener el índice ORAC-FL (Ecuación 1). Todos los compuestos en estudios fueron realizados en triplicado ( $n=3$ ).



**Figura 17:** Estructura química de los compuestos necesarios en el estudio de ORAC-FL. [A] **Fluoresceína** (ácido 2-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il) benzoico). [B] **Trolox** (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). [C] **AAPH** (2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)).



**Figura 18:** Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluoresceína versus el tiempo, a distintas concentraciones de antioxidante (a,b,c,d,e) y el blanco que no posee compuesto.



**Figura 19:** Ejemplo del área bajo la curva neta (ABC<sub>neta</sub>) versus la concentración (M). Donde *m* representa la pendiente de la curva.

$$\text{Índice ORAC} - FL = \frac{m \text{ antioxidante}}{m \text{ Trolox}}$$

**Ecuación 1:** Determinación del índice ORAC-FL.

## **4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA EN *T. cruzi***

### **4.2.1. Estudio de la actividad en epimastigotes Dm28c.**

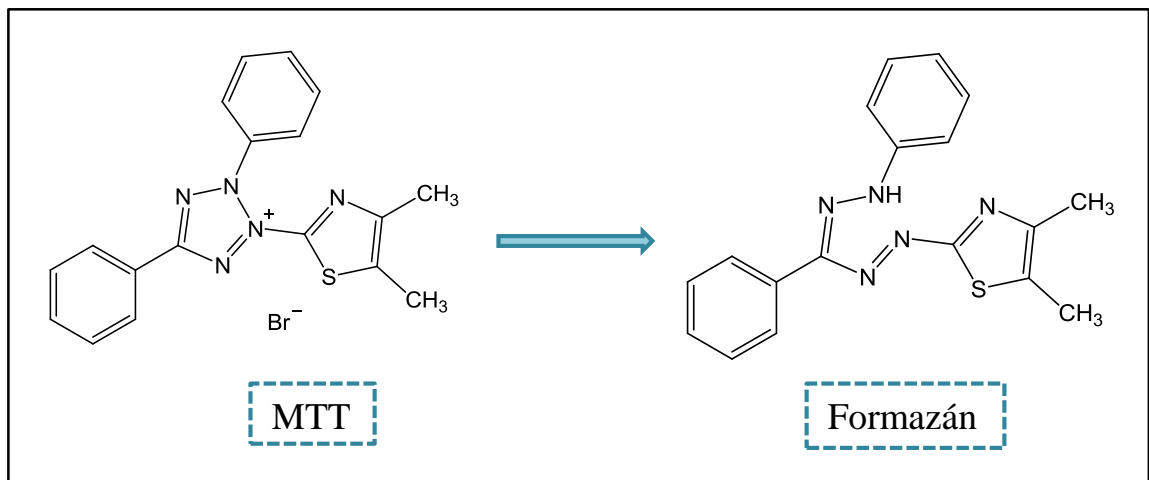
La actividad tripanocida de los compuestos en estudio fue evaluada en epimastigotes, clon Dm28c. En este estudio se analizó el efecto de los compuestos estudiados sobre la viabilidad celular mediante la reducción de bromuro de tetrazolio (MTT) (Fig. 20), además se utilizó metosulfato de fenazina como transportador de electrones. Los parásitos, fueron obtenidos de la colección del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los epimastigotes fueron mantenidos a 28°C en medio de cultivo Diamond, que a su vez contiene hemina. Se agregó suero bovino fetal (SFB) a una concentración final de 5%.

Los compuestos en estudio fueron disueltos en DMSO y luego fueron agregados a  $3 \times 10^6$  parásitos  $\text{mL}^{-1}$ , a diferentes concentraciones entre 0,5  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  (para realizar  $\text{IC}_{50}$ ) en medio de cultivo RPMI 1640 (no tiene SBF). Se incubaron durante 24 h a 28 °C. La concentración final de DMSO fue menor al 0,1% v/v. Se utilizó nifurtimox como control positivo.



Posteriormente, se agregó MTT en una concentración final de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, e incubó a 28°C por 4 h. Luego, el formazán producido fue solubilizado con 10% SDS/0,1 mM HCl durante toda la noche.

Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (AsysExpert Plus©, Austria). La absorbancia es directamente proporcional al número de parásitos viables al momento de agregar el MTT. Los parásitos no tratados fueron usados como control (100% de viabilidad). Los resultados se presentaron como el porcentaje de epimastigotes vivos respecto del control.



**Figura 20:** Reducción metabólica del MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) a sales formazán, por células vivas.

#### **4.2.2. Estudio de la actividad en tripomastigotes Dm28c.**

Células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde) fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Al alcanzar un 70% de confluencia, las células Vero fueron infectadas con tripomastigotes Dm28c en una relación 1:3 (célula/parásito). Estos tripomastigotes fueron obtenidos inicialmente de cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratones chagásicos. Los cultivos de células Vero infectadas se mantuvieron durante 5 a 7 días, con cambio diario de medio de cultivo. Al término de este período, se extrajo el sobrenadante y centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos con el fin de separar restos celulares de los parásitos. A continuación, el sobrenadante resultante se centrifugó a 3000 RPM para obtener un concentrado de tripomastigotes, el cual fue suspendido en medio RPMI. El contenido de tripomastigotes se determinó mediante recuento manual bajo visualización al microscopio empleando una cámara de Neubauer. Se incubaron  $1 \times 10^7$  parásitos/mL en medio de cultivo RPMI 1640 libre de SBF a 37°C durante 24 h con o sin los compuestos estudiados y utilizando nifurtimox como control positivo. Posteriormente, se determinó la viabilidad de los parásitos mediante el método de reducción de MTT como se describió previamente.

#### **4.2.3. Determinación de la citotoxicidad en células de mamífero.**

Para determinar el efecto de los compuestos estudiados sobre macrófagos (RAW 264.7), se analizó el efecto de los compuestos estudiados sobre la viabilidad celular mediante la reducción de bromuro de tetrazolio (MTT). Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. Se sembraron placas de 96 pocillos con 50000 células RAW 264.7 por pocillo, en medio de cultivo RPMI 1640 libre de SBF y con los compuestos disueltos en DMSO a concentraciones finales que varían entre 1  $\mu$ M y 200  $\mu$ M (para realizar IC<sub>50</sub>). La concentración final de DMSO fue menor al 0,1% v/v, que no es tóxica para las células. Los compuestos se incubaron por 24 h a 37°C, en un ambiente con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este periodo se agregó MTT con una concentración final de 0,5 mg/mL. Luego, el formazán producido fue solubilizado con 10% Sulfato Dodecil de Sodio (SDS)/0,1mM HCl e incubado durante toda la noche.

#### **4.2.4. Detección de radicales libres en parásitos epimastigote de *T. cruzi*, mediante REE.**

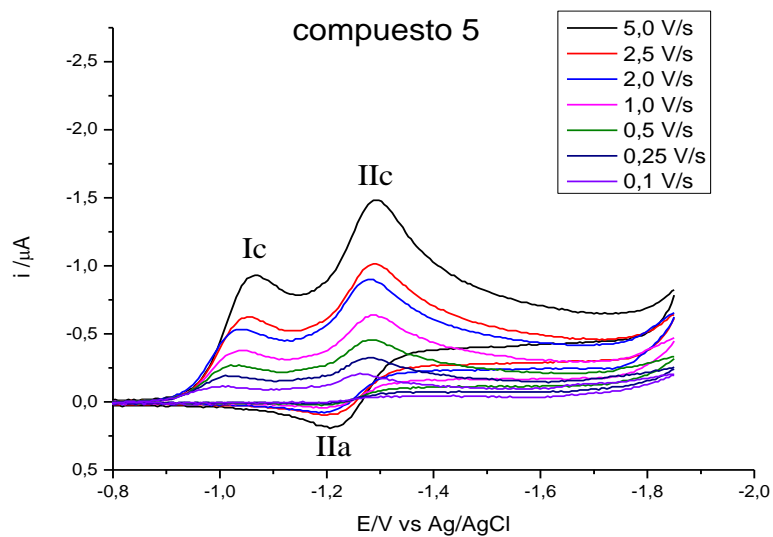
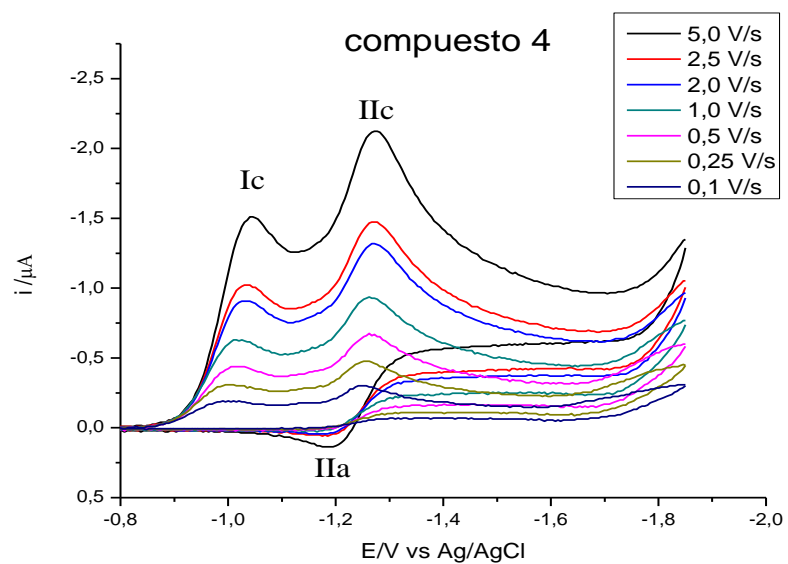
El estudio de REE con generación biológica de radicales libres se realizó en medio DMSO, con NADPH, parásitos en fase epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, *spin trap* DMPO y los compuestos estudiados. Se registró un control el cual tenía el medio DMSO, NADPH y DMPO en ausencia de N-aril amido cumarinas, en el que se evidenció la ausencia de generación especies radicalarias por parte del sistema parasitario. Posteriormente, se agregaron los compuestos estudiados.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Estudio electroquímico**

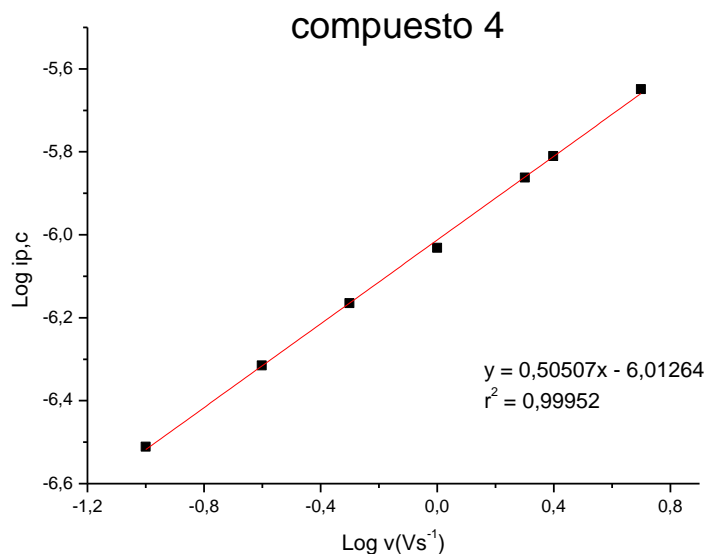
#### **5.1.1. Estudio del comportamiento catódico de la familia de cumarinas, utilizando voltametría cíclica en medio aprótico.**

Para determinar el comportamiento electroquímico de los compuestos que presentan grupo nitro en su estructura (4, 5 y 6), mediante voltametría cíclica, se realizaron barridos de potencial a distintas velocidades en el rango de las reducciones. Los compuestos presentaron un comportamiento electroquímico similar, como se puede apreciar en los voltamogramas de la figura 21.



**Figura 21:** Voltamogramas cíclicos de los compuestos 4 y 5. Realizados a distintas velocidades de barrido, entre 0,1 V/s a 5,0 V/s.

Para determinar si el proceso es controlado por un fenómeno de adsorción o difusión, se graficó  $\log i_{p,c}$  versus  $\log v$ , donde el valor de la pendiente indica el proceso involucrado. Para procesos controlados por difusión, este valor es cercano a 0,5 y para procesos controlados por adsorción, el valor es cercano a 1. En el caso de los compuestos 4, 5 y 6 los valores de las pendientes fueron de 0,5. En la figura 22 se muestra el gráfico del compuesto 4, a modo de ejemplo, por lo cual se demuestra que el proceso es controlado por difusión sin interferencias adsorptivas en el electrodo de trabajo [48].



**Figura 22:** Gráfico Log  $i_{p,c}$  versus log  $v$  del compuesto 4.

La diferencia de los potenciales catódicos y anódicos es mayor que 60 mV para todas las velocidades de barrido, lo que indica que el proceso de transferencia de carga monoelectrónica es cuasi-reversible para la cupla II (Tabla 1).

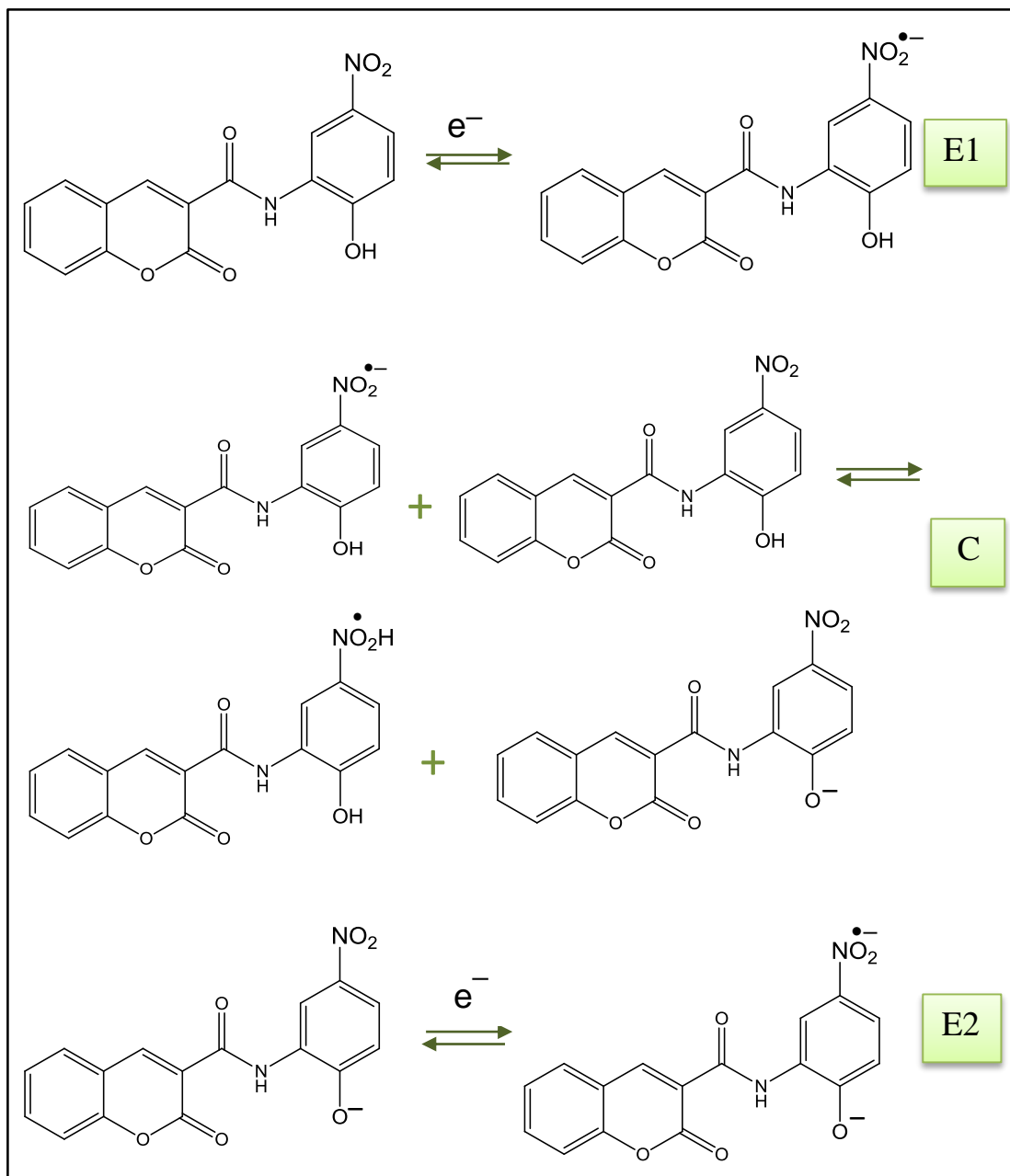
**Tabla 1.** Parámetros característicos de VC en DMSO, a velocidad de barrido 2,5 V/s.

Compuesto	Ep,a (V)	Ep,c (V)	$\Delta E_p$ (V)	ip,a/ip,c
4	-1,20	-1,28	0,08	0,07
5	-1,20	-1,29	0,09	0,10
6	-1,22	-1,29	0,07	0,15

En los voltamogramas de los compuestos 4, 5 y 6 se observa la presencia de dos picos de reducción y uno de oxidación. Un pico catódico Ic (alrededor de -1,05 V) correspondiente a la generación del radical anión nitro ( $HORNO_2^-$ ) y una cupla a potenciales más negativos (Ic/IIa, alrededor de -1,2 V) (Fig. 20), correspondiente a la reducción de la especie aniónica ( $^-ORNO_2$ ), generada a través de una reacción de autoprotonación. Este mecanismo corresponde al tipo ECE (Electrochemical-Chemical-Electrochemical).

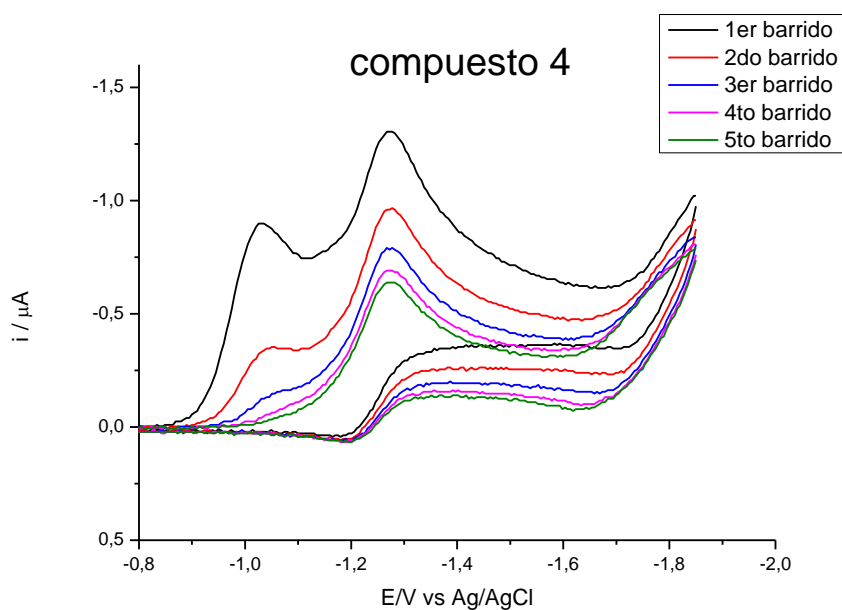


El mecanismo de autoprotónación propuesto para estos compuestos corresponde a un equilibrio ácido-base en medio aprótico (Fig. 23). Este tipo de comportamiento es típico de nitro-compuestos con hidrógenos lábiles en su estructura [18, 49-50]. En una primera etapa electroquímica, ocurre la reducción del grupo nitro generándose la especie radical anión. En la segunda etapa, ocurre la transferencia de un protón lábil al radical anión generándose el radical nitro protonado (neutro). En la última etapa electroquímica, la especie desprotonada, producto de la etapa anterior, es reducida formando el radical anión nitro.



**Figura 23:** Mecanismo de autoprotónación ECE propuesto para los compuestos 4, 5 y 6. (Representación del compuesto 4)

Al realizar barridos sucesivos de los compuestos se puede observar que las cuplas no se solapan al pasar de un barrido al siguiente, a modo de ejemplo se observa el compuesto 4 (Fig. 24), lo que indica que existe un acoplamiento de una reacción química con el proceso electroquímico involucrado [51].

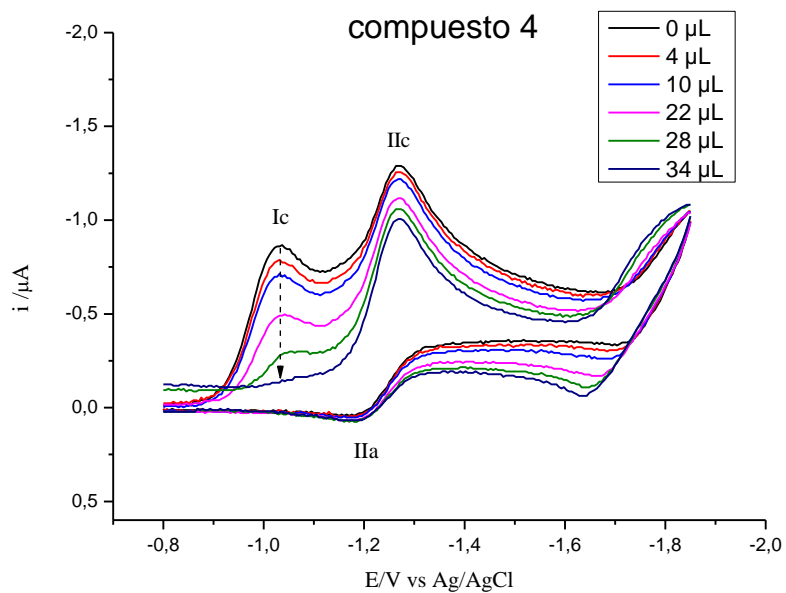


**Figura 24:** Voltamograma de barridos sucesivos del compuesto 4, a una velocidad de barrido de 2,5 V/s.

Con la finalidad de verificar el mecanismo de autoprotonación propuesto y determinar la presencia de un hidrógeno lábil en la estructura, se adicionaron cantidades crecientes de NaOH acuoso (0,1 M). La figura 25

muestra el voltamograma obtenido para el compuesto 4 (como ejemplo), en presencia de cantidades crecientes de NaOH (0,1 M).

Se observa que el pico  $I_c$  disminuye a medida que aumenta la concentración de NaOH en la solución. Esto demostraría que el mecanismo reductivo del primer pico  $I_c$ , implica la reducción de una especie ácida.



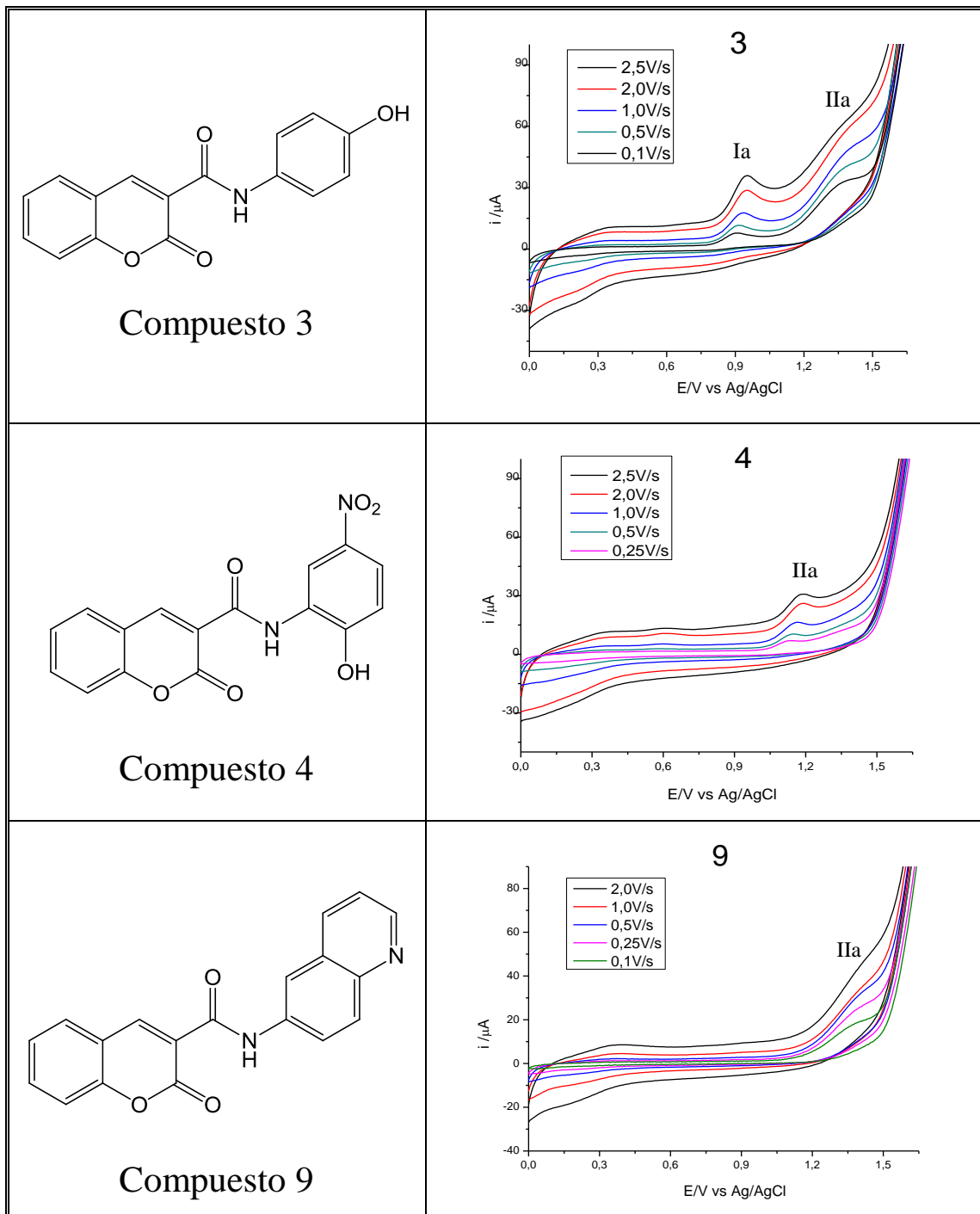
**Figura 25:** Voltamogramas del compuesto 4 en presencia de cantidades crecientes de NaOH 0,1 M (de 0  $\mu L$  hasta 34  $\mu L$ ), a una velocidad de 2,5 V/s.

### **5.1.2. Estudio del comportamiento anódico de la familia de cumarinas, utilizando voltametría cíclica en medio aprótico.**

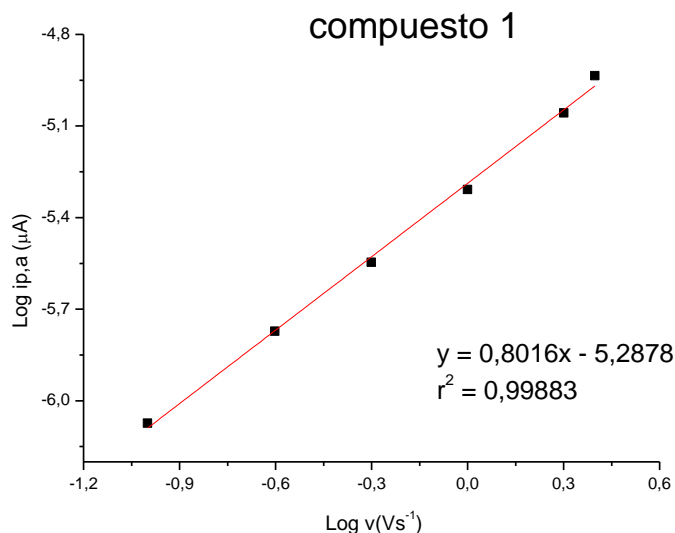
El potencial de oxidación es un parámetro que determina la energía necesaria para que un compuesto ceda electrones. Se ha estudiado la oxidación electroquímica de compuestos fenólicos (ácido salicílico, ácidos hidroxicinámicos, ácido cafeico, quercetina) utilizando voltametría cíclica. Los compuestos con potenciales bajos de oxidación muestran una actividad antioxidante mejor, que los que tienen potenciales mayores [52,53].

Para determinar el comportamiento electroquímico de los compuestos en estudio, mediante voltametría cíclica, se realizaron barridos de potencial a distintas velocidades de barrido. Los compuestos presentaron diverso comportamiento electroquímico, dependiente de su estructura química (Fig. 26), es así que los compuestos 1, 2, 3 y 7 son aquellos que poseen un grupo hidroxilo en la molécula y sin ningún grupo nitro, los compuestos 4, 5 y 6 son aquellos que poseen un grupo nitro en su estructura (además de un grupo hidroxilo) y finalmente los compuestos 8, 9 y 10 solo poseen una quinolina como sustituyente.

Para determinar si el proceso es controlado por un fenómeno de adsorción o difusión, se graficó  $\log i_{p,a}$  versus  $\log v$ , donde el valor de la pendiente indica el proceso involucrado. Para procesos controlados por difusión este valor es cercano a 0,5 y para procesos controlados por adsorción, el valor es cercano a 1 [48]. Los valores de las pendientes de las cumarinas en estudio se encuentran en el rango de 0,5 y 1,0, lo cual indica un proceso de control mixto (Fig. 27).



**Figura 26:** Voltamogramas cíclicos de algunos compuestos N-aril amido cumarina representativos, a diferentes velocidades de barrido, que varían entre 0,1 V/s y 2,5 V/s. Además las estructuras moleculares correspondientes a los voltamogramas.



**Figura 27:** Gráfico Log  $i_{p,a}$  versus log  $v$  del compuesto 1, representativo del resultado obtenido para las cumarinas en estudio.

Como era de esperar, las distintas N-aril amido cumarina presentaron diversos comportamientos electroquímicos, dependiendo de su estructura química.

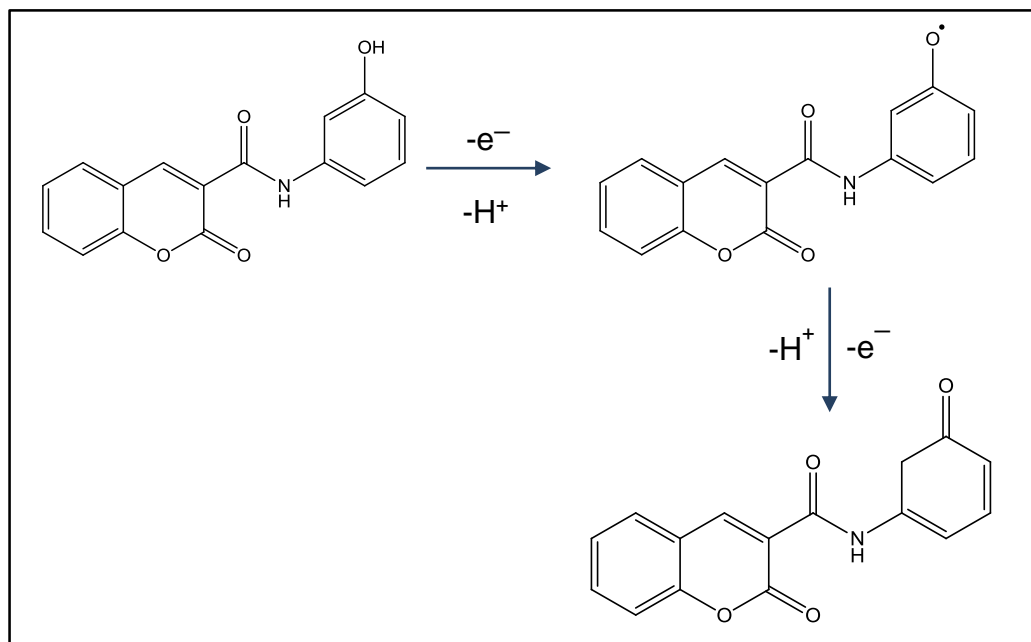
En los voltamogramas, se observó que algunos compuestos presentan dos picos anódicos irreversibles y en otros solamente uno. Los compuestos que presentaron dos picos anódicos irreversibles son el 1, 2, 3, y 7, este conjunto de derivados N-aril amido cumarina se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en el fenil, presente en estas moléculas.



Los compuestos 8, 9 y 10 no poseen grupos sustituyentes con hidrógenos lábiles, solo se encuentra presente junto a la estructura cumarínica y el grupo amido (presente en todas las moléculas), una quinolina en distintas posiciones. En los voltamogramas de estos derivados cumarínicos, se observa una señal a alto potencial.

Los compuestos 4, 5 y 6, poseen un grupo nitro y un hidroxilo en posición para el uno del otro, sustituidos en el fenil. En estos compuestos solo se observa una señal a alto potencial.

El mecanismo propuesto para la oxidación de los derivados de cumarinas es el representado en la figura 28, en el cual el hidroxilo pasa a la formación del carbonilo correspondiente, mediante un intermediario radicalario.



**Figura 28:** Mecanismo oxidativo propuesto para los compuestos monohidroxilados. Compuesto 2 como referencia.

**Tabla 2.** Potencial de oxidación de los compuestos N-aril amido cumarinas, que presentan picos anódicos irreversibles. Velocidad de barrido a 2,5 V/s.

Compuesto	$E_{p,aI}$ (V)	$E_{p,aII}$ (V)
<b>1</b>	0,68	0,98
<b>2</b>	0,60	1,10
<b>3</b>	0,92	1,36
<b>7</b>	0,72	1,04
<b>4</b>	-----	1,25
<b>5</b>	-----	1,20
<b>6</b>	-----	1,22
<b>8</b>	-----	1,45
<b>9</b>	-----	1,42
<b>10</b>	-----	1,48

De acuerdo a lo observado en la tabla 2 y en los voltamogramas, el primer pico anódico se atribuye a la oxidación del grupo hidroxilo y el segundo pico es atribuible a la oxidación de la amida.

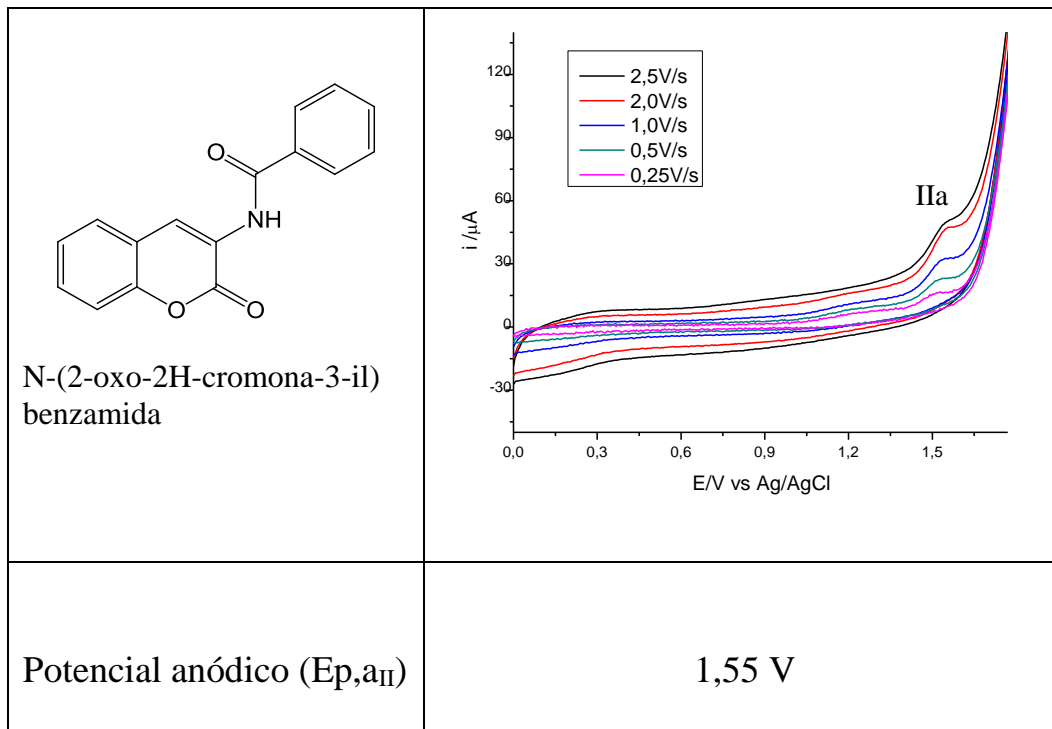
En el caso de la oxidación del grupo hidroxilo, el orden de menor a mayor potencial es:

$$2 < 1 < 7 < 3$$

El compuesto 2 es aquel que tiene menor potencial de oxidación, es decir, aquel que es más fácil de oxidar. Por otro lado los compuestos 1 y 7 tienen potenciales similares, esto debido a que son iguales estructuralmente menos el sustituyente metoxilo, presente en la posición 6 de la cumarina (en el compuesto 7). Finalmente el que tiene mayor potencial de oxidación es el compuesto 3, en el cual el grupo hidroxilo está en posición para a la amida, de la cumarina, la amida se considera un grupo dador de electrones, lo que hace que aumente la densidad electrónica del anillo, pero según lo observado estando en posición para, al hidroxilo hace que el hidrógeno de este sea menos lábil, siendo más difícil de oxidar.

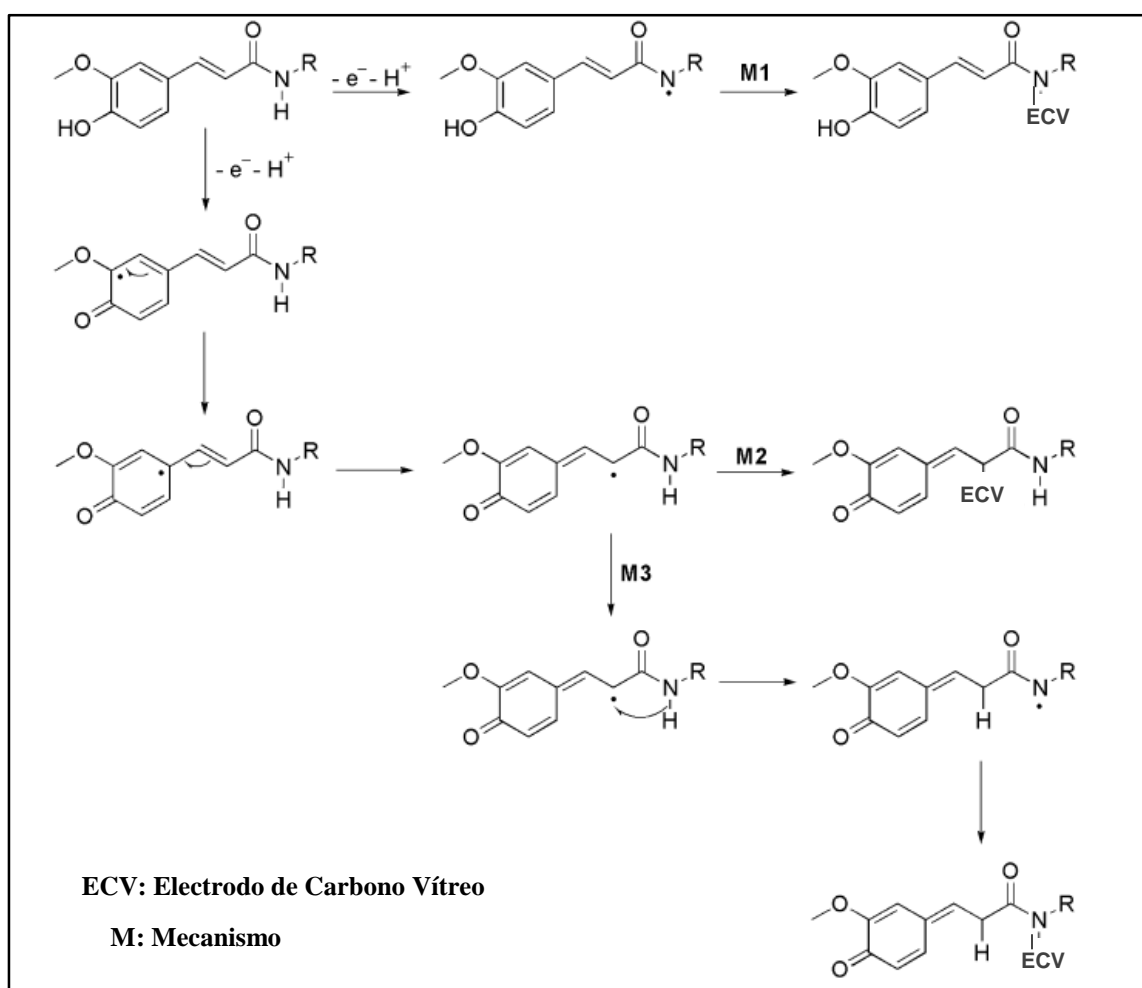
Por otro lado los compuestos que poseen grupo nitro en posición para al hidroxilo, no se observó el pico anódico correspondiente al grupo hidroxilo, por lo cual se deduce que el hidrógeno de este, no es lábil. Siendo que el grupo nitro al ser un electroatractor, disminuye la densidad electrónica favoreciendo la labilidad del protón, sin embargo según lo observado la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo y el carbonilo de la amida, es mayor, haciendo que este hidrógeno sea menos lábil, que cuando el grupo nitro no está presente, desfavoreciendo la oxidación.

Como se mencionó anteriormente el segundo pico anódico irreversible, se atribuye a la oxidación de la amida presente en todas las moléculas, está presente en todos los voltamogramas. Para corroborar que esta señal corresponda a la amida, el estudio se comparó a una molécula, la que solo posee un grupo amida oxidable como sustituyente de la cumarina. El voltamograma está representando en la figura 29. Se observa en el voltamograma una señal a alto potencial (1,55 V), valor cercano a los obtenidos en las moléculas 8, 9 y 10 (alrededor de 1,45 V) que coincidentemente se encuentra la amida en la estructura, sin grupo hidroxilo.



**Figura 29:** Voltamograma a distintas velocidades y potencial anódico del compuesto N-(2-oxo-2H-cromona-3-il) benzamida. El potencial anódico fue obtenido a la velocidad de 2,5 V/s.

En un estudio realizado por Sánchez A. y colaboradores (2014), sobre la oxidación electroquímica de amidas simétricas de ácido ferúlico en medio aprótico, se propone un mecanismo de oxidación de la amida y un proceso de adsorción en el electrodo de carbón vítreo (Fig. 30) [54].



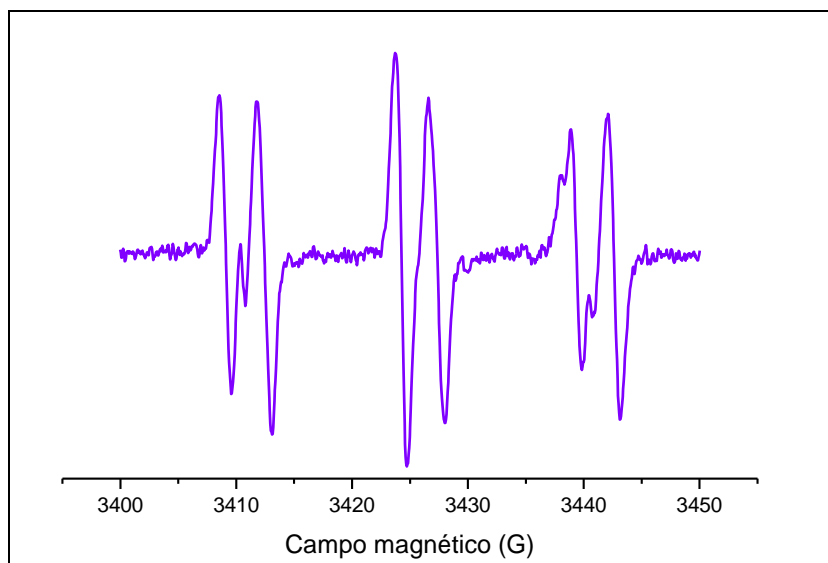
**Figura 30:** Mecanismos propuestos para explicar la oxidación de la amida y modificación química del electrodo.

## **5.2. Caracterización de las especies radicalarias generadas, a través de espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE).**

La oxidación electroquímica de los derivados de cumarina, se realizó bajo las mismas condiciones que en voltametría cíclica, (la metodología se explica con anterioridad), debido a que los radicales poseen cortos tiempos de vida media, es necesario usar un atrapador de espín, en este caso PBN.

En presencia de PBN se observó un espectro REE con un patrón de seis líneas (Fig. 31). Este patrón hiperfino puede ser explicado utilizando los valores de espín nuclear de hidrógeno y de nitrógeno presentes en PBN.

De esta manera, el núcleo de hidrógeno aporta con dos líneas hiperfinas y el núcleo de nitrógeno aporta con tres, dando como producto las seis líneas características del atrapamiento de un radical centrado en carbono con constantes hiperfinas ( $a_N \approx 15,2$ ;  $a_H \approx 3,3$  G), estos valores son muy similares a los reportados en la literatura ( $a_N \approx 14,4$ ;  $a_H \approx 3,3$  G) [55-56].



**Figura 31:** Espectro REE experimental del espín-aducto formado entre PBN y el radical libre que se genera por la oxidación electroquímica del compuesto 3.

Con este experimento se confirmó la formación de un radical proveniente de la oxidación electroquímica de estos compuestos, ya que como se mencionó anteriormente, el mecanismo propuesto de la oxidación del hidroxilo al carbonilo, conlleva la formación de una especie radicalaria.



### **5.3. Estudio de la reactividad frente a radicales libres**

#### **5.3.1. Estudio de la reactividad frente al radical hidroxilo.**

Para estudiar la reactividad de los compuestos representativos de cada grupo en estudio, frente al radical hidroxilo, se utilizó la técnica de *spin trapping*, la cual fue descrita anteriormente.

Para obtener el valor de *scavenging* o de atrapamiento del radical hidroxilo, se calculó la disminución de la intensidad de las señales, al adicionar los compuestos en estudio. Para este ensayo, se escogieron compuestos representativos de cada grupo, es así para los compuestos monohidroxilados se escogió el 3, para los compuestos que poseen el grupo nitro, el 5 y finalmente para los compuestos con quinolina en su estructura, el 9.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos de la reactividad de los compuestos N-aril amido cumarina escogidos, frente al radical hidroxilo. Se puede apreciar que todos presentaron reactividad frente al radical, aunque el porcentaje de atrapamiento varió entre los compuestos.

**Tabla 3.** Porcentaje de *scavenging* del radical hidroxilo.

Compuesto	% <i>scavenging</i> del radical $\cdot\text{OH}^1$
3	7,2
5	24,6
9	13,8

<sup>1</sup> El porcentaje de *scavenging* del radical hidroxilo fue calculado de acuerdo a la fórmula:  $\left(\frac{ABC\ control - ABC\ compuesto}{ABC\ control}\right) \times 100$ . Donde, ABC = área bajo la curva.

En la tabla 3, se observa que el compuesto 5 tiene un mayor porcentaje de atrapamiento del radical hidroxilo (mayor reactividad), lo sigue el compuesto 9 y finalmente el 3 (**5 > 9 > 3**).

El compuesto 5 es aquel que posee un grupo nitro en su estructura, este al ser un electroatractor, disminuye la densidad electrónica en el fenil, estabilizando el radical que se forma (cuando se oxida el grupo hidroxilo), al ser este radical más estable, favorece la reacción de oxidación por lo cual el hidrógeno es más lábil.

Por otro lado el compuesto 9 dio un porcentaje de *scavenging* mayor al compuesto monohidroxilado, esto se puede deber, a que el radical hidroxilo reacciona con la estructura de la quinolina y efectivamente

disminuye la capacidad de *scavenging*, porque la concentración de radical hidroxilo va disminuyendo y no por el apagamiento de este. Otra opción es que hidrógeno de la amida reaccionó con el radical, es decir, que tenga un grado de labilidad, sin embargo, si fuera este el caso, en el compuesto 3 se hubiera obtenido un porcentaje de *scavenging* similar o superior al encontrado.

### **5.3.2. Estudio de la reactividad frente al radical anión superóxido.**

Además, del estudio del radical hidroxilo se realizó otro estudio de reactividad frente al radical anión superóxido, con la finalidad de complementar el estudio.

Para obtener el valor de *scavenging* del radical anión superóxido, se calcula la disminución de la intensidad de las señales, al adicionar los compuestos en estudio. Para este ensayo se escogieron compuestos representativos de cada grupo, es así para los compuestos monohidroxilados se escogió el 3, para los compuestos que poseen el grupo nitro, el 5 y finalmente para los compuestos con quinolina en su estructura, el 9.

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos de la reactividad de los compuestos N-aril amido cumarina escogidos, frente al radical anión superóxido. Se puede apreciar que todos presentaron reactividad frente al radical, aunque el porcentaje de atrapamiento varía entre los compuestos.

**Tabla 4.** Porcentaje de *scavenging* del radical anión superóxido.

Compuesto	% <i>scavenging</i> del radical $O_2^{\bullet-}$
3	53,2
5	38,4
9	2,7

El porcentaje de *scavenging* del radical anión superóxido fue calculado de acuerdo a la fórmula:  $\left(\frac{ABC\ control - ABC\ compuesto}{ABC\ control}\right) \times 100$ . Donde, ABC= área bajo la curva.

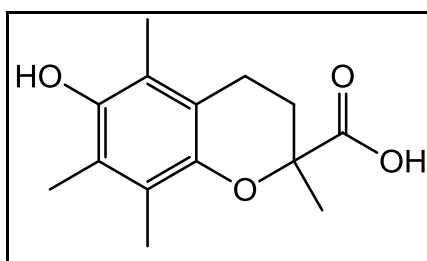
En la tabla 4, se observa que el compuesto 3 logró un mayor porcentaje de atrapamiento del radical superóxido, lo sigue el compuesto 5 y finalmente el 9 (**3 > 5 > 9**). En conclusión la cumarina hidroxilada tiene mayor reactividad con el radical libre, que el compuesto que no posee este grupo (9). Sin embargo el compuesto 5 que posee el grupo hidroxilo, tiene menor reactividad que el compuesto 3, la diferencia entre ambos es que el

compuesto 5 posee un grupo nitro en posición para en relación al hidroxilo, lo que en este caso disminuye la reactividad de este.

El ensayo de reactividad hacia el radical hidroxilo mostró diferente orden de reactividad de los compuestos que en el ensayo de reactividad con el radical anión superóxido. Con (**5 > 9 > 3**) en el primer caso y (**3 > 5 > 9**) en el segundo, por lo cual se observa que no hay una correlación entre el *scavenging* del hidroxilo y el del radical anión superóxido, ya que ambos radicales poseen características distintas. El tiempo de vida del radical hidroxilo es  $10^{-9}$  segundos y la del radical superóxido es  $10^{-3}$  segundos, como estos radicales son diferentes es posible tener diferentes reactividades con respecto a los compuestos estudiados.

#### 5.4. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL.

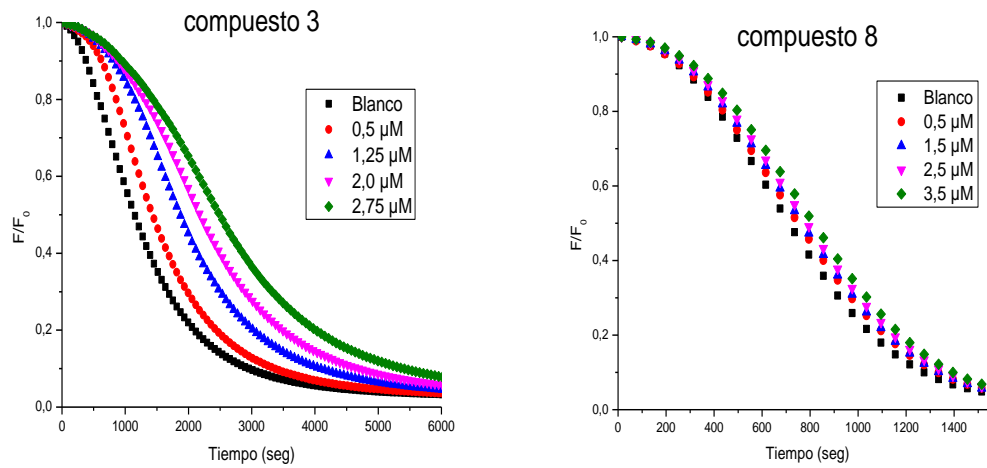
En esta metodología se obtuvo un índice relativo a la molécula estándar Trolox (Figura 32).



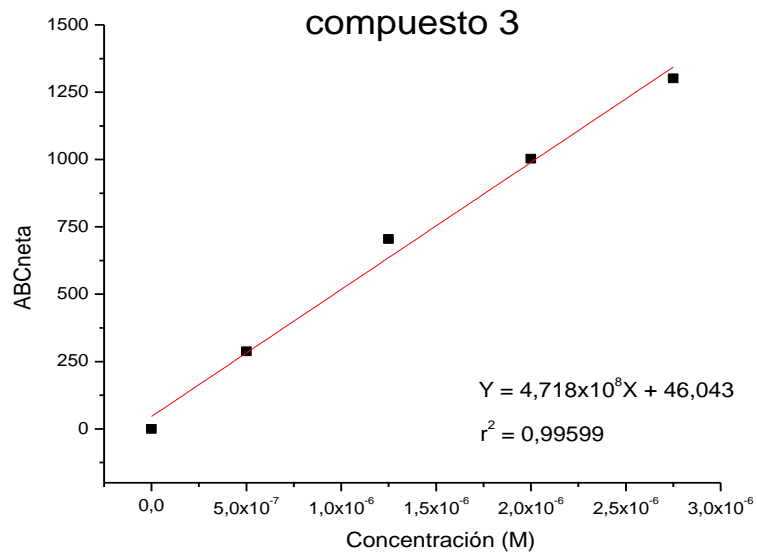
**Figura 32:** Estructura química del compuesto estándar Trolox.

Para el cálculo del índice ORAC-FL, se obtuvieron los perfiles cinéticos de la intensidad fluorescente de la fluoresceína a 585 nm versus tiempo de incubación, a diferentes concentraciones de los compuestos en estudio (figura 33). Posteriormente, la eficacia del antioxidante se evaluó mediante el cálculo del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia vs tiempo de incubación. Este valor es graficado en función de la concentración del antioxidante. Se obtuvo una curva de regresión lineal (figura 34), en la cual la pendiente (m) del antioxidante estudiado se divide por la pendiente de Trolox, obteniéndose como resultado de esto, el índice

ORAC-FL para los compuestos en estudio (Tabla 5).

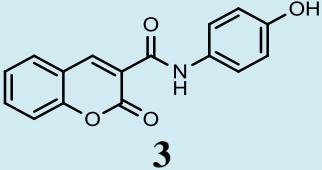
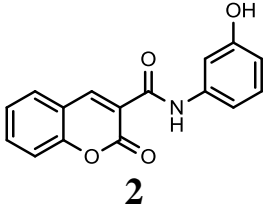
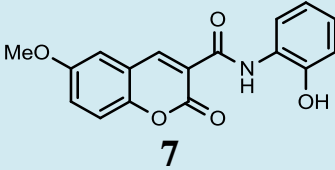
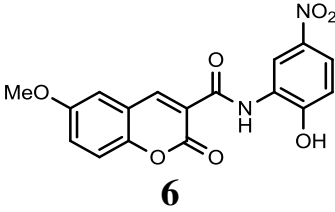
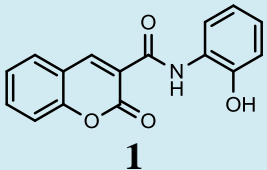
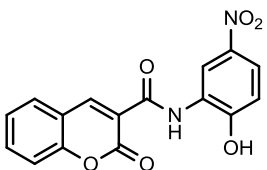


**Figura 33:** Perfiles cinéticos del consumo de FL inducida por radicales peroxilo derivados de AAPH en presencia de los compuestos 3 y 8, a diferentes concentraciones.

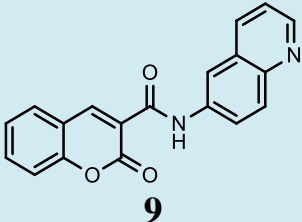
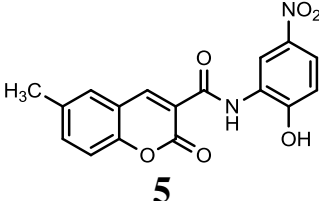
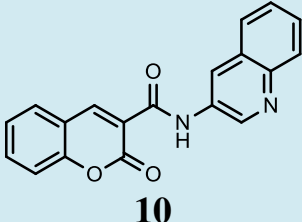
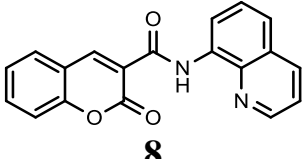


**Figura 34:** Curva de regresión lineal obtenida del compuesto 3, para obtener la pendiente y así calcular el índice ORAC-FL.

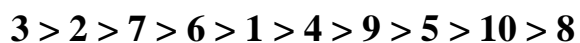
**Tabla 5.** Valores de índices ORAC-FL de los compuestos estudiados. Los resultados son expresados como el promedio (n=3) ± SD.

Compuesto	Índice ORAC-FL
 <p><b>3</b></p>	1,87 ± 0,08
 <p><b>2</b></p>	1,76 ± 0,04
 <p><b>7</b></p>	0,66 ± 0,04
 <p><b>6</b></p>	0,31 ± 0,05
 <p><b>1</b></p>	0,30 ± 0,02
 <p><b>4</b></p>	0,19 ± 0,01



 <p><b>9</b></p>	0,18 ± 0,01
 <p><b>5</b></p>	0,12 ± 0,01
 <p><b>10</b></p>	0,115 ± 0,008
 <p><b>8</b></p>	0,102 ± 0,003

El orden obtenido en el índice ORAC-FL, de mayor a menor es:



Los compuestos 2 y 3 fueron los de mayor índice ORAC-FL, en relación a los diez compuestos estudiados, sin embargo el índice obtenido no es muy alto ya que es muy similar a Trolox (índice ORAC-FL= 1), lo que

indica que no tienen una alta capacidad antioxidante. Al poseer un grupo hidroxilo, estos compuestos tienen la capacidad de donar su hidrógeno lábil lo que hace que sean mejores que el resto. Los compuestos 8 y 10 son los que tienen menor índice ORAC-FL, y se puede observar que en su estructura no hay grupo hidroxilo.

Por otro lado los compuestos que poseen un grupo hidroxilo varían su índice ORAC-FL, dependiendo de los sustituyentes que poseen. Los compuestos 1, 4, 5, 6 y 7 son muy similares, estando el grupo hidroxilo en la misma posición (2-fenil). De acuerdo con el índice ORAC-FL se deduce una interacción, por puente de hidrógeno, entre el sustituyente hidroxilo y el carbonilo del grupo amida, por lo cual el hidrogeno pierde labilidad lo que se representa en el índice bajo obtenido.

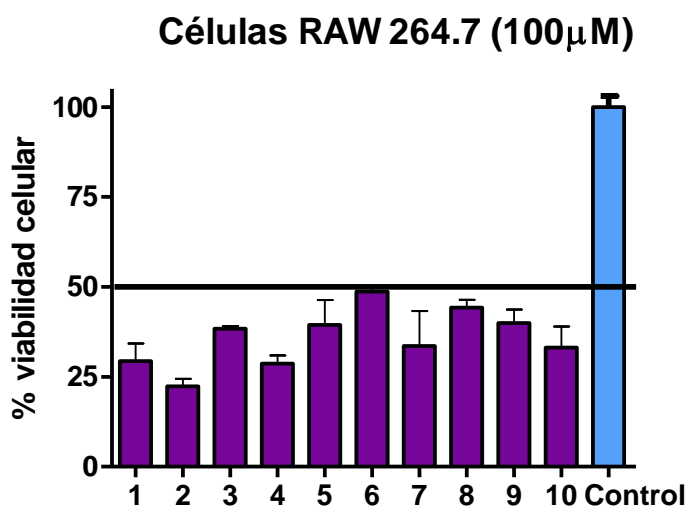
Los compuestos 6 y 7 son muy similares en su estructura química, la única diferencia, es el grupo nitro en la posición 5-fenil, presente en 6, el cual es un aceptor de electrones, disminuyendo la densidad electrónica, por lo cual el hidrógeno del hidroxilo es más lábil, sin embargo existe la interacción entre este hidrógeno y el carbonilo de la amida, formando un puente de hidrógeno entre ellos, disminuyendo la labilidad (en ambos casos). A su vez los

compuestos 1 y 4 tan solo se diferencian en el grupo nitro presente, ocurriendo el mismo efecto que en los compuestos 6 y 7.

Por otro lado el compuesto 5, en comparación con el resto de las moléculas que presentan grupo hidroxilo, es el que tiene menor índice ORAC-FL. Finalmente, cabe señalar que las moléculas 8, 9 y 10 que no poseen grupo hidroxilo en su estructura, son las que tienen los menores índices, incluso cercanos a cero, con esto también se puede observar que el hidrógeno de la amida no es muy lábil.

### 5.5. Evaluación de la actividad tripanocida selectiva en epimastigotes y tripomastigotes *T. cruzi*, utilizando la metodología de reducción de MTT.

Se utilizaron células RAW 264.7, que es una línea celular derivada de macrófagos murinos, para hacer un estudio de citotoxicidad en los compuestos N-aril amido cumarinas. Se realizó un tamizaje equipotente de todos los compuestos usando una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 35).

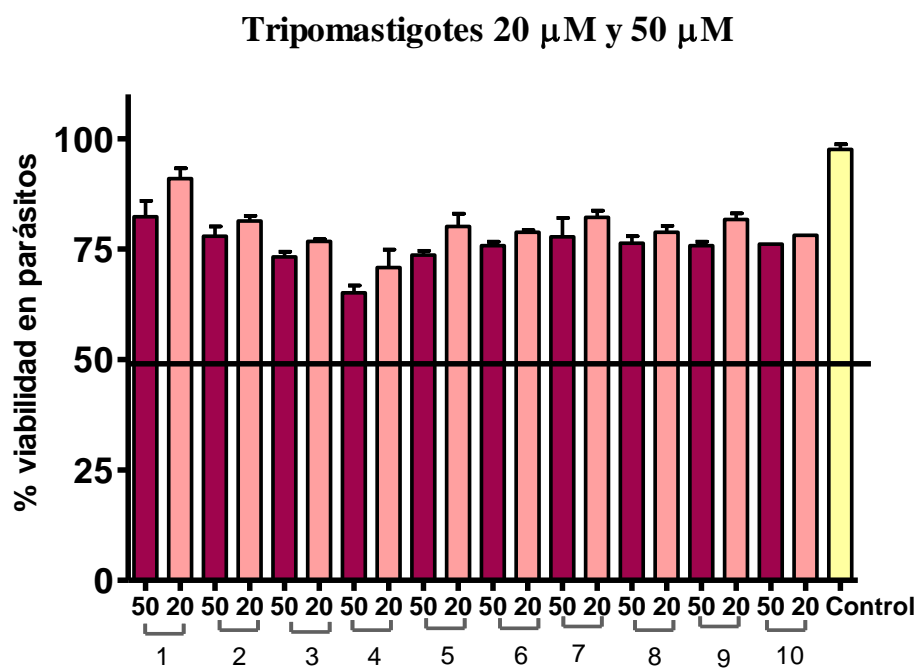
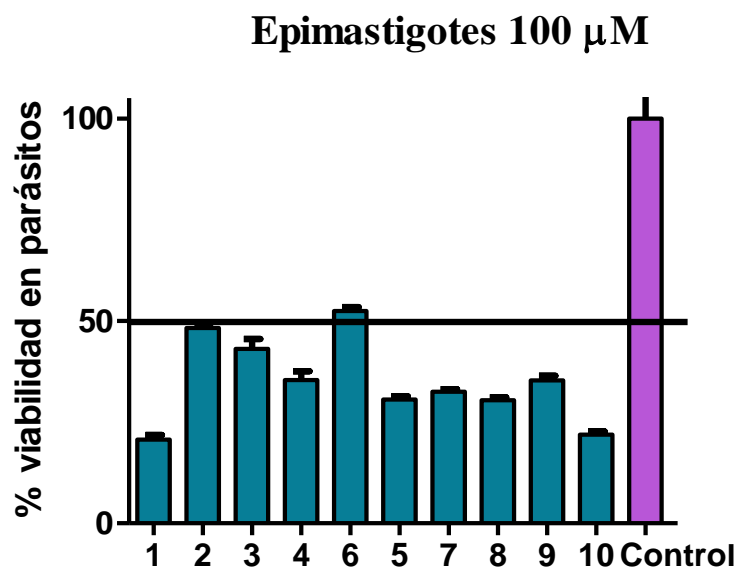


**Figura 35:** Actividad citotóxica de las N-aril amido cumarinas, sobre células RAW 264.7. Las células fueron incubadas con los compuestos a concentración de 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y luego se determinó la viabilidad mediante reducción de MTT a formazán. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto del control que representa el 100% de viabilidad.

Posteriormente se obtuvieron los  $IC_{50}$  de los compuestos, que como resultado del tamizaje, disminuyeron en más del 50% la viabilidad. (Tabla 6). El compuesto más tóxico fue el 6 con una concentración de 51,2  $\mu$ M. Y el que presentó menor actividad citotóxica fue el 7 con un valor de 192,97  $\mu$ M. No obstante, todos los compuestos estudiados presentaron mayor citotoxicidad que nifurtimox.

De manera preliminar, se realizó un tamizaje para determinar la actividad tripanocida de las N-aril amido cumarinas sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c. Los epimastigotes fueron incubados con los compuestos a concentración 100  $\mu$ M y los tripomastigotes a concentración de 20 y 50  $\mu$ M (Fig. 36). Las N-aril amido cumarinas demostraron una actividad significativa sobre epimastigotes, evidenciado por una disminución de la viabilidad mayor a 50% para todos los compuestos estudiados. No obstante, ningún compuesto disminuyó la viabilidad de los tripomastigotes de forma significativa. Sin embargo, el compuesto 4 demostró la mayor actividad, con un 34,9% de muerte del parasito a una concentración de 50  $\mu$ M. Dado que todos los compuestos presentaron actividad sobre epimastigotes, se procedió a calcular su valor de  $IC_{50}$ . Este cálculo no se realizó sobre los tripomastigotes (Tabla 6).

La potencia tripanocida del derivado cumarínico 10 es comparable a la de nifurtimox. No obstante, la selectividad de estos compuestos es muy baja, aunque el compuesto 9, y eventualmente el compuesto 10, fueron los que presentaron los índices de selectividad mayores.



**Figura 36:** Actividad tripanocida de las N-aryl amido cumarinas, sobre epimastigotes (A) y tripomastigotes (B) de *T. cruzi*, clon Dm28c. Los epimastigotes fueron incubados con los compuestos a concentración de 100  $\mu$ M y los tripomastigotes a concentración de 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, durante 24 horas y luego se determinó la viabilidad mediante reducción de MTT a formazán. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SD de tres experimentos

independientes. Los resultados están normalizados respecto del control que representa el 100% de viabilidad.

**Tabla 6.** Actividad de las N-aril amido cumarinas sobre células RAW 264.7 y epimastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c. Análisis de selectividad.

Compuesto	IC <sub>50</sub> Células RAW 264.7 (μM)	IC <sub>50</sub> Epimastigotes (μM)	Índice de selectividad <sup>1</sup>
1	122,20 ± 0,01	82,50 ± 0,03	1,48
2	100,48 ± 0,03	28,54 ± 0,01	3,52
3	121,8 ± 0,1	51,8 ± 0,1	2,35
4	72,5 ± 0,4	57,07 ± 0,5	1,27
5	72,09 ± 0,02	26,4 ± 0,3	2,73
6	51,2 ± 0,1	24,90 ± 0,03	2,06
7	192,97 ± 0,05	47,9 ± 0,2	4,03
8	>100	66,24 ± 0,15	-----
9	180,75 ± 0,02	22,25 ± 0,25	8,12
10	>100	20,9 ± 0,1	-----
Nifurtimox	263,4 ± 25,4	17,4 ± 1,3	15,14

<sup>1</sup> índice de selectividad = IC<sub>50</sub> células RAW 264.7/IC<sub>50</sub> epimastigotes

Los resultados se expresan como el promedio ± SD (n=3)



## **5.6. Detección de radicales libres generados por cumarinas en un medio parasitario en el estadio epimastigote, por medio de REE.**

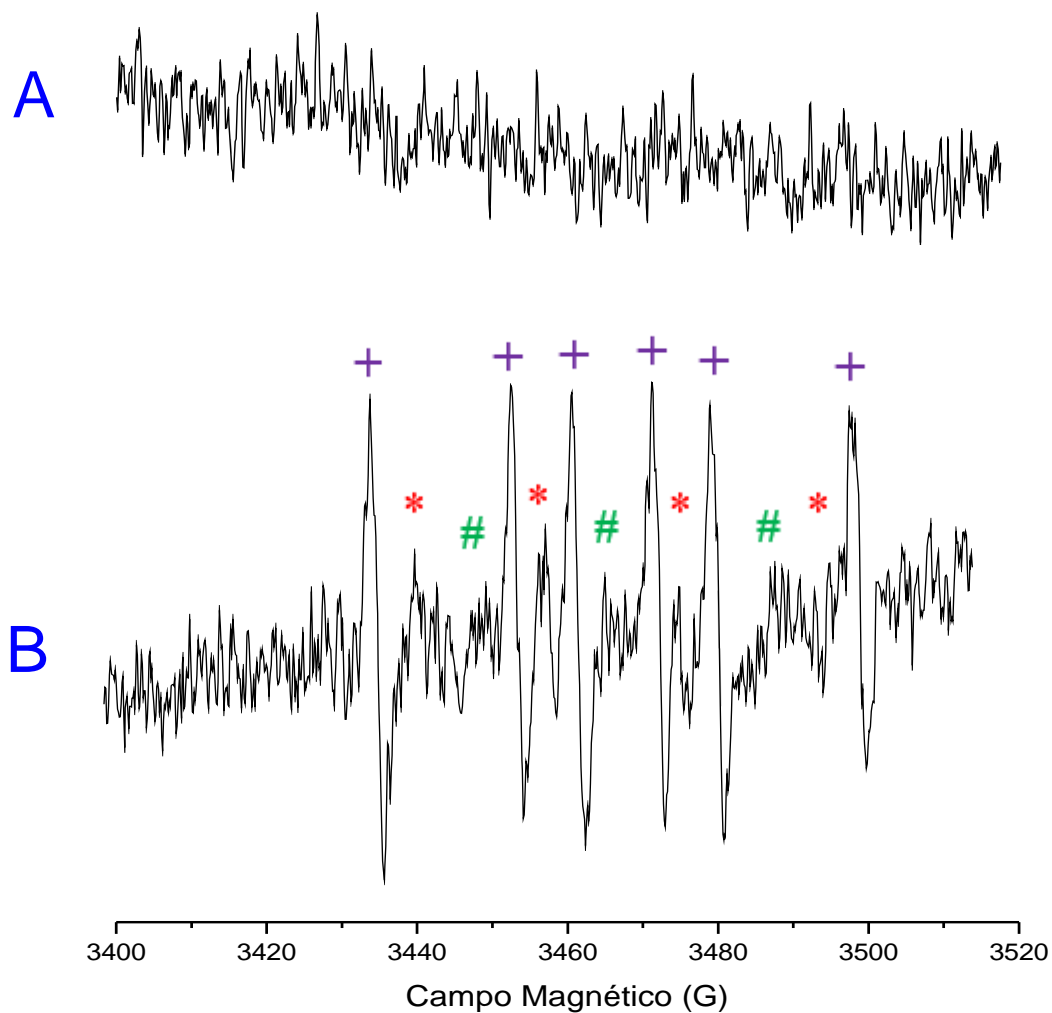
Para realizar este experimento, se estudiaron 3 compuestos de la serie los cuales son representativos de cada grupo. Se escogió el compuesto 2 representativo de los N-aril amido cumarina monohidroxilado, el compuesto 4 representativo de las moléculas que poseen grupo nitro y finalmente el compuesto 8, representativo de los derivados de cumarina con una quinolina en su estructura.

Se determinó la actividad en epimastigotes de *T. cruzi* en medio DMSO, NADPH y DMPO en ausencia de los compuestos, en el espectro se evidencia que no hay generación de especies radicalarias en presencia de estos (Fig. 37).

Al analizar los espectros generados mediante REE, se observó que todos los compuestos estudiados (2, 4 y 8) generaron un mismo patrón de acoplamiento hiperfino, en el cual se identifican ciertas características coincidentes con estudios anteriores [57,58].

En el espectro se identifican seis líneas intensas correspondientes al atrapamiento del radical metilo o radical cumarina. La señal atribuible al

aducto DMPO-CH<sub>3</sub> o DMPO-cum, es producida por la reacción entre el radical hidroxilo y el disolvente (DMSO) y luego es atrapado por el *spin trap* DMPO. Además, los espectros muestran un triplete (tres líneas) correspondiente a la señal DMPOX, debido a la descomposición de DMPO a su forma oxidada DMPOX. Por otro lado, también se observa la señal del aducto DMPO-OH, esta señal no es muy intensa, lo que indica que la mayor cantidad del radical hidroxilo reacciona con DMSO, para así formar el aducto DMPO-CH<sub>3</sub> o DMPO-cum (señal que es muy intensa en este caso). El mecanismo de reacción, recién explicado, se muestra en la figura 38.



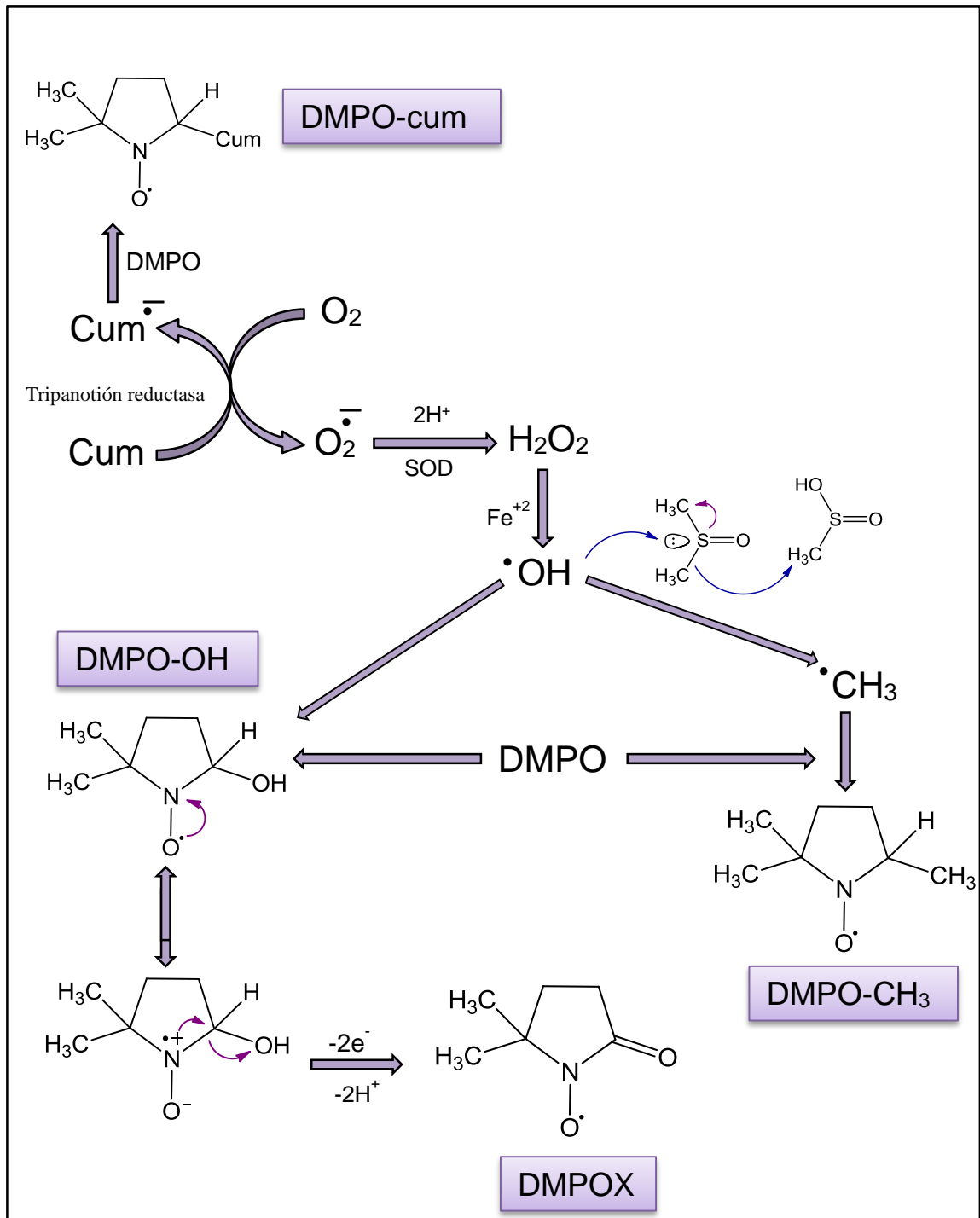
**Figura 37:** Espectro experimental para los espín-aducto generados en epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) en medio DMSO, NADPH y DMPO. (A) Control: Espectro generado sin compuesto presente. (B) Espectro correspondiente a; compuesto 2. Se ha marcado con el símbolo (+) al patrón hiperfino para el espín-aducto DMPO-CH<sub>3</sub> o DMPO-cum. Con el símbolo (#) se denota a la señal del espín-aducto DMPOX. Y con el símbolo (\*) se denota la señal del espín-aducto DMPO-OH.

Para evaluar si las señales observadas son las que se esperan que estén en el espectro, se calcularon las constantes de acoplamiento hiperfino (Tabla 7), las cuales son similares a las teóricas, lo que indica que efectivamente corresponden a las señales esperadas.

Finalmente, se puede determinar que esta familia de cumarinas podría producir estrés oxidativo en el parásito en su estadio epimastigote; sin embargo, no se puede descartar otro mecanismo de acción.

**Tabla 7.** Constantes de acoplamientos hiperfinas, teóricas y experimentales del espectro correspondiente al compuesto 2, el cual es representativo para los otros compuestos estudiados.

Espín aducto	Constante de acoplamiento hiperfina (experimental)	Constante de acoplamiento hiperfina (teórica) <sup>[57-58]</sup>
<b>DMPO-OH</b>	$a_H \sim 15,1 \text{ G}$ $a_N \sim 15,3 \text{ G}$	$a_H \sim 14,8 \text{ G}$ $a_N \sim 15,2 \text{ G}$
<b>DMPO-CH<sub>3</sub></b> <b>DMPO-cum</b>	<b>o</b> $a_H \sim 23,3 \text{ G}$ $a_N \sim 16,2 \text{ G}$	$a_H \sim 23,0 \text{ G}$ $a_N \sim 14,5 \text{ G}$
<b>DMPOX</b>	$a_N \sim 13,7 \text{ G}$	$a_N \sim 14,6 \text{ G}$



**Figura 38:** Reducción de la cumarina e interacción de sus productos metabolizados con el *spin-trap* DMPO.

## 6. CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante de los compuestos N-aril amido cumarina, fue baja, esto atribuible a que solamente existía un grupo hidroxilo en la molécula (1-7) siendo este poco reactivo y en tres de los compuestos estudiados no se encontraba como sustituyente (8-10). Además, se evidenció la existencia de una interacción, de puente de hidrógeno, entre el carbonilo de la amida y el hidroxilo de la molécula, disminuyendo aún más la labilidad del hidrógeno. También se observó que el hidrógeno de la amida no es lábil.

El mejor de la serie es el compuesto 3, con un índice ORAC-FL de 1,87, en su estructura hay un grupo hidroxilo, con el respectivo hidrógeno lábil.

En relación a la actividad tripanocida los compuestos resultaron más potentes en el estadio epimastigote del parásito, destacando dos compuestos de la serie, 9 y 10, con un  $IC_{50}$  de 22,25  $\mu$ M y 20,9  $\mu$ M respectivamente, ambos presentan una quinolina en su estructura, por lo cual esta favoreció en

la acción tripanocida. Sin embargo sus concentraciones de IC<sub>50</sub> fueron mayores a la del fármaco nifurtimox (17,4 μM).

En el rango de concentraciones estudiada, los compuestos de la serie no son potentes en el estadio tripomastigote. De acuerdo al ensayo de citotoxicidad en células macrófagos, todos los compuestos resultaron ser más tóxicos que el fármaco nifurtimox.

Los compuestos N-aril amido cumarina tendrían acción tripanocida en el estadio epimastigote, el cual se desarrolla dentro del insecto vector, pero para la fase tripomastigote la cual ocurre en el mamífero infectado, no habría acción tripanocida, y por otro lado resultaron tener una alta citotoxicidad en células macrófagos, por lo que la serie estudiada no resulta ser óptima como posible fármaco antichagásico.

## 7. REFERENCIAS

- [1] Ferreras-González, A.; García-Cuartero, I.; Gato-Díez, A.; Ferreras-Fernández, P., Hemoflagellates protozoan infections: Leishmaniasis, Chagas disease and African trypanosomiasis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2014, 11, (54), 3194-3207.
- [2] Pereira-Nunes, M.C.; Dones, W.; Morillo, C.A.; Encina, J.J.; Ribeiro, A.L., Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 62, (9), 767-776.
- [3] Serna, C.; Lara, J.A.; Rodrigues, S.P.; Marques, A.F.; Almeida, I.C.; Maldonado, R.A., A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccines against Chagas disease. *Vaccine*. 2014, 32, (28), 3525-3532.
- [4] Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marcondes de Resende, J., American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Disease Cli of North Am*. 2012, 26, (2), 275-291.
- [5] Perez, C.J.; Lymbery, A.J.; Thompson, R.C.A., Chagas disease: the challenge of polyparasitism?. *Trends in Parasitol*. 2014, 30, (4), 176-182.
- [6] Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M.J.; Montgomery, S.P., *Trypanosoma cruzi* and Chagas` Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011, 24, (4), 655-681.
- [7] Bern, C., Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas` disease. *New Engl J Med*. 2011, 364, (26), 2527-2534.



- [8] Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J.; Luquetti, A.O.; Rassi, A. Jr., 27-Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. *American Trypanosomiasis, Chagas Disease. One Hund Years of Res.* 2010, 709-741.
- [9] Punekollu, G.; Gowda, R.M.; Khan, I.A.; Navarro, V.S.; Vasavada, B.C., Clinical aspects of the Chagas`heart disease. *Int J of Cardiol.* 2007, 115, (3), 279-283.
- [10] Zacks, M.A.; Wen, J.J.; Vyatkina, G.; Bhatia, V.; Garg, N., An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc.* 2005, 77, (4), 695-715.
- [11] Gupta, S.; Wen, J.J.; Garg, N.J., Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009, 29, 19-54.
- [12] Pérez-Fuentes, R.; López-Colombo, A.; Ordonez-Toquero, G.; Gomez-Albino, I.; Ramos, J.; Torres-Rasgado, E.; Salgado-Rosas, H.; Romero-Diaz, M.; Pulido-Perez, P.; Sanchez-Guillen, M.C., Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasit.* 2007, 101, (2), 123-132.
- [13] Kocyigit, A.; Keles, H.; Selek, S.; Guzel, S.; Celik, H.; Erel, O., Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res-Gen Tox En.* 2005, 585, (1-2), 71-78.
- [14] Carabarin-Lima, A.; González-Vázquez, M.C.; Rodríguez-Morales, O.; Baylón-Pacheco, L.; Rosales-Encina, J.L.; Reyes-López, P.A.; Arce-Fonseca, M., Chagas disease (American tripanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica.* 2013, 127, (2), 126-135.

[15] Pagano, M.; Demoro, B.; Toloza, J.; Boiani, L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Olea-Azar, C.; Norambuena, E.; Gambino, D.; Otero, L., Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Eur J of Med Chem.* 2009, 44, (12), 4937–4943.

[16] Vieites, M.; Otero, L.; Santos, D.; Toloza, J.; Figueroa, R.; Norambuena, E.; Olea-Azar, C.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Morello, A.; Maya, J.D.; Garat, B.; Gambino, D., Platinum (II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *J of Inorg Biochem.* 2008, 102, (5-6) 1033–1043.

[17] Aravena, M.; Figueroa, R.; Olea-Azar, R.; Arán, V.J., ESR, Electrochemical and ORAC studies of nitro compounds with potential antiprotozoal activity. *J of the Chil Chem Soc.* 2010, 55, (2), 244-249.

[18] Aguilera-Venegas, B.; Olea-Azar, C.; Norambuena, E.; Arán, V.J.; Mendizabal, F.; Lapier, M.; Maya, J.D.; Kemmerling, U.; Lopez-Muñoz, R., ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1,4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Spectroch Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011, 78, (3), 1004–1012.

[19] Coa, J.C.; Castrillón, W.; Cardona, W.; Ospina, V.; Muñoz, J.A.; Vélez, I.; Robledo, S., Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. *Eur J of Med Chem.* 2015, 101, 746-753.

[20] Vigueira, P.A.; Ray, S.S.; Martin, B.A.; Ligon, M.M.; Paul, K.S., Effects of the green tea catechin (-)-epigallocatechin gallate on *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol-Drug.* 2012, 2, 225-229.

- [21] Inacio, J.D.F.; Canto-Cavalheiro, M.M.; Almeida-Amaral, E.E., In Vitro and in Vivo Effects of (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod.* 2013, 76, (10), 1993-1996.
- [22] Marin, C.; Ramirez-Macias, I.; Lopez-Cespedes, A.; Olmo, F.; Villegas, N.; Diaz, J.G.; Rosales, M.J.; Gutierrez-Sanchez, R.; Sanchez-Moreno, M., In Vitro and in Vivo Trypanocidal Activity of Flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas Disease. *J Nat Prod.* 2011, 74, (4), 744-750.
- [23] Vazquez-Rodriguez, S.; Figueroa-Guinez, R.; Matos, M.J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Lapier, M.; Maya, J.D.; Olea-Azar, C., Synthesis of coumarin-chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties. *Med Chem Comm.* 2013, 4, (6), 993-1000.
- [24] Tolomeo, M.; Roberti, M.; Scapozza, L.; Tarantelli, C.; Giacomini, E.; Titone, L.; Saporito, L.; Di Carlo, P.; Colomba, C., TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol.* 2013, 133, (1), 37-43.
- [25] Kumar, D.; Kumar, M.; Kumar, A.; Singh, S.K., Chalcone and Curcumin Derivatives: A Way Ahead for Malarial Treatment. *Mini-Rev Med Chem.* 2013, 13, (14), 2116-2133.
- [26] Schmidt, T.J.; Khalid, S.A.; Romanha, A.J.; Alves, T.M.A.; Biavatti, M.W.; Brun, R.; Da Costa, F.B.; de Castro, S.L.; Ferreira, V.F.; de Lacerda, M.V.G.; Lago, J.H.G.; Leon, L.L.; Lopes, N.P.; Amorim, R.C.D.; Niehues, M.; Ogungbe, I.V.; Pohlit, A.M.; Scotti, M.T.; Setzer, W.N.; Soeiro, M.D.C.; Steindel, M.; Tempone, A.G., The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part II. *Curr Med Chem.* 2012, 19, (14), 2176-2228.

[27] Evans, W.C.; Evans, D.; Trease, G.E. Trease and Evans pharmacognosy. 16th ed. Saunders/Elsevier: Edinburgh ; New York, 2009.

[28] Spino, C.; Dodier, M.; Sotheeswaran, S., Anti-HIV coumarins from Calophyllum seed oil. Bioorg & med chem lett. 1998, 8, (24), 3475-3478.

[29] Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E., Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. Curr Med Chem. 2005, 12, (8), 887-916.

[30] Venugopala, K.N.; Rashmi, V.; Odhav, B., Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. Biomed Res Int. 2013.

[31] Lake, B.G., Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. Food and Chem Toxicol. 1999, 37, (4), 423-453.

[32] Carocho, M.; Ferreira, I.C.F.R., The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer - A Review. Anticancer Agents Med Chem. 2013, 13, (8), 1236-1258.

[33] Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D., Coumarin-based drugs: a patent review (2008-present). Expert Opin Ther Pat. 2012, 22, (4), 437-454.

[34] Hupfeld, J.; Efferth, T., Drug Resistance of Human Immunodeficiency Virus and Overcoming it by Natural Products. In Vivo. 2009, 23, (1), 1-6.

[35] Patel, R.V.; Kumari, P.; Rajani, D.P.; Chikhaliya, K.H., Synthesis of coumarin-based 1,3,4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents. Med Chem Res. 2013, 22, (1), 195-210.

[36] Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V.S.; Prasad, A.K.; Saso, L., Coumarins as antioxidants. *Curr Med Chem.* 2011, 18, (25), 3929-3951.

[37] Witaicenis, A.; Seito, L.N.; Chagas, A.D.; de Almeida, L.D.; Luchini, A.C.; Rodrigues-Orsi, P.; Cestari, S.H.; Di Stasi, L.C., Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomed.* 2014, 21, (3), 240-246.

[38] Xi, G.L.; Liu, Z.Q., Antioxidant effectiveness generated by one or two phenolic hydroxyl groups in coumarin-substituted dihydropyrazoles. *European J of Med Chem.* 2013, 68, 385-393.

[39] Melagraki, G.; Afantitis, A.; Igglessi-Markopoulou, O.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.J., Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *European J of Med Chem.* 2009, 44, (7), 3020-3026.

[40] Symeonidis, T.; Fylaktakidou, K.C.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E., Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel angularly or linearly fused coumarins. *European J of Med Chem.* 2009, 44, (12), 5012-5017.

[41] Olomola, T.O.; Klein, R.; Mautsa, N.; Sayed, Y.; Kaye, P.T., Synthesis and evaluation of coumarin derivatives as potential dual-action HIV-1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg & Med Chem.* 2013, 21, (7), 1964-1971.

[42] Mao, W.W.; Wang, T.T.; Zeng, H.P.; Wang, Z.Y.; Chen, J.P.; Shen, J.G., Synthesis and evaluation of novel substituted 5-hydroxycoumarin and

pyranocoumarin derivatives exhibiting significant antiproliferative activity against breast cancer cell lines. *Bioorg & Med Chem Lett*. 2009, 19, (16), 4570-4573.

[43] Vazquez, R.; Riyeiro, M.E.; Mondillo, C.; Perazzo, J.C.; Vermeulen, M.; Baldi, A.; Davio, C.; Shayo, C., Pharmacodynamic study of the 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin-induced selective cytotoxicity toward U-937 leukemic cells versus mature monocytes: Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) as resistance factor. *Biochem Pharmacol*. 2013, 86, (2), 210-221.

[44] Perez-Cruz, F.; Villamena, F.A.; Zapata-Torres, G.; Das, A.; Headley, C.A.; Quezada, E.; Lopez-Alarcon, C.; Olea-Azar, C., Selected hydroxycoumarins as antioxidants in cells: physicochemical and reactive oxygen species scavenging studies. *J Phys Org Chem*. 2013, 26, (10), 773-783.

[45] Thuong, P.T.; Hung, T.M.; Ngoc, T.M.; Ha, D.T.; Min, B.S.; Kwack, S.J.; Kang, T.S.; Choi, J.S.; Bae, K., Antioxidant Activities of Coumarins from Korean Medicinal Plants and their Structure-Activity Relationships. *Phytotherapy Res*. 2010, 24, (1), 101-106.

[46] Perez-Cruz, F.; Serra, S.; Delogu, G.; Lapier, M.; Maya, J.D.; Olea-Azar, C.; Santana, L.; Uriarte, E., Antitrypanosomal and antioxidant properties of 4-hydroxycoumarins derivatives. *Bioorg & Med Chem Lett*. 2012, 22, (17), 5569-5573.

[47] Guinez, R.F.; Matos, M.J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Santana, L.; Uriarte, E.; Olea-Azar, C.; Maya, J.D., Synthesis and evaluation of antioxidant and trypanocidal properties of a selected series of coumarin derivatives. *Future Med Chem*. 2013, 5, (16), 1911-1922.

- [48] Rodríguez, J.; Olea-Azar, C.; Barriga, G.; Folch, C.; Gerpe, A., Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-Alcoxy, 3-hydroxy and 3-oxo derivatives. *Spectroch Act.* 2008, 3, (70), 557-563.
- [49] Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Arán, V.; Rigol, C.; Opazo, L., ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectroch Act.* 2006, 1, (63), 36-42.
- [50] Folch-Cano, C.; Olea-Azar, C.; Arán, V.; Diaz-Urrutia, C., ESR and electrochemical study of 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. *Spectroch Act.* 2010, 1, (75), 375-380.
- [51] Mura, F.; Speisky, H.; Arán, V.; Maya, Juan D.; Olea-Azar, C.; Aguilera-Venegas, B., Indazoles and quinazolines as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: An electrochemical, ESR and biological study. *J. Spectrosc. Dyn.* 2013, (8), 1-8.
- [52] Simic, A.; Manojlovic, D.; Segan, D.; Todorovic, M., Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules.* 2007, 12, 2327-2340.
- [53] Hoyle, C.; Santos, J., Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *Int. Food Research J.* 2010, 17, 937-946.
- [54] Sánchez, A.; Guillén-Villar, R.; Sánchez, R.; Vargas, R.; Garza, J.; Matus, M.; Salas-Reyes, M.; Domínguez, Z., Electrochemical oxidation of symmetrical amides of ferulic acid in aprotic medium. *Electroch Acta.* 2014, 133, 546-554.

[55] Janzen, E.; Kotake, Y.; Randall, H., Stabilities of hydroxyl radical spin adducts of PBN-type spin traps. *Free Radical Biol. and Med.* 1992, 12, (2), 169-173.

[56] Barriga, G.; Olea-Azar, C.; Norambuena, E.; Castro, A.; Porcal, W.; Gerpe, A.; González, M.; Cerecetto, H., New heteroaryl nitrones with spin trap properties: Identification of a 4-furoxanyl derivative with excellent properties to be used in biological systems. *Bioorg and Med Chem.* 2010, 18, (2), 795-802.

[57] Díaz-Urrutia, C.; Olea-Azar, C.; Zapata, G.; Lapier, M.; Mura, F.; Aguilera-Venegas, B.; Arán, V.; López-Muñoz, R.; Maya, J.D., Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. *Spectroch Act.* 2012, 95, 670-678.

[58] Aguilera-Venegas, B.; Olea-Azar, C.; Arán, V.; Speisky, H., Indazoles: a new top speed structure in the search of efficient drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Future Med Chem.* 2013, 15, 1843-1859.