

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO QUÍMICO – BIOLÓGICO DE DERIVADOS DE
NAFTOQUINONAS CON PORTENCIAL ACTIVIDAD TRIPANOCIDA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química**

por:

MÓNICA DEL CARMEN ROJAS ROSALES

**Director de Tesis: Dr. Claudio Olea Azar
Dr. Juan Diego Maya**

Santiago-CHILE

Enero 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

MÓNICA DEL CARMEN ROJAS ROSALES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, en el examen público rendido el día 23 de enero de 2015

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Co-director de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya

Comisión Evaluadora de Tesis:

M.S.c Dra. María Carolina Zúñiga L.

Dra. Ulrike Kemmerling W.

Dra. Margarita E. Aliaga M.

DEDICATORIA

A mi hijo Felipe, con la esperanza que un día entienda que el tiempo que le “quitó” no fue en vano y que en el futuro él también tenga, como yo, la posibilidad de hacer en la vida lo que le guste y sea capaz de luchar por alcanzar las metas que se proponga, porque todos los obstáculos, sacrificios y cansancio son nada, frente a la satisfacción que se siente al lograr dichas metas.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por el apoyo y las tardes que me brindó al reemplazarme en mis funciones de mamá cuando trabajaba en esta tesis.

A mi Felipe, que a pesar de sus reclamos, de alguna forma también compartió este trabajo.

A mi Director de tesis Dr. Claudio Olea, por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo. Gracias por ayudarme a lograr una gran satisfacción personal.

Al apoyo y buena voluntad de los compañeros de postgrado Roberto, Michel y Alejandra y en especial a la Dra. María Carolina Zúñiga..

A todos los que de una u otra manera me alentaron para empezar y terminar este trabajo.

Por último, gracias a la Facultad de Química y Farmacia por acogerme en el programa de Magister en Química.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Índice de contenidos	1
Índice de figuras	3
Índice de tablas	5
Abreviaturas	5
Resumen	6
Summary	9
Introducción	11
Tripanosoma cruzi	13
Ciclo biológico del parásito	13
Aspectos clínicos de la enfermedad	14
Mecanismos de las drogas tripanocidas	15
Drogas alternativas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas	19
Mecanismos de acción de las naftoquinonas	22
Propiedades tripanocidas de las naftoquinonas	23
Hipótesis	25
Objetivos generales	25
Objetivos específicos	25
Estructuras de las p-naftoquinonas en estudio	26
Metodología, materiales y equipo	29
Voltametría cíclica	29
Resonancia de espín electrónico	31
Ensayos biológicos con MTT	35

Actividad citotóxica en macrófagos	34
Resultados y discusión	35
Resultados de estudio electroquímico	35
Resultados de estudios de espectroscopía de espín electrónico	42
Resultados de estudio de REE en la generación biológica de radicales libres	43
Cálculos computacionales	45
Resultados de actividad biológica	46
Estudio en macrófagos	46
Análisis de la relación estructura- actividad citotóxica y potenciales de reducción de las naftoquinonas estudiadas.	48
Conclusiones	53
Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estructura básica de las p-naftoquinonas estudiadas y los sustituyentes de las distintas molécula	6
Figura 2	Comparación de la infestación con <i>Trypanosoma cruzi</i> , a nivel mundial, en los años 2002 y en 2011	11
Figura 3	Nº de ejemplares de triatoma infestans capturados por SEREMI (Chile, 2005 - 2011)	13
Figura 4	Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 5	Estructuras de Nifurtimox y benznidazol	15
Figura 6	Estructura y mecanismo de reducción del Benznidazol	17
Figura 7	Formación de glioxal a partir de dihidroxiimidazol	17
Figura 8	Formación de un aducto guanosina-glioxal	17
Figura 9	Mecanismo de reducción del Nifurtimox vía nitroreductasas tipo I y formación del metabolito nitrilo insaturado que participa en la actividad tripanocida. (Hall, Bot et al. 2011)	18
Figura 10	Formación de radicales aniónico y dianiónico en las naftoquinonas	19
Figura 11	Estructuras de naftoquinonas naturales con actividad tripanocida	20
Figura 12	Comparación del IC ₅₀ de la α -lapachona y uno de sus derivados	20
Figura 13	Estructuras 1,4-naftoquinona (1), juglona (2), lawsona (3), plumbagina (4) y naftazrina (5)	21
Figura 14	Ciclo redox típico de una naftoquinona	22
Figura 15	Lawsona o 2-hidroxi-1,4-naftoquinona	23

Figura 16	Comparación del IC ₅₀ de algunas naftoquinonas con el de benznidazol	24
Figura 17	Comparación del IC ₅₀ de algunas naftoquinonas con el de Nifurtimox	24
Figura 18.a	Representación generalizada para la reacción entre una nitrona y un radical libre. Se muestra la formación del aducto de espín formado.	32
Figura 18.b	Reacción de DMPO con radical	33
Figura 19	Voltamograma de NAFQ 1 y NAFQ 4 (1 mM) en medio aprótico (DMSO + 0,1 M de PTBA)	35
Figura 20	Voltamogramas de barridos sucesivos de NAFQ 1 y NAFQ 4, a velocidad de 2000 mVs ⁻¹	36
Figura 21	Dependencia de la intensidad del pico catódico con la velocidad para NAFQ 1 y NAFQ 2	37
Figura 22	Voltamograma de NAFQ 2 (1 mM) en medio aprótico (DMSO + 0,1 M de PTBA) a velocidades de 1000 mVs ⁻¹ , 2000 mVs ⁻¹ y 2500 mVs ⁻¹ .	38
Figura 23	Posible mecanismo para la reducción del compuesto NAFQ 2	39
Figura 24	Voltamograma de cinco barridos sucesivos de NAFQ 2 y NAFQ 3, a velocidad de 2000 mVs ⁻¹	40
Figura 25	Voltamograma de NAFQ 12, a velocidades entre 1000 y 5000 mVs ⁻¹	40
Figura 26	Espectro REE del compuesto NAFQ 7	42
Figura 27	Espectro REE de la NAFQ 10	43
Figura 28	Espectro REE de epimastigote (8-10 mg proteína/mL) + NADPH (1mM) + DMPO (100mM), a temperatura ambiente	44
Figura 29	Espectro de REE para epimastigote + NADPH + DMPO + NAFQ 10	44
Figura 30	Distribución de densidad electrónica del radical de la molécula NAFQ 7	45
Figura 31	Distribución de densidad electrónica para radical de la molécula NAFQ 10	45

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Datos electroquímicos obtenidos en los ensayos de voltametría cíclica a velocidad de 2000 mVs ⁻¹	41
Tabla 2	Resultados de ensayos de actividad biológica viable por MTT e IC ₅₀	46
Tabla 3	Estudio en macrófagos de los compuestos NAFQ 2 y NAFQ 4	47

ABREVIATURAS

REE	Resonancia de espín electrónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
PTBA	Perclorato de terbutilamonio
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
Ipa	Corriente de pico anódico
Ipc	Corriente de pico catódico
SCE	Electrodo de calomelano saturado
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Log P	Logaritmo del coeficiente octano-agua
NADPH	Nicotiamida-Adenina-Dinucleótido Fosfato

RESUMEN

En esta tesis se estudió el comportamiento electroquímico de un grupo de p-naftoquinonas, específicamente, derivados halogenados de arilaminonaftoquinonas, como asimismo, derivados de índoles, furano y quinolinquinonas. Se analizó el impacto de las modificaciones en los sustituyentes de la estructura base de la p-naftoquinona, sobre su capacidad tripanocida, como asimismo, sus propiedades de reducción y sus propiedades tripanocidas sobre epimastigotes y tripomastigotes del *Trypanosoma cruzi*.

Las moléculas de p-naftoquinonas estudiadas, son derivados que presentan diferentes sustituyentes del anillo bencénico de la izquierda (Figura 1) el cual ha sido reemplazado por heterociclos oxigenados o nitrogenados, como una forma de estudiar las variaciones que pueden provocar en la citotoxicidad y tripanocidad de la molécula. Por otro lado, los grupos denominados R_1 y R_2 (Figura 1), de las moléculas, presentan diferentes combinaciones de sustituyentes, por ejemplo, una cadena lipofílica R_1 y un halógeno (Cl o Br) en R_2 , o viceversa, o de manera conjugada, heterociclos oxigenados o nitrogenados. Se espera que estas variaciones aumenten la selectividad, la lipofilia, la citotoxicidad o la acción tripanocida de las moléculas.

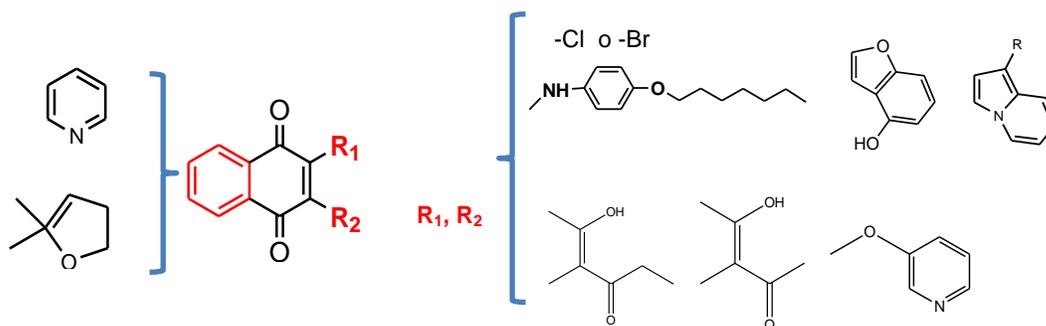


Figura 1. Estructura básica de las p-naftoquinonas estudiadas y los sustituyentes de las distintas moléculas.

Los potenciales electroquímicos de reducción de las especies radicalarias de las moléculas de naftoquinonas estudiadas, fueron determinados a través de voltametría cíclica en medio aprótico de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando perclorato de tetrabutilamonio como electrolito soporte, en una atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente.

Los resultados electroquímicos, mostraron que las moléculas estudiadas presentan potenciales de reducción que varían entre -0,51 V y -0,70 V, en solvente aprótico de DMSO, menores que el Nifurtimox y que el Benznidazol ($E_{pc} = -0,91$ V y $E_{pc} = -1,33$)), excepto la molécula NAFQ 10 cuyo potencial fue de -1,63 V. En resumen, se puede decir que la familia de p-naftoquinonas estudiadas presenta mayor facilidad de realizar reducciones que el Nifurtimox y que el Benznidazol, lo cual podría también ocurrir en sistemas biológicos. De acuerdo a los datos obtenidos, las moléculas de p-naftoquinonas estudiadas formaron efectivamente especies radicalarias asociadas a reacciones monoelectrónicas controladas por difusión, en las cuales se formaría la semiquinona o hidroquinona correspondiente. A través de los voltamogramas obtenidos, se observó, en algunas moléculas, reacciones químicas asociadas a las electroquímicas.

Los radicales detectados por la voltametría cíclica fueron corroborados con las pruebas de resonancia de espín electrónico. En estos últimos ensayos, en todas las moléculas se observó la presencia de una sola señal de REE, dando cuenta de la formación del radical, solo en algunas de las moléculas se observó un doblete producto del acoplamiento de un átomo de hidrógeno del anillo heterocíclico.

En cuanto a las caracterizaciones de los radicales formados, por generación biológica, esta se llevó a cabo con epimastigotes y la técnica de Spin trapping. Los espectros observados corroboran la formación de las especies quinónicas radicales sin la formación de especies reactivas de oxígeno.

Los ensayos de muerte celular se realizaron por reducción (MTT) en estadios de tripomastigote del parásito *Trypanosoma cruzi*. A 10 μ M, las moléculas: NAFQ 2, NAFQ 4, NAFQ 6, NAFQ 9, NAFQ 10, NAFQ 11, NAFQ 12 y NAFQ 13, presentan porcentajes de sobrevivencia menores al 50%. A 100 μ M, las mismas moléculas bajan aún más estos porcentajes, quedando bajo el 20%.

Con respecto a los IC_{50} , calculados las moléculas: NAFQ 2, NAFQ 4, NAFQ 6, NAFQ 9, NAFQ 10, NAFQ 11, NAFQ 12 y NAFQ 13, presentaron valores inferiores al IC_{50} del Nifurtimox.

Con respecto al estudio en macrófagos, este se realizó sólo en dos compuestos representativos de las familias de naftoquinonas estudiadas, el compuesto NAFQ 2 y el NAFQ 4. Para el NAFQ 2 se encontró un valor de $IC_{50} = 29,19 \pm 2,19 \mu M$ en macrófago, mientras que en el parásito su valor fue de $0,349 \pm 0,089 \mu M$, lo que farmacológicamente es esperado para una droga terapéutica, sin embargo, este compuesto sería más tóxico que Nifurtimox y que el Benznidazol. En el caso del compuesto NAFQ 4, el IC_{50} en macrófago fue de $15,74 \pm 0,49 \mu M$, en tanto que en parásito fue de $85,78 \pm 7,50 \mu M$, indicando en este último una gran toxicidad.

was -1.63 V. in summary, one can say that the family of p-naphthoquinones studied exhibits greater ease of making reductions than Nifurtimox and the Benznidazol, which may also occur in biological systems. According to the data obtained, the molecules studied p-naphthoquinones effectively formed one-electron radical species associated with diffusion-controlled reactions, in which the corresponding hydroquinone or semiquinone form. Through the voltammograms obtained, was observed in some molecules, chemical reactions associated with the electrochemical.

As for the characterizations of the radicals formed, for biological generation. The latter was performed with epimastigotes and Spin trapping technique. The observed spectra confirm the formation of radical species quinonicas without the formation of reactive oxygen species

Cell death assays were performed by reduction (MTT) in trypomastigote stages of the parasite *Trypanosoma cruzi*. At 10 μM , molecules: NAFQ 2, NAFQ 4, NAFQ 6, NAFQ 9, NAFQ 10, NAFQ 11, NAFQ 12 and 13, have lower survival rates than 50%. At 100 μM , the same molecules further down these percentages, being under 20%.

With respect to IC_{50} calculated molecules: NAFQ 2, NAFQ 4, NAFQ 6, NAFQ 9, NAFQ 10, NAFQ 11, NAFQ 12 and NAFQ 13, presented below Nifurtimox IC_{50} values.

Regarding the study in macrophages, this was done only in two representative compounds naphthoquinones families studied, the compound NAFQ 2 and NAFQ 4. For NAFQ 2 a value of $\text{IC}_{50} = 29.19 \pm 2.19 \mu\text{M}$ in macrophage was found, whereas in the parasite its value was $0.349 \pm 0.098 \mu\text{M}$, which is pharmacologically expected for a therapeutic drug, yet still more toxic than nifurtimox and benznidazole. In the case of compound NAFQ 4, the IC_{50} in macrophage was $15.74 \pm 0.40 \mu\text{M}$, while parasite was at $85.78 \pm 0.40 \mu\text{M}$, indicating in this high toxicity.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) es provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, descubierto por Carlos Chagas en 1909, en Minas Gerais, Brasil (Coura-Dias, 2009). Esta zoonosis es una de las enfermedades parasitarias que en la actualidad está afectando a gran parte del continente americano, como también a otros países del mundo. Se calcula que a nivel mundial los contagiados por la enfermedad de Chagas, serían alrededor de 20 millones de persona. Actualmente la infección está presente en 21 países en América y es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias, después de la malaria (Cavalli and Bolognesi, 2009). Esta enfermedad, hoy en día también está presente en algunos países de Norteamérica, Europa, Asia y Australia. La Figura 2 muestra un estudio hecho en México en el año 2012, que presenta una comparación de la distribución de la enfermedad en el año 2002 y en el año 2011, que corrobora lo anterior.

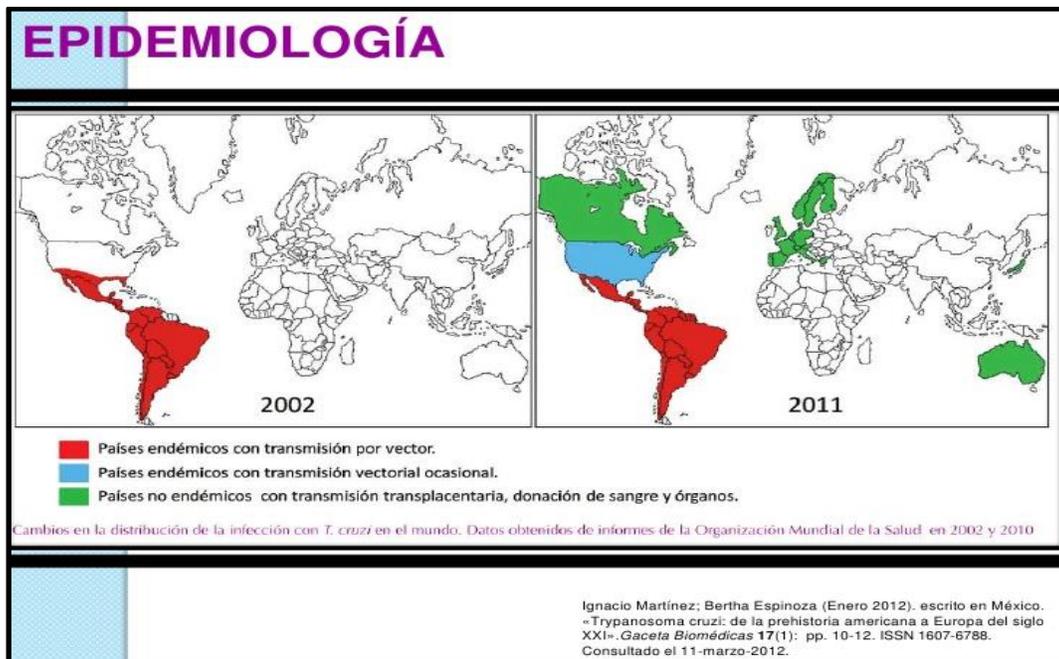


Figura 2. Comparación de la infestación con *Trypanosoma cruzi*, a nivel mundial, en los años 2002 y en 2011

La situación actual de la enfermedad de Chagas, en Chile y en el mundo no es muy alentadora, ya que no se cuenta con vacunas que pudieran usarse como método de prevención, los medicamentos utilizados son de alto costo económico, lo cual es un

problema puesto que los infectados corresponden generalmente a personas de bajos recursos económicos, por otro lado, los efectos secundarios son complejos y los fármacos no son totalmente eficaces en la fase crónica.

En Chile, el insecto vector del *Trypanosoma cruzi*, se conoce como Triatoma infestans, comúnmente llamado vinchuca. Si bien la estrategia de control del vector ha permitido que los niveles de infección vectorial hayan disminuido, no se ha logrado la erradicación de la enfermedad, esto a causa de la migración de personas contagiadas a zonas no endémicas y a la prevalencia e incluso aumento de triatominos en algunas zonas del país (Figura 3). Si bien históricamente las vinchucas se han encontrado, en mayor número, en la zona norte de Chile (Atacama y Coquimbo), llama la atención que entre los años 2005 a 2011, se ha visto un aumento de estos insectos, alrededor de un 50%, infectados por *Trypanosoma cruzi*, en sectores silvestres de la región Metropolitana, de Valparaíso y Aconcagua. Se estima que en Chile existen alrededor de 300.000 personas con esta enfermedad. Según el MINSAL, la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2009 - 2012, informó que en Chile existe un 0,7% de la población total infectada, la zona de Atacama presenta el mayor porcentaje de prevalencia con un 4,3%¹. Por otro lado, existen otras vías de contagio, entre estas se cuenta la transmisión de madre a hijo, la contaminación accidental, el contagio oral a través de alimentos contaminados con heces del parásito y la transfusión sanguínea, siendo esta última la segunda mayor causa de transmisión del parásito en seres humanos. (Abad-Franch, Santos et al. 2010). Con respecto a este tema, en Chile existe una medida de control de la transmisión transfusional en todos los servicios de salud del país.

¹ http://www.encuestasalud.cl/ens/wpcontent/uploads/2011/09/InformeENS_2009-2010

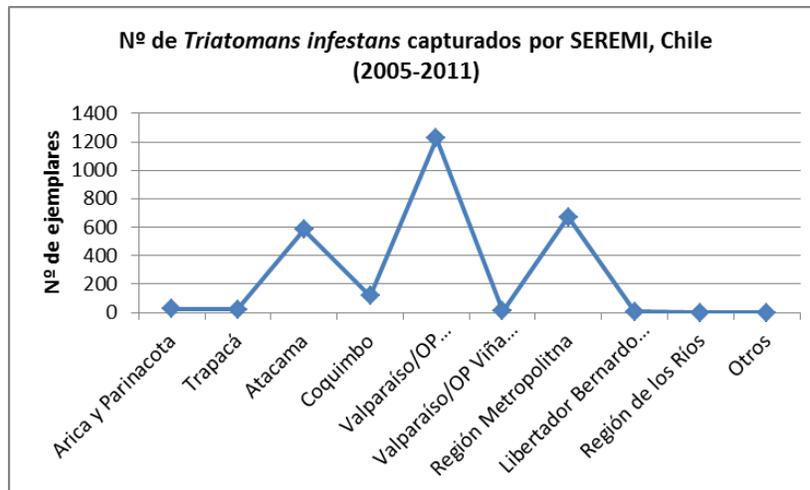


Figura 3. Nº de ejemplares de *triatoma infestans* capturados por SEREMI (Chile, 2005 - 2011)¹

***Trypanosoma cruzi*.**

El *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo flagelado perteneciente al género *kinetoplastidea* de la familia *trypanosomatidae*. Se caracteriza por la presencia de una única mitocondria ramificada por todo el parásito, en donde se encuentra una condensación de ADN extranuclear en una compleja estructura llamada kinetoplasto, ubicada cerca de la base del flagelo. El ADN ubicado en el kinetoplasto representa alrededor del 30% del ADN nuclear. Además, el *Trypanosoma cruzi*, muestra el característico flagelo que permite el movimiento del parásito.

Ciclo biológico del parásito

El ciclo biológico del parásito (Figura 4) comprende cuatro estadios, definidos por criterios morfológicos, que se subdividen en dos fases una en el vector y la otra en el hospedero. El ciclo se inicia cuando un triatomino que contiene epimastigotes (forma replicativa no infectiva) en su intestino, se alimenta de sangre de mamífero. Simultáneamente, el insecto, deposita sus heces cerca de la herida provocada por la picadura, permitiendo la entrada de los tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva no replicativa) a los tejidos del mamífero, siendo el primer contacto con las células del sistema inmune innato. Los macrófagos son infectados por los tripomastigotes sanguíneos y en el interior de estos se diferencian en amastigotes (forma replicativa intracelular). Luego de sucesivas replicaciones, se

transforman nuevamente en tripomastigotes, los cuales son capaces de provocar la lisis de la célula y comenzar así un nuevo ciclo de infección (Rassi, Rassi et al. 2010).

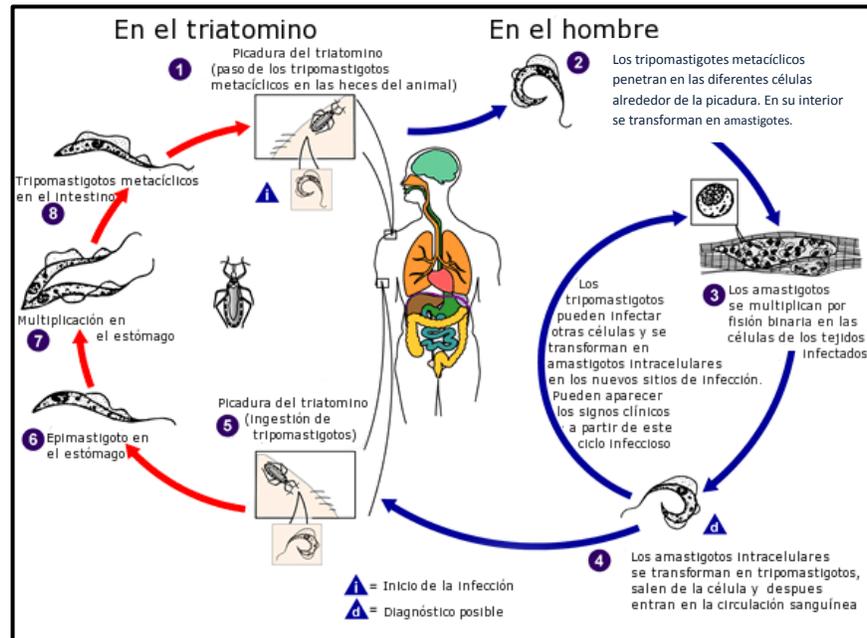


Figura 4. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*²

Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir tres fases:

- **Fase aguda:** Esta fase dura de 2 a 4 meses, se caracteriza por ser asintomática en 95% de los casos. Los pacientes sintomáticos (5%), presentan signos de una infección generalizada de gravedad variada, pueden tener fiebre, la aparición de un chagoma o signo de Romaña que evidencia la zona de entrada del parásito, además, epatomegalia (40%). En ciertas personas inmunodeficientes se ha detectado una intensa miocarditis y/o meningoencefalitis.
- **Fase crónica:** indeterminada o latente: representa la fase asintomática de la enfermedad y se cree que existe un equilibrio entre parásito/hospedero. Esta etapa puede durar años y solo un 30% de los pacientes chagásicos desarrollan la siguiente fase.

² http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm

- **Fase crónica determinada:** Sintomática, puede aparecer entre 10 y 30 años después de la infección inicial. La enfermedad afecta al sistema nervioso, al sistema digestivo y al corazón. Los pacientes desarrollan cardiopatía, megacolon o megaesófago.

Sin tratamiento, la enfermedad de Chagas puede ser mortal, por lo general debido al componente de miocardiopatía. (Rassi, Rassi et al. 2010; Urbina 2010).

Para el tratamiento de esta enfermedad, se utilizan, preferentemente, dos drogas: Nifurtimox (Lampit®, Bayer; 3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) y el Benznidazol (Rochagan®, Roche; N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 5). Cabe destacar que en Chile se utiliza mayoritariamente el Nifurtimox. Si bien, estos medicamentos han sido efectivos en la fase aguda, no lo han sido en pacientes crónicos y los efectos secundarios hacen cuestionable el costo-beneficio de dichas drogas.

El uso de estos fármacos está limitado por los efectos adversos sobre el paciente, estos incluyen trastornos mentales, anorexias, mareos, cefaleas, intolerancia gastrointestinal, depresión, entre otros. En el caso del Benznidazol, además se han detectado efectos teratogénicos.

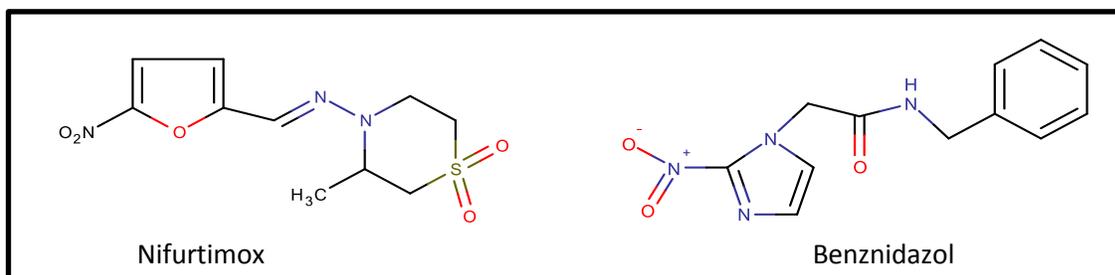


Figura 5. Estructuras de Nifurtimox y Benznidazol

Mecanismo de las drogas tripanocidas

Los tripanosomátidos han desarrollado una gran variedad de funciones fisiológicas necesarias para su supervivencia dentro del hospedero. El uso de estas funciones es notablemente distinto a las del hospedero, un hecho de ello, es que los parásitos no utilizan el oxígeno disponible del hospedero para generar ATP, sino que emplean su propio sistema anaeróbico para las vías metabólicas. Las enzimas que participan en los procesos metabólicos son específicas de estos parásitos, siendo estas vías, potenciales blancos para

la quimioterapia. (Buckner and Urbina, 2012). Es así que fármacos como Nifurtimox y Benznidazol son capaces de afectar la viabilidad del parásito. Se ha propuesto que el mecanismo de acción en la eliminación del parásito, está directamente relacionada con la formación de radicales libres y/o generación de metabolitos electrofílicos. El mecanismo involucraría la reducción del grupo nitro ($R-NO_2$), presente en ambas moléculas, por acción de nitrorreductasas. Así, el proceso es catalizado por una NADPH-citocromo P450 nitrorreductasa (De Vas, et al. 2011), produciendo intermediarios nitro anión radicales ($-R-NO_2^- \cdot$) estos intermediarios provocarían un desequilibrio en el interior del parásito. (Maya, Cassels et al. 2007). El Nifurtimox, actúa sobre las formas amastigote y tripomastigote, lo cual fue probado en el año 1965, es efectivo en la fase aguda, crónica indeterminada y crónica determinada, con una cura de la enfermedad de un 76% en la etapa aguda y variable en la crónica, los efectos secundarios se presentan en aproximadamente un 30% de los pacientes y están relacionados con el aparato digestivo, en algunos casos estos efectos pueden llegar a ser muy intensos.

En el caso del Benznidazol, al igual que en el Nifurtimox, actúa eficazmente en la etapa aguda, crónica indeterminada y crónica determinada, sin embargo, ha demostrado tener propiedades mutagénicas y teratogénicas en animales. Se ha propuesto que la activación de Benznidazol conduce a la formación de metabolitos reductores que pueden causar una serie de efectos, incluyendo daño en el ADN y el agotamiento de tioles. Actúa uniéndose a intermediarios de la nitrorreducción, con ADN, lípidos o proteínas del parásito, a través de enlaces covalentes. Se ha reportado que el paso clave en la activación de Benznidazol implica una nitrorreductasa NADH-dependiente de tipo I en *Trypanosomas*, esto cataliza una reacción con el oxígeno con la interacción de enzimas, productos reducidos y prodrogas, provocando un mecanismo ping-pong. El análisis de los metabolitos resultantes ha sido identificado mediante HPLC y espectrometría de masas, se identificó que 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol es el principal producto de la vía reductora, generando intermediarios de tipo hidroxilamina, el cual redistribuye el hidroxilo a través de la generación de un intermediario correspondiente a un ion nitrenium, la adición de agua conduce a la formación de la especie más estable cis o trans dihidro-dihidroxiimidazol (Figura 6). La ruptura de estos productos, implicaría la formación de di-aldehído glioxal (Figura 7), que en presencia de guanosina, genera aductos de guanosina-glioxal (Figura 8). La reducción de Benznidazol por la actividad de nitrorreductasa tipo I, conduce a la formación de metabolitos altamente

reactivos como el glioxal, la expresión de esta enzima sería clave para las propiedades tripanocidas (Hall and Wilkinson, 2012).

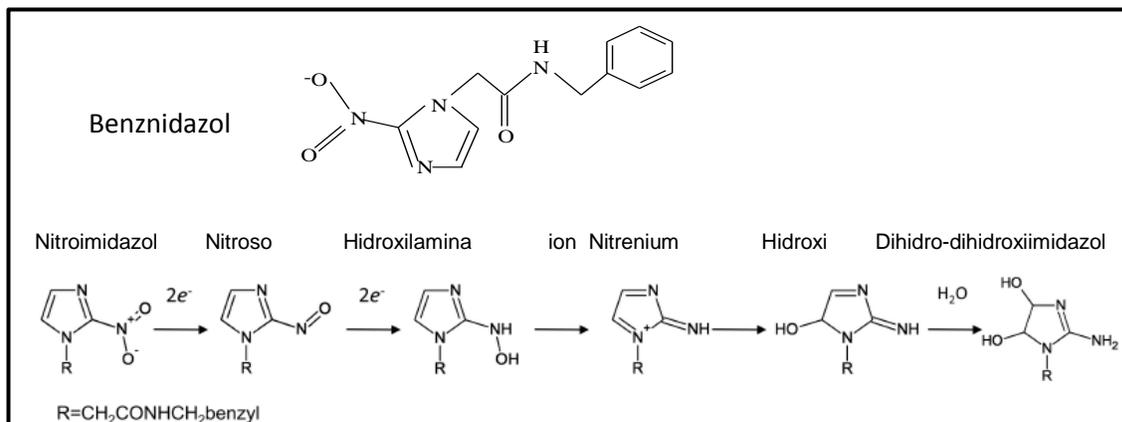


Figura 6. Estructura y mecanismo de reducción del Benznidazol.

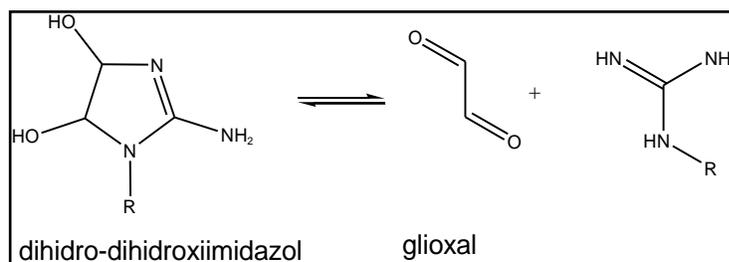


Figura 7. Formación de glioxal a partir de dihidroxiimidazol

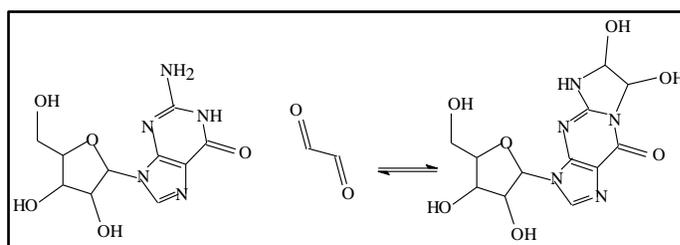


Figura 8. Formación de un aducto guanosina-glioxal

Con respecto al Nifurtimox, la detección de oxígeno y nitrógeno como intermediarios durante su biorreducción, ha llevado a la propuesta de que este fármaco induce estrés oxidativo en la célula diana. Estudios en parásitos (*T.cruzi*) han descrito que el mecanismo de reducción de Nifurtimox implicaría la activación reductiva por un tipo de nitrorreductasa. (Maya, Cassels et al. 2007). Varias enzimas se han propuesto para metabolizar Nifurtimox, incluyendo prostaglandina F₂ sintetasa, y el citocromo P450 reductasa (Chen, C. Leung, 2010) se describió que sólo células con niveles elevados de la nitrorreductasa tipo II,

Drogas alternativas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

Existen diversos estudios que proponen como drogas tripanocidas a diferentes tipos de moléculas quinónicas, entre estas moléculas, están siendo de gran interés farmacológico las naftoquinonas.

Las naftoquinonas son productos naturales extraídos de diferentes plantas como también de algunos animales y bacterias. Son compuestos cíclicos, derivados del naftaleno, que se presentan como dos anillos bencénicos fusionados, que comparten dos átomos de carbono. Uno de los anillos contiene dos grupos carbonilos en posiciones orto (1,2) o para (1,4). La combinación de los grupos carbonilos y los enlaces dobles del anillo aromático, le confiere a estas moléculas su capacidad de electrófilo (Kumagi et al, 2012).

Las naftoquinonas, se caracterizan, como todas las quinonas, por una alta reactividad de los grupos carbonilos, lo que facilita reacciones de tipo redox en las que acepta uno o dos electrones, a partir de lo cual se generan radicales libres aniónicos (semiquinona) o dianiónico (Figura 10). Esta propiedad química explicaría su actividad biológica (P.Hansz et al (1994); Stoppani A.O Metal (1997)).

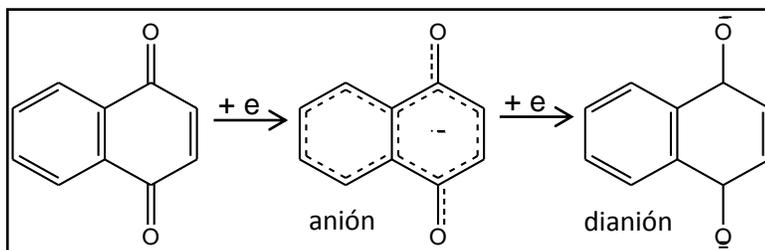


Figura 10. Formación de radicales aniónico y dianiónico en las naftoquinonas

Estudios actuales con naftoquinonas, indican que tanto las moléculas de origen natural como las sintéticas, presentan importantes propiedades farmacológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, (Balassiano I.T. et al. 2005), antibacterianos (Ferreira D.Tet al., 2004), fungicidas y antiparasitarios, entre estas como tripanocidas (Salas C.et al. ,2001, Salmon-Chemin L. et al, 2001.).

En la Figura 11, se muestran tres estructuras de p-naftoquinonas naturales extraídas de plantas, que debido a sus propiedades biológicas, reconocidas en la medicina popular, han sido tomadas como estructura básica, en la síntesis de nuevas moléculas tripanocidas.

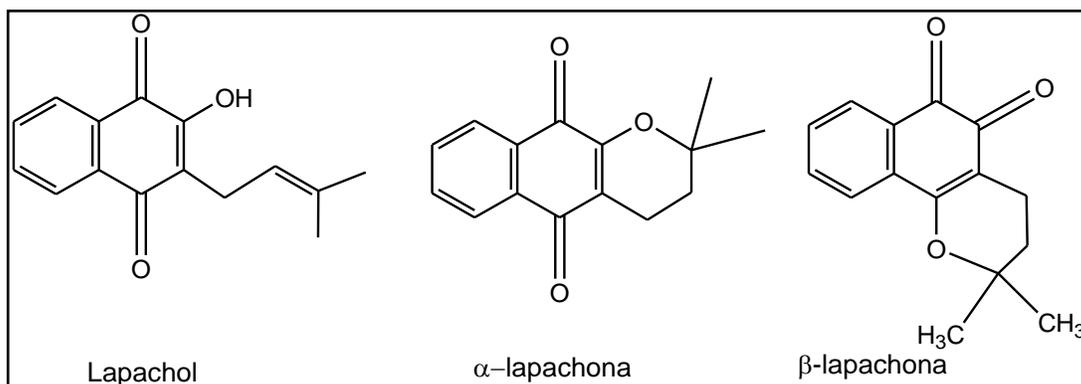


Figura 11. Estructuras de naftoquinonas naturales con actividad tripanocida

Con respecto a la β -lapachona, se ha demostrado que induce la formación de radicales peróxido de hidrógeno y superóxido de hidrógeno, causando alteración en membranas celulares e inhibición de proteínas, ADN y ARN en tripomastigotes y amastigotes (Pinto V.A., 2009; Bourguignon S. et al, 2011, Docampo, R. et al. (1978)).

En la Figura 12, se muestra un ejemplo, de los muchos que existen, de cómo la variación en la estructura molecular de la α -lapachona, puede mejorar, positivamente, la capacidad tripanocida, a partir de la comparación de sus concentraciones inhibitorias (IC_{50}), en este caso se destaca con rojo los cambios estructurales.

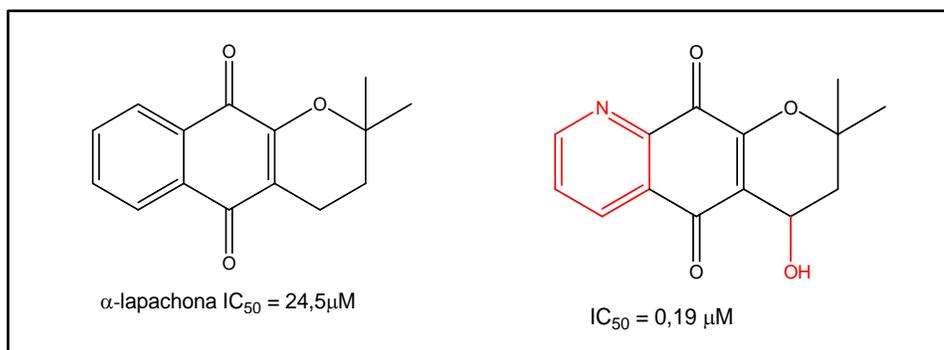


Figura 12. Comparación del IC_{50} de la α -lapachona con uno de sus derivados

Como se sabe, el IC_{50} corresponde a la concentración inhibitoria media de un fármaco, en el caso de las moléculas de la Figura 12, se puede observar como la presencia del anillo nitrogenado y del hidroxilo, produce una apreciable disminución del IC_{50} , lo que implicaría

que el derivado de α -lapachona, tendría una mayor citotoxicidad a menor concentración que la molécula original, con las posibles ventajas que esto significaría.

En estudios con derivados hidroxilados de 1,4-naftoquinonas, se ha visto que son potentes inhibidores de enzimas topoisomerasas y han sido usados clínicamente en algunos tipos de cáncer (Z.F.Plyta, et al. 1998; S.H.Kim and H.J.Lee, 2006; O. Moullet et al. 2000). En estudios realizados en una serie derivada de la 1,4-naftoquinona (1),: juglona (2), lawsona (3), plumbagina (4) y naftazarina (5) (Figura 13) (Babich H. and Stern,1993) se ha demostrado que la toxicidad es debida a la presencia de radicales libres, pero también se relaciona con un componente de adición electrofílica.

En otros estudio con juglona y plumbagina (Lindsay S. Hernández et al. 2009), se evaluó la diferencia de reactividad de los aniones de estos dos compuestos a través de estudios espectro-electroquímicos, se encontró que los radicales generados por plumbagina en solución de DMSO son más estables que los generados por la juglona a concentraciones cercanas a $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, basándose en la irreversibilidad de la señal voltamétrica. La semiquinona obtenida desde la juglona experimentaría una autoprotonación producto de la débil acidez del grupo -OH presente en el carbono 5 (Figura 13).

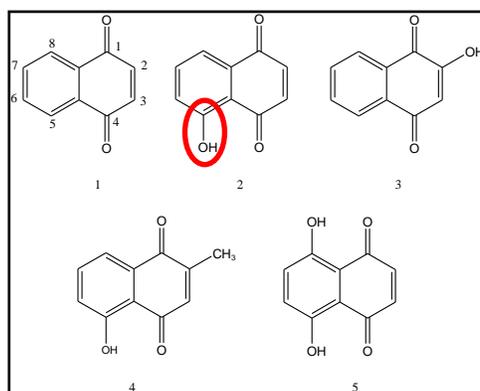


Figura 13. Estructuras 1,4-naftoquinona (1), juglona (2), lawsona (3), plumbagina (4) y naftazarina (5)

Mecanismos de acción de las naftoquinonas

Como se discutió anteriormente, los mecanismos de acción de las naftoquinonas, apuntan básicamente a dos procesos: estimulación de estrés oxidativo y alquilación de nucleófilos celulares.

La estimulación de estrés oxidativo, es causado por un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno, como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, entre otros y la capacidad del sistema biológico de reaccionar frente a estos agentes, que pueden causar incluso la muerte celular. Los radicales de oxígeno pueden actuar con macromoléculas generando peroxidación de lípidos y destrucción de membranas, inactivación de enzimas, degradación de ADN y mutagénesis.

La Figura 14, muestra el ciclo redox típico de una quinona, en el proceso aparecen especies reactivas de oxígeno (ROS) que son las que causarían estrés oxidativo. El *trypanosoma cruzi* es deficiente en mecanismo de detoxificación, propiedad que lo hace muy susceptible de estrés oxidativo por efecto de ROS, especies que pueden causar daño al ADN, proteínas y provocar la muerte celular. Las quinonas se oxidan a hidroquinona, luego forman un intermediario radicalario que al reaccionar con oxígeno molecular puede generar el anión superóxido, que a su vez pueden producir peróxido de hidrógeno.

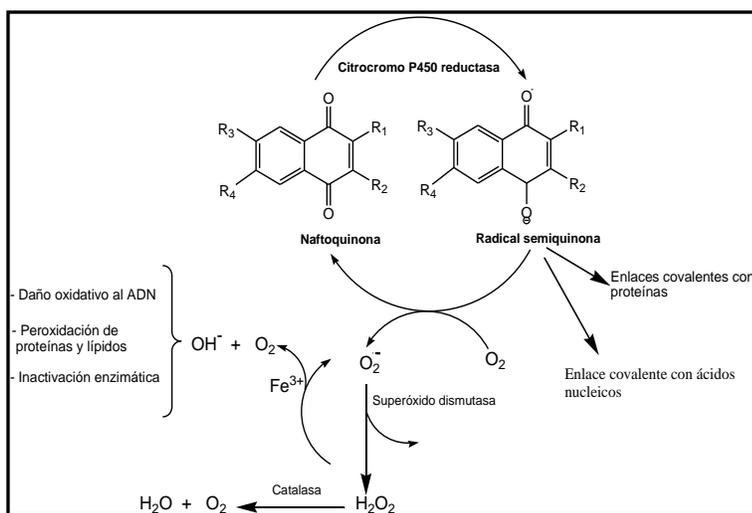


Figura 14. Ciclo redox típico de una naftoquinona

2- Alquilación de nucleófilos celulares

Con respecto a la alquilación de nucleófilos celulares, estos últimos se encuentran en muchas biomoléculas, entre ellas el ADN, proteínas y enzimas (Harmon, 1983). Las naftoquinonas como todas las quinonas interactúan, preferentemente, en aquellas moléculas que presentan grupos tioles como la N-acetilcisteína (NAC), los cuales actúan como agentes reductores. Las naftoquinonas estarían actuando como aceptores de Michel frente a estos sitios nucleófilos.

Existen algunos estudios realizados para determinar la interacción entre las naftoquinonas y el ADN (Bergeron F., 2007), se ha comprobado fuertes interacciones entre quinonas y bases nitrogenadas como la guanina y la adenina, esto ha quedado en evidencia a través de estudios con Voltametría cíclica, los voltagramas mostraron una disminución de la intensidad de corriente de estas bases a medida que aumentaba la concentración de las quinonas, tanto con el preparado de ADN como con las bases aislada, lo que se explicaría por la formación de aductos con el ADN o proteínas (Bitter S. et al. 2002; Wang Y, 2008; Fry M., Pudney M., 1992).

Propiedades tripanocidas de las naftoquinonas

La acción tripanocida de las naftoquinonas se ha evaluado con diversos derivados sintetizados a partir de la lawsona, (Figura 15). Algunos de estos compuestos han mostrado una potente actividad contra el *Trypanosoma cruzi*, son derivados del 1,2,3-triazol-1,4-naftoquinona, que resultaron ser tripanocida más potentes que el Benznidazol, esto se reflejó al comparar sus índices de citotoxicidad, IC_{50} . (da Silva J. et al., 2012).

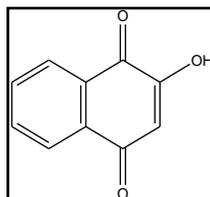


Figura 15. Lawsona o 2-hidroxi-1,4-naftoquinona

En las Figuras 16 y 17, se presentan las estructuras y los IC_{50} de algunos derivados de naftoquinonas, comparados con los del Benznidazol y del Nifurtimox, respectivamente. Se observa como las diferencias en las estructuras moleculares generan diferencias significativas en el IC_{50} y, por lo tanto, una mayor capacidad tripanocida que las dos drogas

utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Estos resultados son una buena razón para seguir estudiando derivados de la naftoquinona como posibles moléculas tripanocidas.

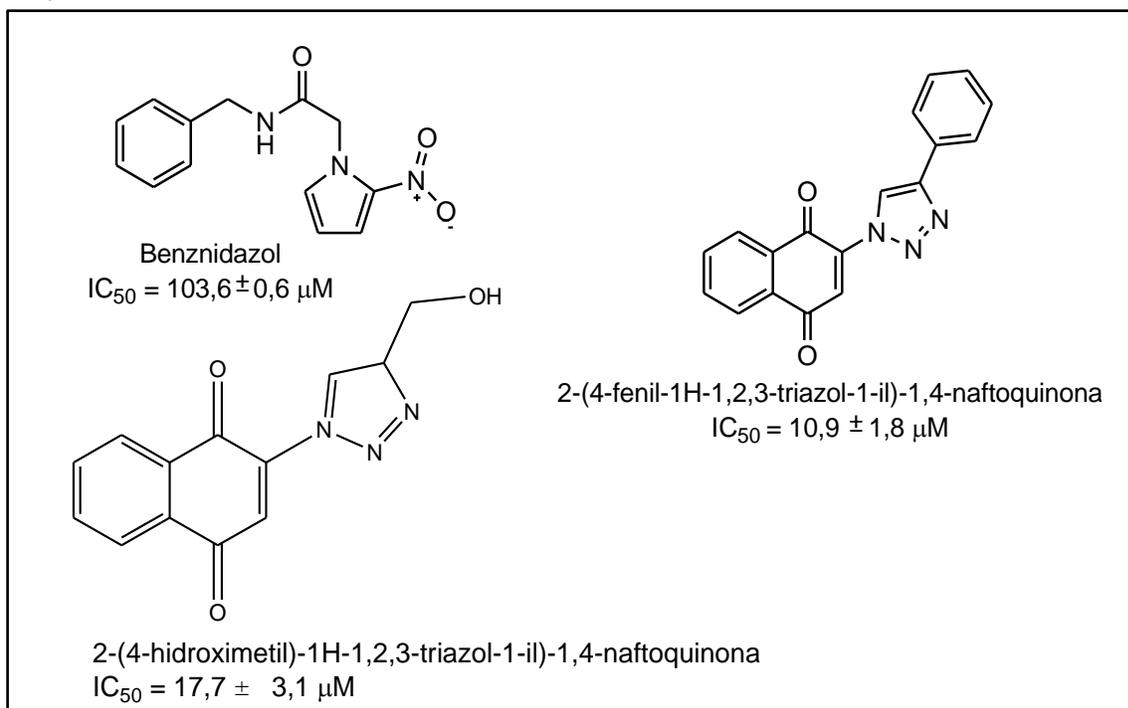


Figura 16. Comparación de IC_{50} de algunas naftoquinonas con el de Benznidazol

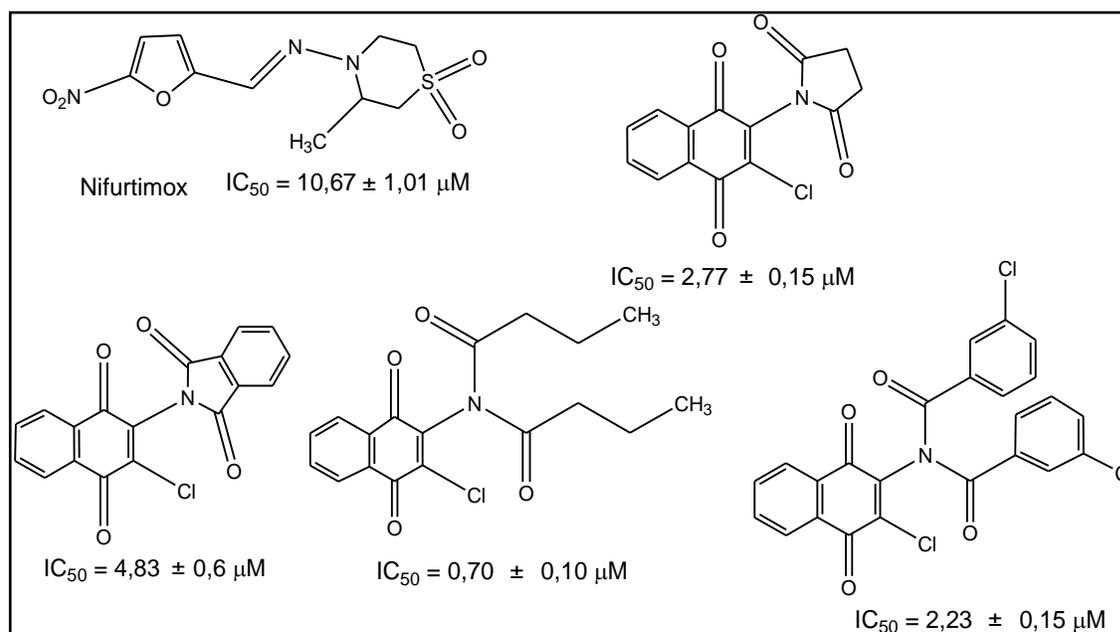


Figura 17. Comparación de IC_{50} de algunas naftoquinonas con el del Nifurtimox

HIPÓTESIS

Las variaciones estructurales de la familia de naftoquinonas en estudio, puede afectar la viabilidad celular en *trypanosoma cruzi*, mediante la formación de especies radicalarias.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad reductora y generadora de radicales libres de una familia de naftoquinonas por análisis electroquímico y de resonancia de espín electrónico (REE) y la posible actividad tripanocida de dicha familia de moléculas.

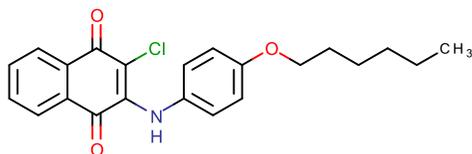
OBJETIVO ESPECÍFICOS.

- 1) Caracterizar el comportamiento electroquímico, evaluando las vías de reducción electroquímica, en medio aprótico de dimetilsulfóxido (DMSO), por voltametría cíclica de una serie de naftoquinonas.
- 2) Evaluar la formación y el atrapamiento de radicales libres en sistemas químicos y biológicos, utilizando la espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE).
- 3) Evaluar la toxicidad de la familia de naftoquinonas en estudio, en *Trypanosoma cruzi* y células macrófagos.

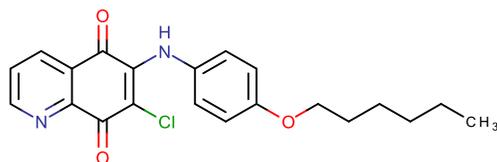
ESTRUCTURAS DE p- NAFTOQUINONAS EN ESTUDIO

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, en esta tesis se estudiaron las siguientes familias de moléculas, derivadas de la p-naftoquinona.

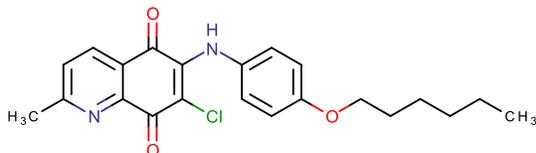
NAFQ 1: 2-cloro-3- (4-hexiloxi-fenilamino) - [1,4] naftoquinona



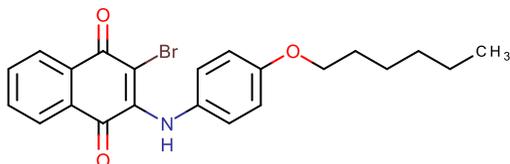
NAFQ 2: 7-cloro-6- (4-hexiloxi-fenilamino) quinolina-5,8-diona



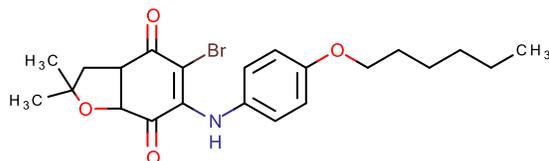
NAFQ 3: 7-cloro-6- (4-hexiloxi-fenilamino) -2-metil-quinolina-5,8-diona



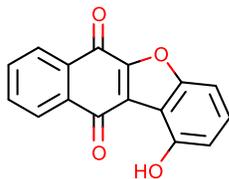
NAFQ 4: 2-bromo-3- (4-hexiloxi-fenilamino) - [1,4] naftoquinona



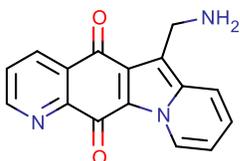
NAFQ 5: 5-bromo-6- (4-hexiloxi-fenilamino) -2,2-dimetil-2,3,3a, 7a-tetrahidro-benzofuran-4,7-diona



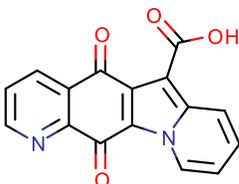
NAFQ 6: 1-hidroxi-benzo [b] nafto [2,3-d] furan-6,11-diona



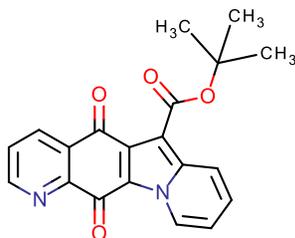
NAFQ 7: 6- (aminometil) 5H, 12H-indolizino [2,3-g] quinolina-5,12-diona



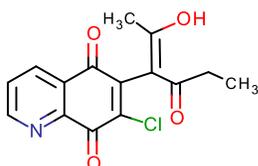
NAFQ 8: ácido-5,12-dioxo-5H, 12H-indolizino [2,3-g] quinolina-6-carboxílico



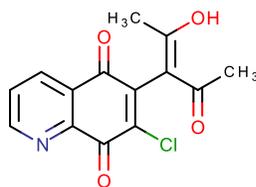
NAFQ 9: ter-butilo 5,12-dioxo-5H, 12H-indolizino [2,3-g] quinolina-6-carboxilato de metilo



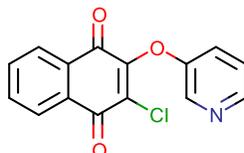
NAFQ 10: 7-cloro-6 - [(2Z) -2-hidroxi-4-oxohex-2-en-3-il] -5,8-dihidroquinolina-5,8-diona



NAFQ 11: 7-cloro-6-[(2Z)-2-hidroxi-4-oxopent-2-en-3-il]-5,8-dihidroquinolina-5,8-diona

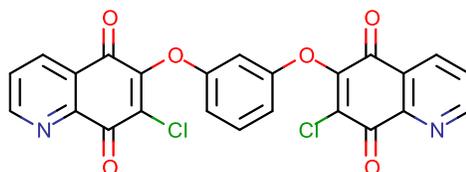


NAFQ 12: 2-cloro-3-(piridin-3-iloxi)-1,4-dihidronaftaleno-1,4-diona



NAFQ 13: 7-cloro-6-{3-[(7-cloro-5,8-dioxo-5,8-dihidroquinolin-6-il)oxi]fenoxi}

-5,8-dihidroquinoline-5,8-diona



METODOLOGÍA DE TRABAJO, MATERIALES Y EQUIPOS

- **Voltametría cíclica (V.C)**

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica que se utiliza para tener información sobre mecanismos de reacciones químicas asociadas a procesos de óxido-reducción. Se fundamenta en el barrido lineal de potencial de un electrodo estacionario de trabajo que va en una dirección finalizando en un potencial establecido llamado potencial switching, que luego realiza un barrido en dirección contraria a la inicial. Se mide la corriente en función del potencial aplicado, registrando el correspondiente voltamograma de la curva de corriente (I) versus potencial (E). Del voltamograma se obtienen las corrientes de pico anódico (I_{p_a}) y de pico catódico (I_{p_c}), como asimismo, los potenciales correspondientes de pico anódico (E_{p_a}) y de pico catódico (E_{p_c}).

A partir del análisis de los voltamogramas, se puede determinar si las reacciones de transferencia electrónica ocurridas son de tipo reversibles, cuasirreversibles o irreversibles.

1- Reacciones de tipo reversibles:

Se caracteriza porque la intensidad de pico catódico (I_{p_c}) y pico anódico (I_{p_a}) son iguales y porque los valores de potenciales catódico (E_{p_c}) y anódico (E_{p_a}), son constantes en todo el rango de velocidades de barrido de potencial. Para este sistema el potencial normal de reducción corresponde a la semisuma de E_{p_c} y E_{p_a} , ($E_{1/2}$).

De acuerdo a lo anterior los criterios para determinar si una reacción es reversible son:



- $\Delta E_p = 60 \text{ mV}$, independiente de la velocidad de barrido
- $\frac{I_{p_a}}{I_{p_c}} = 1$, en todo el rango de velocidades de barrido de potencial

La determinación del valor absoluto de $\frac{I_{p_a}}{I_{p_c}}$, se lleva a cabo a través de la ecuación propuesta por N. Nicholson (Nicholson R. and Shain I., 1964):

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{i_{pa_0}}{i_{pc_0}} + \frac{(0,485)(i_{p_{\lambda_0}})}{i_{pc_0}} + 0,086 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

i_{pa_0} = Intensidad de corriente de pico anódico obtenido del voltamograma.

i_{pc_0} = Intensidad de corriente de pico catódico, obtenido del voltamograma.

$i_{p_{\lambda_0}}$ = Intensidad de corriente de pico del potencial de switching

Si la onda obtenida en el voltamograma, es totalmente reversible, significa que no hay reacciones asociadas y, por ende, el radical generado es estable.

2- Reacciones cuasirreversibles

Son aquellas en que las intensidades de pico anódico y catódico son diferentes, del mismo modo, los potenciales anódico y catódico varían con la velocidad de barrido.

Los sistemas de este tipo siguen los siguientes criterios:

- E_p varía con la velocidad de barrido
- ΔE_p , aproximadamente 60 mV a bajas velocidades y aumenta a velocidades mayores.
- El voltamograma se aproxima a un sistema irreversible al aumentar la velocidad de barrido
- $\frac{i_{pa}}{i_{pc}} \neq 1$

3- Reacciones irreversible:

- E_p , varía con la velocidad de barrido
- $\frac{i_{pa}}{i_{pc}} \neq 1$, no hay corriente de barrido de vuelta
- $\Delta E_p \neq 60$ mV

Además, existe la posibilidad de la presencia de reacciones químicas acopladas a la reacción electroquímica según R. N. Nicholson y J. Shain.

La voltametría cíclica se llevó a cabo en un equipo Metrohm 693 VA provisto de un convertidor 694 VA Stand, un procesador 693 VA y una celda de tres electrodos. Como solvente se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO p.a. $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), bajo una atmósfera de

nitrógeno, a temperatura ambiente, con perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito de soporte ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), como electrodo auxiliar un alambre de platino y como electrodo de referencia, un electrodo de calomelano saturado (SCE). Se trabajó a velocidades de barrido entre 100 y 2000 mVs^{-1} y en algunos casos hasta 5000 mVs^{-1} (Olea-Azar, Abarca et al. 2005).

- **Resonancia de espín electrónico (REE)**

La resonancia de espín electrónico, es una técnica de detección de radicales libres, especies que tienen uno o más electrones desapareados en su estructura. En ausencia de campo magnético el momento magnético de espín, del electrón libre tiene igual energía, sin embargo, cuando se aplica un campo magnético se produce un desdoblamiento y se generan dos poblaciones de electrones que difieren en su energía y presenta espines opuestos. La diferencia de energía es proporcional a la intensidad del campo magnético aplicada. Para lograr la transición electrónica, la REE utiliza radiación de microondas.

La detección de los radicales libres de las muestras estudiadas, se realizó generándolos por medio de una reducción electroquímica, aplicando potenciales correspondientes a los Epc encontrados por voltametría cíclica. La muestra estaba disuelta en DMSO con electrolito de soporte de PTBA, en atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente. (Olea-Azar, Abarca et al. 2005).

Los espectros de REE se registraron usando un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X ($9,75 \text{ GHz}$) equipado con una cavidad rectangular de 50 KHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento experimentales, serán obtenidas mediante simulación de espectros usando el programa WINEPR SimFonia v1.25 y estimadas con una precisión de $0,05 \text{ G}$.

Los espectros encontrados para cada muestra entregan información sobre la intensidad del campo magnético al cual se produce la transición electrónica, la señal encontrada está relacionada con la cantidad de radical libre formado, por otro lado, el número de líneas del

espectro se relaciona con la interacción entre el momento magnético y el momento magnético nuclear, es decir, la interacción hiperfina.

Para estudiar estos compuestos en sistemas biológicos fue necesario utilizar la técnica denominada atrapamiento de espín (Spin Trapping), la cual ha surgido como una interesante herramienta, que ha tenido en el último tiempo un incremento tanto en su desarrollo como en importancia para comprender la cinética de reacción y los mecanismos de ciertas reacciones, lipoperoxidación, reacciones de tipo Fenton y en reacciones *in vivo* / *in vitro* de tipo enzimáticas.

El surgimiento de los atrapadores de radicales libres se basa en la adición de radicales libres a compuestos tales como los nitroso compuestos y las nitronas. El producto de esta reacción, un nitróxido (más conocido como aducto de espín) presenta un tiempo de vida media considerablemente mayor al del radical libre sin atrapar.

Las nitronas (Figura 18.a) son los atrapadores de radicales libres más usados en la actualidad, debido a que permiten la caracterización de radicales libres de gran interés biológico como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y varios otros radicales secundarios formados principalmente de la reacción entre el radical hidroxilo con diversos objetivos celulares. Uno de los atrapadores de radicales libres más usados es el N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina, DMPO (Figura 18.b).

En un esquema general, las nitronas pueden atrapar especies radicales de acuerdo a la Figura 18.a.

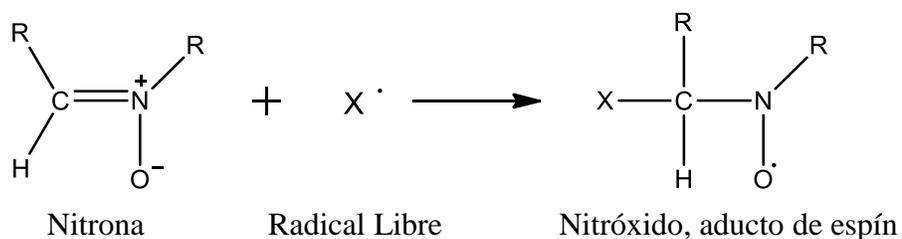


Figura 18.a Representación generalizada para la reacción entre una nitrona y un radical libre. Se muestra la formación del aducto de espín formado.

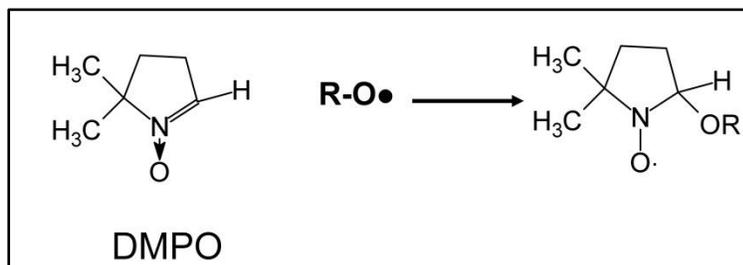


Figura 18.b. Reacción de DMPO con radical

Ensayos biológicos

- **Actividad tripanocida y muerte celular por reducción de sales de tetrazolio (MTT)**

Los ensayos biológicos tienen por objetivo determinar la citotoxicidad de los compuestos en estudio, para ellos se debe determinar la concentración del compuesto necesaria para reducir una población de células conocida, al 50%. Este valor denominado IC₅₀, se determinó por la técnica MTT.

El ensayo MTT, consiste en la reducción metabólica del tetrazolio, sal de color amarillo, correspondiente al bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que es producida por una enzima reductasa mitocondrial que depende del NADPH, por lo que la reducción solo se produce en células vivas, transformándola en un compuesto de color púrpura, llamado formazán, que presenta su máxima absorbancia a 570 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado.

En estos ensayos de muerte celular, se empleó un cultivo de la línea celular VERO y los parásitos se extrajeron desde un cultivo de células VERO infectadas con tripomastigotes (cepa Dm28), en un medio de cultivo RPMI suplementado al 5% con suero fetal bobino. Se extrajo el medio de cultivo con los tripomastigotes en suspensión. Los parásitos se diluyeron a una concentración de $1,0 \times 10^7$ parásitos mL⁻¹.

En el caso de células VERO se utilizaron $2,0 \times 10^5$ células/mL. La siembra se realizó en una placa de 96 pocillos (placa tipo Elisa). Se preparó distintas concentraciones de la droga en

DMSO, la concentración final del DMSO fue inferior al 1%. Las drogas se diluyeron en RPMI y fueron agregadas a los pocillos, se incubaron durante 24 H a 37°C (4% CO₂) para el tratamiento. Se extrajo el medio de cultivo RPMI con droga, para ello se centrifugó y se cambió el medio de cultivo RPMI (100 µL). Luego se añadió el MTT [5 mg/ml] (10µL) a cada pocillo. Se hizo blancos en triplicado (el blanco consta de RPMI sin rojo fenol (100 µL) y MTT (10 µL). Se esperó 4 horas para que los parásitos metabolizaran el MTT y se agregó el solubilizante SDS 10% HCl 0,01N (incluidos los blancos y controles), se incubó durante la noche. Al día siguiente se midió en el espectro fotómetro multiplaca (Asys expert plus) a una longitud de 570 nm.

Actividad citotóxica en macrófagos

Con el objeto de evaluar la actividad tripanocida de las moléculas en estudio, se realizó ensayos biológicos de citotoxicidad de ellas en macrófagos. Para este ensayo, se utilizó un cultivo de macrófagos de la línea celular RAW 264,7. Se sembrarán 5×10^4 células por pocillo, diluidas en medio de cultivo celular activo RPMI. El estudio se realizó utilizando la reducción MTT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I- Resultados de estudio electroquímico: Voltametría cíclica

El comportamiento electroquímico de las naftoquinonas estudiadas en esta tesis, se realizó utilizando la técnica de voltametría cíclica, aplicando barridos de potencial a diferentes velocidades. Se trabajó con concentraciones de 1 mmolL^{-1} de cada compuesto, en medio aprótico de dimetilsulfóxido, usando como electrolito soporte una solución de perclorato de tetrabutilamonio $0,1 \text{ molL}^{-1}$. El barrido de velocidad se realizó, generalmente, entre 250 mVs^{-1} y 5000 mVs^{-1} .

Para las moléculas NAFQ 1, NAFQ 4, NAFQ 7, NAFQ 8 y NAFQ 9 se obtuvieron voltamogramas similares, con dos cuplas de redox (Figura 19).

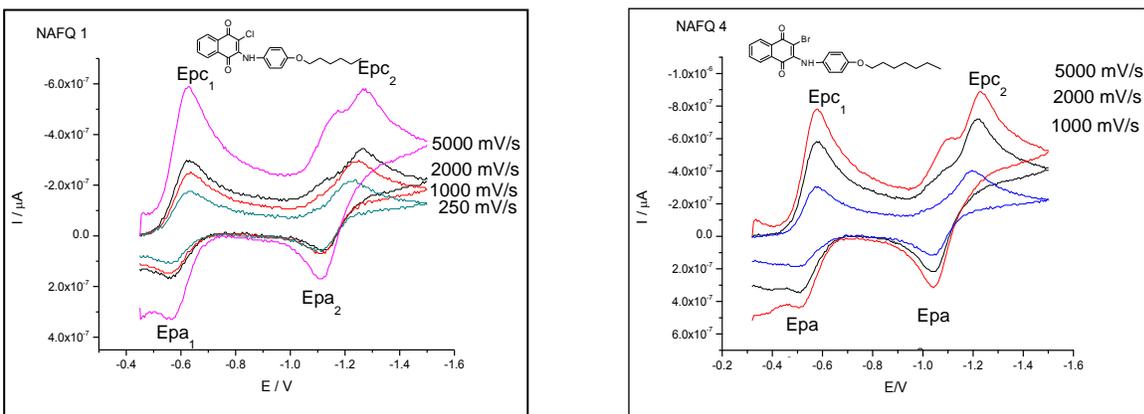
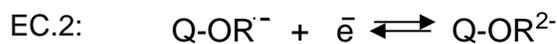
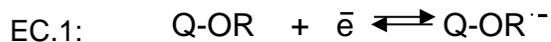


Figura 19. Voltamograma de NAFQ 1 y NAFQ 4 (1 mmolL^{-1}) en medio aprótico (DMSO + $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PTBA) a distintas velocidades (entre 250 y 5000 mVs^{-1}).

De acuerdo a los criterios de reversibilidad, estas cuplas corresponden a un proceso de transferencia monoeléctronica cuasirreversible, cuyo transporte es controlado por difusión. La primera cupla está relacionada con la reducción de la quinona a semiquinona (EC.1), radical aniónico es relativamente estable a temperatura ambiente, y fue detectado por resonancia de espín electrónico. La segunda cupla, también cuasirreversible, estaría relacionada con la reducción de la semiquinona al dianión correspondiente (EC.2). El mecanismo propuesto para la reacción sería:



Al realizar barridos sucesivos a una misma velocidad (2000 mVs^{-1}), se obtuvieron voltamogramas en donde se solapan las señales (Figura 20), evidenciando que la reacción corresponderían a una transferencia monoeléctrica, sin acoplamiento de otra reacción química:

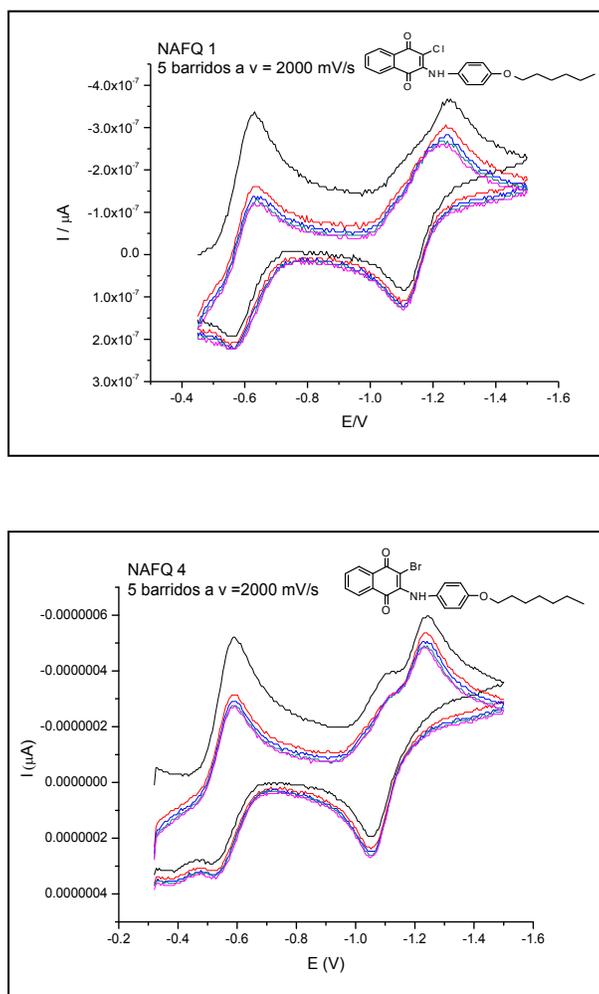


Figura 20. Voltamogramas a barridos sucesivos de NAFQ 1 y NAFQ 4, a velocidad de 2000 mVs^{-1}

En la Figura 21 se muestra la dependencia lineal de la intensidad de corriente de pico catódico con la velocidad de barrido para los compuestos NAFQ 1 y NAFQ 2, que son similares a lo que ocurre en los otros compuestos. Las pendientes son cercanas a 0,5, lo que indicaría que los procesos de transferencia electrónica estudiados son cuasirreversibles de tipo difusivo.

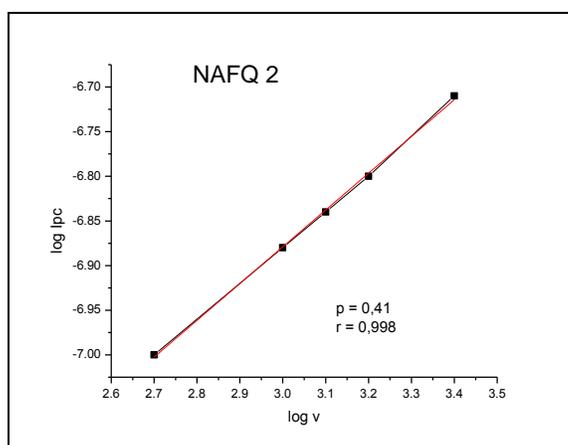
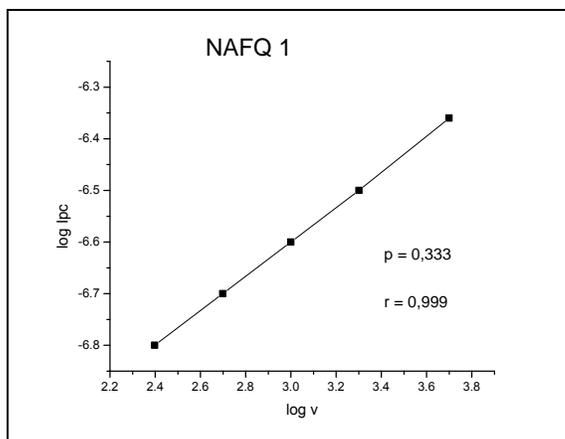


Figura 21. Dependencia de la intensidad del pico catódico con la velocidad para NAFQ 1 y NAFQ 2

Para la molécula NAFQ 2, se obtuvo un voltamograma con dos cuplas redox, Figura 22, se observan cuatro picos de reducción, con potenciales $E_{pc_1} = -0,51$ V, $E_{pc_2} = -0,72$ V, $E_{pc_3} = -1,05$ V y $E_{pc_4} = -1,17$ V, el segundo y tercer picos catódicos tienden a desaparecer a bajas velocidades y en los voltamogramas de barridos sucesivos por lo que podría tratarse de reacciones químicas acopladas, correspondiente a un posible proceso de autoprotonación. Además, se observan dos picos de oxidación, con potenciales iguales a $E_{pa_1} = -0,44$ V y $E_{pa_4} = -1,03$ V, correspondientes con los picos E_{pc_1} y la E_{pc_4} .

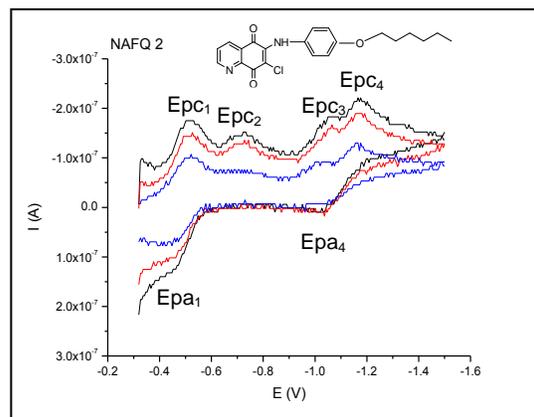
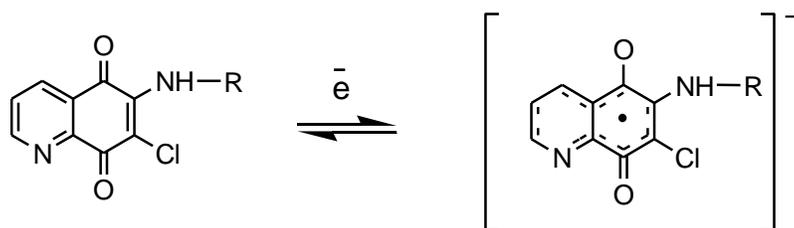


Figura 22. Voltamograma de NAFQ 2 (1 mmolL^{-1}) en medio aprótico (DMSO + 0,1 M PTBA) a velocidades entre 250 y 5000 mVs^{-1}

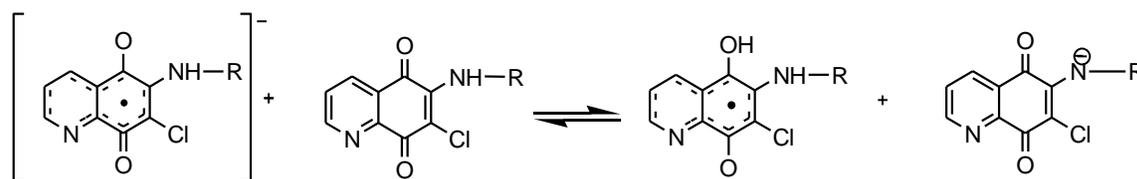
En el voltamograma de la Figura 22, Epc₁ correspondería a la reducción de la quinona a semiquinona, el pico Epc₂, de acuerdo a la literatura, podría corresponder a una autoprotonación de la semiquinona durante la transferencia del primer electrón, esto puede ocurrir dada la existencia de protones lábiles en las moléculas (grupos -NH- o grupos -OH). El pico Epc₃, podría corresponder a una reacción química de autoprotonación de la semiquinona y finalmente, el pico Epc₄ correspondería a la reacción electroquímica de formación de la hidroquinona protonada.

El mecanismo propuesto para este proceso, correspondería a dos reacciones electroquímicas, correspondientes a las reducciones de la naftoquinona hasta la hidroquinona y dos reacciones químicas intermedias, que podrían corresponder a autoprotonaciones, el proceso se esquematiza a través de las ecuaciones presentadas en la Figura 23:

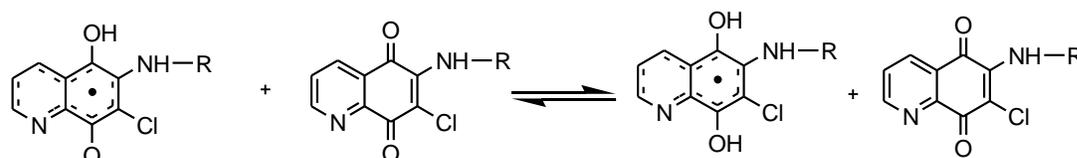
Reacción 1 (electroquímica):



Reacción 2 (química):



Reacción 3 (química):



Reacción 4 (electroquímica):

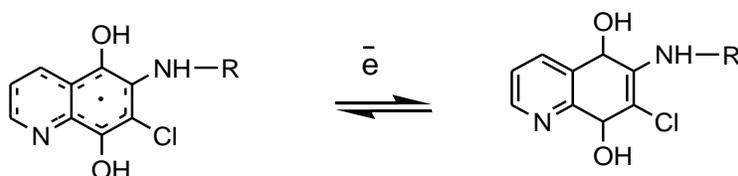


Figura 23. Posible mecanismo para la reducción del compuesto NAFQ 2

Al analizar los voltagramas de barridos sucesivos (Figura 24), a una velocidad de 2000 mVs^{-1} para el compuesto NAFQ 2, se observa que desaparece uno de los picos catódicos, marcado con un círculo rojo.

En el caso del voltamograma de la NAFQ 3, a diferencia de la NAFQ 2, se mantienen los tres picos catódicos. Las señales no se acoplan, lo que podría deberse a una reacción química de autoprotonación debido a la presencia de hidrógenos lábiles y al efecto inductivo del grupo metilo en la posición C-6, que actúa como donador de electrones.

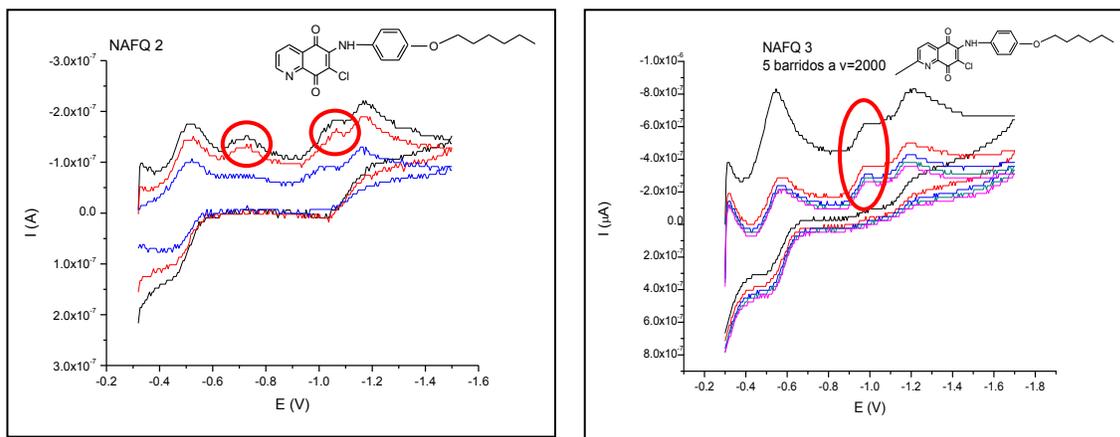


Figura 24. Voltamograma de cinco barridos sucesivos de NAFQ 2 y NAFQ 3, a velocidad de 2000 mVs^{-1}

Para las moléculas NAF 6, NAFQ 11 y NAFQ 12, se obtuvieron voltamogramas similares, que tienen en común la presencia de dos picos catódicos y un solo pico anódico. Siendo el primer proceso de reducción irreversible y el segundo reversible, por lo que podría haber una reacción química asociada. Por lo tanto, en estas moléculas se producen dos reacciones electroquímicas de reducción de la p-naftoquinona y una reacción química.

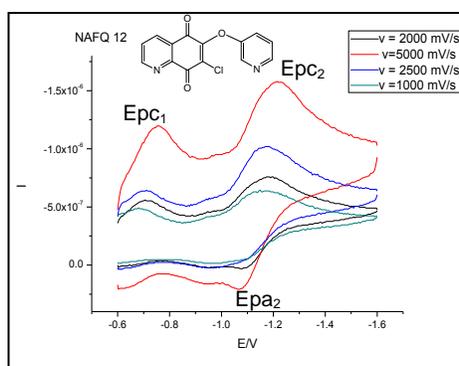


Figura 25. Voltamograma de NAFQ 12, a velocidades entre 1000 y 5000 mVs^{-1}

Para el compuesto NAFQ 12, el potencial de pico anódico es correspondiente con el segundo potencial de reducción, para el primer pico de reducción no hay pico anódico, tal como se muestra en la Figura 25.

Con respecto a la molécula NAFQ 13, presentó un voltamograma con una cupla correspondientes al un pico catódico y un pico anódico, lo que es consecuente con un proceso reversible en donde solo se produciría la reducción de la quinona a semiquinona.

Respecto a la NAFQ 10, esta molécula presentó un voltamograma que presenta solo un pico catódico sin presentar oxidación, lo que estaría acorde a un proceso irreversible.

Tabla 1. Datos electroquímicos obtenidos en los ensayos de Voltametría cíclica a velocidad de 2000mVs⁻¹.

Compuesto	E _{pc1} /V	E _{pa1} /V	E _{1/2} /V	ΔE _{p1} /V	I _{pa1} /I _{pc1} *	E _{pc2} /V	E _{pa2} /V	E _{1/2} /V	ΔE _{p2} /V
NAFQ 1	-0,63	-0,56	-0,60	0,07	1,01	-1,25	-1,11	-1,18	0,07
NAFQ 2**	-0,51	-0,44	-0,48	0,07	2,37	-1,17	-1,03	-1,10	0,14
NAFQ 3	-0,52	-0,42	-0,47	0,10	1,24	-1,16	-1,03	-1,09	0,06
NAFQ 4	-0,58	-0,51	-0,54	0,06	0,15	-1,22	-1,04	-1,74	0,70
NAFQ 5	-0,53	-0,52	-0,53	0,01	0,49	-1,33	-	-	-
NAFQ 6	-0,63	-0,42	-0,53	0,21	0,09	-1,22	-	-	-
NAFQ 7	-0,66	-0,57	-0,62	0,09	0,55	-1,32	-1,22	-1,27	0,05
NAFQ 8	-0,52	-0,42	-0,47	0,10	2,27	-1,11	-1,01	1,06	0,10
NAFQ 9	-0,76	-0,58	-0,67	0,18	0,62	-1,08	-1,01	1,05	0,07
NAFQ 10	-1,63	-1,43	-1,53	0,20	0,15	-	-	-	-
NAFQ 11	-0,64	-	-	-	-	-0,97	-	-	-
NAFQ 12	-0,71	-	-	-	-	-1,18	-1,08	1,13	0,10
NAFQ 13	-0,79	-0,52	-0,66	0,27	0,21	-	-	-	-
Nifurtimox***	-0,91	-0,85	-0,06	-0,88	1,01	-	-	-	-
Benznidazol	-1,33								

* Datos calculados a través de la ecuación 1.

** Solo se consideraron las reacciones de óxido - reducción

*** Datos de la literatura (Arce L. et al., Mercado, R., 2010))

En la NAFQ 2 se consideraron solo dos picos catódicos, E_{pc1} y E_{pc4}, ya que el segundo y tercer pico, E_{pc2} y E_{pc3} desaparecen a bajas velocidades y por lo tanto, se consideró que corresponde a una reacción química acoplada y no a la reducción de la naftoquinona.

Al analizar los datos electroquímicos de la Tabla 1, se observa que solo uno de los compuestos (NAFQ 10), presentan un potencial de reducción mayor que el Nifurtimox. Esto implica que las naftoquinonas estudiadas tendrían mayor facilidad que el Nifurtimox para reducirse.

II. Resultados de estudios de espectroscopía de espín electrónico

Se realizó el estudio espectroscópico a través de REE para caracterizar directamente los radicales libres generados por las naftoquinonas. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones en que se midieron los parámetros electroquímicos, aplicando el potencial de pico catódico encontrado por Voltametría cíclica.

Con respecto a las condiciones del espectrómetro, fueron: frecuencia de microonda 9,75 GHz, poder de microonda 20 mW, modulación de amplitud 0,98 G, ganancia del receptor 10 db.

Los espectros encontrados fueron similares en todos los compuestos. En general, presentaron solo una señal correspondiente al anión radical semiquinona. A continuación, se presenta, como ejemplo, el espectro del compuesto NAFQ 7 (Figura 26), a un potencial similar al encontrado por voltametría cíclica.

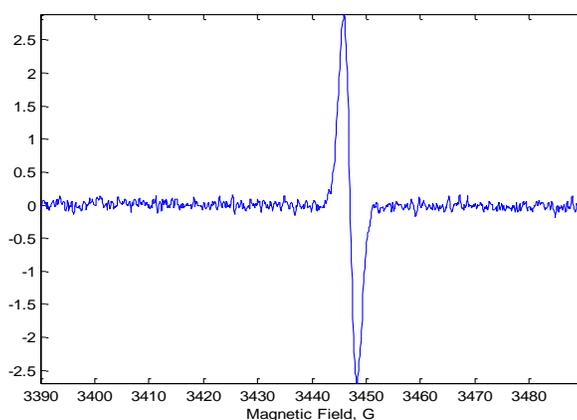


Figura 26. Espectro REE del compuesto NAFQ 7

El compuesto NAFQ 10, presento un espectro que muestra un doblete, lo que estaría indicando pequeños desdoblamientos hiperfinos (Figura 27). Estos desdoblamientos

corresponderían al átomo de nitrógeno con una constante de 1,37 G y al átomo de hidrogeno con una constante de 0,98 G.

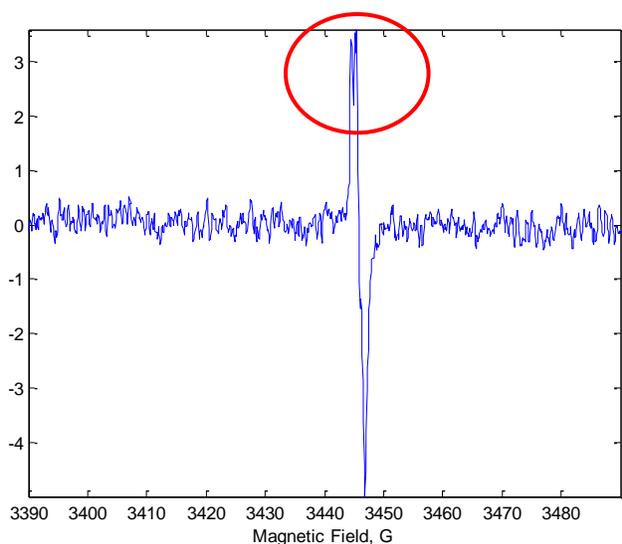


Figura 27. Espectro REE de la NAFQ 10

III. Resultados de estudio de REE en la generación biológica de radicales libre

Se procedió a la detección y caracterización de radicales libres generados en medio biológico, específicamente en células parasitarias. A través de esta metodología fue posible establecer la capacidad que poseen los compuestos estudiados para generar radicales libres y/o estrés oxidativo a nivel celular.

Las células parasitarias de *Trypanosoma cruzi*, en estado morfológico epimastigote. La Figura 28 presenta el espectro REE blanco, el cual contiene células de parásito, DMPO y NADPH en ausencia de las quinonas estudiadas. No se observó ninguna línea REE lo que indica que a la sensibilidad de esta técnica no existe la generación de especies radicalarias en este medio biológico.

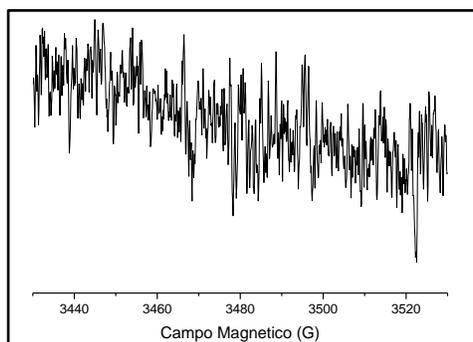


Figura 28. Espectro de REE de epimastigote (8-10 mgproteína/mL)+ NADPH (1mM) + DMPO (100 mM), a temperatura ambiente

Al agregar el compuesto NAFQ10 al blanco, el espectro encontrado se muestra en la Figura 29. El espectro compuesto por siete líneas es consistente con la presencia de dos radicales distintos uno correspondiente al aducto DMPO-quinona (señalado con flechas rojas) y una señal bien definida (singlete) correspondiente a la generación biológica del anión radical semiquinona. Las constantes de acoplamiento en el primer caso corresponden a la interacción del electrón desapareado con un núcleo de nitrógeno ($a_N = 15,95$ G) y con un núcleo de hidrógeno ($a_H = 23,00$ G). Similares resultados se observaron para todos los compuestos estudiados en esta tesis. Estos resultados indicarían que el medio biológico produce la especie quinona radicalaria, sin embargo no se evidenció la presencia de especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo o superóxido, lo cual demuestra un mecanismo no radicalario para explicar la actividad tripanocida de esta familia de naftoquinonas.

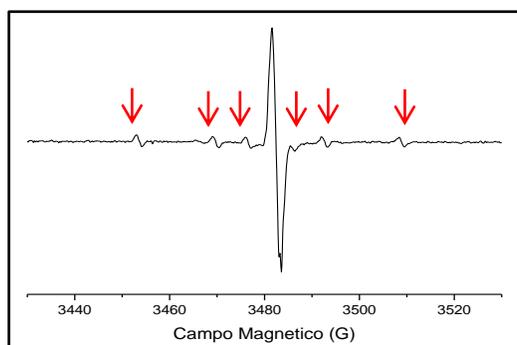


Figura 29. Espectro de REE de epimastigote (8-10 mgproteína/mL)+ NADPH (1mM) + DMPO (100 mM), a temperatura ambiente + NAFQ 10 en DMSO(1 mM)

CÁLCULOS COMPUTACIONALES

Se llevaron a cabo cálculos computacionales utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) para racionalizar los pequeños desdoblamientos hiperfinos observados en el espectro del compuesto NAFQ 10. Al analizar las isosuperficies de las densidades de espín para los compuestos NAFQ 7 (Figura 30) y NAFQ 10 (Figura 31) se observa que la deslocalización se extiende principalmente sobre los heterociclos y en ambos compuestos es prácticamente homogénea. Un análisis de las poblaciones de Mulliken no reflejan un cambio significativo en la densidad de espín sobre los átomos de hidrógeno. Esto indica que la presencia del halógeno (Cl) mediante efecto inductivo estabiliza el anillo y la variación de 0,002 en los valores de Mulliken explicarían el pequeño desdoblamiento hiperfino.

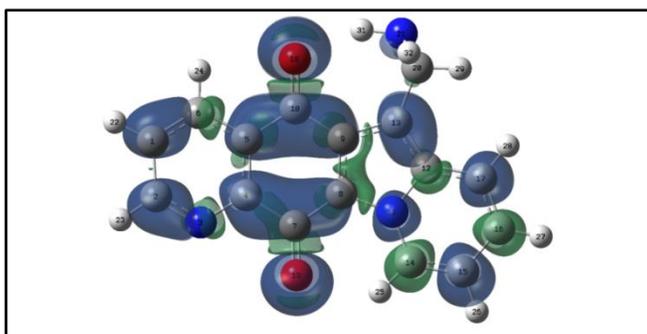


Figura 30. Distribución electrónica del radical de la molécula NAFQ 7

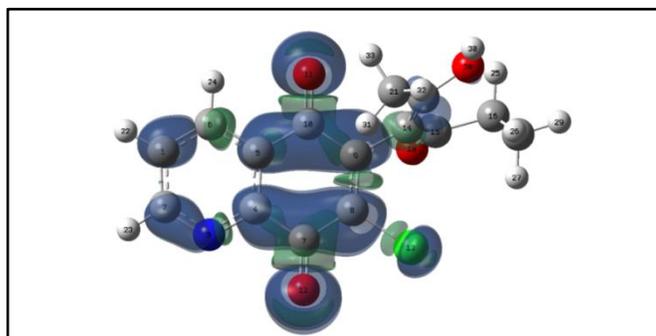


Figura 31. Distribución de densidad electrónica para radical de la molécula NAFQ 10

RESULTADOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los resultados de los ensayos de actividad biológica a través de la reducción de MTT se resumen en la tabla 2. Los resultados son expresados como el promedio de 3 experimentos independientes con un error menor al 10% en todos los casos. Los resultados representan el % tripomastigotes o células viables con respecto al control.

Tabla 2. Resultados de ensayos de actividad biológica viables por MTT e IC_{50} .

Molécula	10 μ M	100 μ M	IC_{50}	Epc_1
NAFQ 1	99	86	>100	-0,63
NAFQ 2	11	20	$0,349 \pm 0,089$	-0,51
NAFQ 3	79	74	>100	-0,52
NAFQ 4	40	10	$85,74 \pm 7,50$	-0,58
NAFQ 5	85	76	>100	-0,53
NAFQ 6	23	12	$0,29 \pm 0,02$	-0,63
NAFQ 7	100	96	>100	-0,66
NAFQ 8	70	100	>100	-0,52
NAFQ 9	22	5	$11,26 \pm 1,02$	-0,76
NAFQ 10	5	1	$0,12 \pm 0,01$	-1,63
NAFQ 11	9	1	$0,28 \pm 0,02$	-0,64
NAFQ 12	10	2	$1,27 \pm 0,10$	-0,71
NAFQ 13	17	6	$2,36 \pm 0,22$	-0,79
Nifurtimox			$16,19 \pm 0,22^*$	-0,91*
Benznidazol			$103,6 \pm 0,6^*$	-1,33*

*Datos de literatura

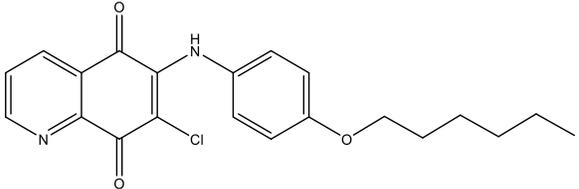
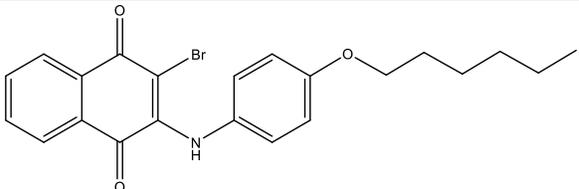
Los resultados de la Tabla 2, indican que siete de las trece moléculas presentan mejores propiedades tripanocidas que las del Nifurtimox y del Benznidazol, desde el punto de vista de los IC_{50} encontrados para dichos compuestos.

Resultados de estudio en macrófago

Para determinar una primera aproximación de la citotoxicidad de esta familia, se realizó un ensayo con macrófago, utilizando la reducción de MTT, en dos de las moléculas NAFQ 2 y NAFQ 4. Los resultados se muestran en la Tabla 3, al comparar estos datos se observa que la NAFQ 2 cumple con el requisito de todo fármaco de ser más tóxico en el medio parasitario que en el macrófago, sin embargo, tiene mayor toxicidad que el Nifurtimox y que el

Benznidazol. En la molécula NAFQ 4, ocurrió lo contrario, esta molécula es mayormente tóxica en el macrófago que en el parásito, no siendo, entonces, una alternativa para seguir estudiando como tripanocida y también tiene mayor toxicidad que el Nifurtimox y que el Benznidazol.

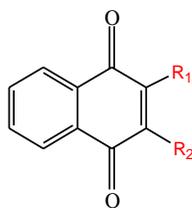
Tabla 3. Estudio en macrófagos de los compuestos NAFQ 2 y NAFQ 4

Moléculas	IC ₅₀ Tripomastigote Dm28 [μM]	IC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7[μM]
 <p>(2)</p> <p>Exact Mass: 384,12</p>	0,349 ± 0,089	29,19 ± 2,19
 <p>(4)</p> <p>Exact Mass: 427,08</p>	85,78 ± 7.50	15,74 ± 0,49
Nifurtimox	22,79	266
Benznidazol	38,0	121

ANÁLISIS RELACIÓN ESTRUCTURA- ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y POTENCIALES DE REDUCCIÓN DE LAS NAFTOQUINONAS ESTUDIADAS.

Al analizar los resultados biológicos y electroquímicos, se pueden establecer algunos análisis respecto de la relación estructura- actividad citotóxica y potenciales de reducción de las naftoquinonas estudiadas.

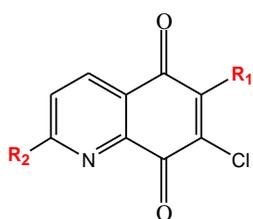
A continuación, se hace un análisis de las moléculas estudiadas en esta tesis, agrupada por estructuras quinónicas similares y comparando sus IC_{50} en relación a parámetros electroquímicos, estérico y de lipofilia. Este último parámetro se rescató de la literatura y se presenta en cada tabla que resume las propiedades de las moléculas analizadas.



Molécula	R ₁	R ₂
NAFQ 1	-Cl	
NAFQ 4	-Br	

Compuesto	E _{pc1/V}	IC ₅₀	Log p
NAFQ 1	-0,63	>100	3,54
NAFQ 4	-0,58	85,74±7,50	3,81

La presencia de bromo en la NAFQ 4, produce en la molécula un potencial de reducción menor con respecto a la que tiene cloro, probablemente por la mayor electronegatividad del bromo, que por efecto inductivo estaría dando una mayor estabilidad al radical formado. Este menor potencial de reducción coincide con una mayor lipofilia de la molécula. Con respecto a su acción tripanocida se observa que el compuesto NAFQ 4 presenta una mayor actividad biológica que la NAFQ 1, sin embargo, esta está muy por debajo de las drogas utilizadas actualmente para tratar la enfermedad, por lo que quizás, no sería una opción para futuras investigaciones.



Molécula	R ₁	R ₂
NAFQ 2		-H
NAFQ 3		-CH ₃
NAFQ 10		-H
NAFQ 11		-H
NAFQ 12		-H
NAFQ 13		-H

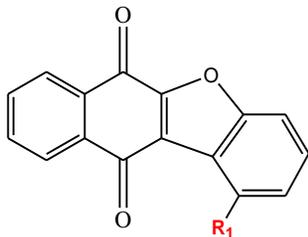
Compuesto	Epc ₁ /V	IC ₅₀	Log P
NAFQ 2	-0,51	0,34±0,089	2,63
NAFQ 3	-0,52	>100	3,33
NAFQ 10	-1,63	0,12±0,01	-0,89
NAFQ 11	-0,64	0,28±0,02	-1,15
NAFQ 12	-0,71	1,27±0,11	0,63
NAFQ 13	-0,79	2,36±0,22	0,07

Este grupo resulta ser el que posee el menor IC₅₀, es decir, resultan ser los derivados de naftoquinona más potentes en términos de actividad biológica. Según la relación estructura-actividad biológica, se puede establecer que los derivados hidroxilados clorados presentan

un menor IC_{50} con respecto a los derivados que presentan radicales más voluminosos, como el radical piridina (NAFQ 12), debido a la elevada liposolubilidad de 12 y 13 y debido a la mayor masa molar de los radicales, se dificultarían su paso a través de las membranas celulares. Un resultado interesante es que la NAFQ 10 a pesar de su baja lipofilia tenga una actividad tripanocida significativa, quizá la presencia de un enlace doble en el radical hidroxilado aumentaría su capacidad intercalante de ADN, sería interesante evaluar el radical hidroxilado en ausencia del enlace doble.

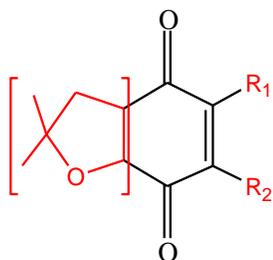
Al comparar estas moléculas se observa que, con excepción de la NAFQ 3, todas tienen muy buenos valores de IC_{50} , demostrando una potente actividad tripanocida. Desde el punto de vista estructural, la NAFQ 3 es la única que presenta el grupo metilo en la posición denominada R_2 , todas las demás tienen H. Al compararla con la NAFQ 2, con la cual tiene en común el R_1 , se observa una gran diferencia en el IC_{50} , lleva a pensar que la presencia del grupo metilo tiene una influencia muy fuerte en la capacidad tripanocida de la molécula. Las demás moléculas presentan valores de IC_{50} mucho mejores que los de las drogas actualmente usadas, por lo que resultan ser los derivados más potentes en términos de actividad biológica y sería potenciales moléculas tripanocidas para seguir estudiando.

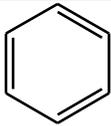
Las NAFQ 10 y 11 resultan ser las de menor IC_{50} , la presencia de un enlace doble en el radical hidroxilado podría estar aumentando su capacidad intercalante de ADN, sería interesante evaluar el radical hidroxilado en ausencia del enlace doble. Se puede concluir claramente que entre las moléculas NAFQ 10 y NAFQ 11, el aumento del largo de cadena carbonada del radical hidroxilado, disminuye el IC_{50} , lo que estaría mejorando la liposolubilidad del fármaco, facilitando de esta forma su transporte a través de las membranas biológicas.



Molécula	R ₁	Epc ₁	IC ₅₀	Log P
NAFQ 6	-OH	-0,63	0,29±0,02	1,70

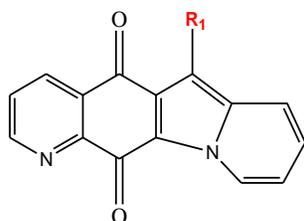
La NAFQ 6, muestra un valor de IC₅₀ que indicaría una gran actividad tripanocida, mucho mayor que la de las drogas actualmente utilizadas (Nifurtimox y Benznidazol), la presencia del grupo OH en la posición R₁.



Molécula	Anillo de la izquierda
NAFQ 4	
NAFQ 5	

Compuesto	Epc ₁ /V	IC ₅₀	Log p
NAFQ 4	-0,58	85,74±7,50	3,81
NAFQ 5	-0,52	>100	2,51

Con respecto a la molécula NAFQ 5, presenta un IC₅₀ >100, por lo que no sería una opción como droga tripanocida, a pesar de tener una buena lipofilia (2,51). Al compararla con la NAFQ 4, se observa que R₁ y R₂, son iguales, solo varía el anillo de la izquierda, que en el caso de NAFQ 5, sería el responsable de la disminución del IC₅₀



Molécula	R ₁	IC ₅₀	Log P
NAFQ 7		> 100	0,07
NAFQ 8		> 100	0,57
NAFQ 9		11,26 ± 1,02	1,71

Compuesto	Epc ₁ /V	IC ₅₀	Log p
NAFQ 7	-0,66	>100	0,06
NAFQ 8	-0,52	>100	0,57
NAFQ 9	-0,76	11,26 ± 1,02	1,71

En esta serie de moléculas se observa que la NAFQ 7 y NAFQ 8, presentan una menor actividad tripanocida que NAFQ 9, podría explicarse por la presencia de hidrógenos lábiles en los grupo -NH- y -OH, que podrían, en este caso disminuir su capacidad tripanocida.

CONCLUSIONES

- 1- Todas las moléculas estudiadas en esta tesis, mostraron su capacidad de reducirse electroquímicamente con mecanismo electroquímicos puros o con la presencia de reacciones químicas. En todos los mecanismos se evidenció posteriormente la presencia de especies radicalarias.
- 2- Los mecanismos de reducción para las especies estudiadas implicaron, en algunos casos, a parte de las reacciones electroquímicas, reacciones de autoprotonación, debido, probablemente, a la presencia de hidrógenos lábiles ubicados específicamente en el grupo –NH- y a la presencia de algunos grupos –OH.
- 3- Con excepción del compuesto NAFQ 10, todas las naftoquinonas presentaron potenciales de reducción menores que el Nifurtimox (-0,91 V) y que el Benznidazol (-1,33 V), medidos en medio aprótico de DMSO.
- 4- Los estudios de resonancia de espín electrónico muestran que las familias estudiadas generan el correspondiente anión radical semiquinona, observándose una gran deslocalización sobre la estructura lo que se refleja en la única señal existente. Los cálculos computacionales corroboran la deslocalización al analizar las isosuperficies de las densidades de espín.
- 5- Los ensayos biológicos de REE confirman que estas naftquinonas no generan estrés oxidativo en las células de *T. cruzi*, debido a que no se observa ningún patrón hiperfino asociado al radical hidroxilo u otra especie reactiva de oxígeno como el radical superóxido. Además, es posible observar la formación del aducto DMPO-quinona y la señal del anión radical semiquinona.
- 6- La actividad biológica de las naftoquinonas estudiadas se ve afectada directamente por los grupos que sustituyen el anillo 1,4-naftoquinona. Los mecanismos de reacción implican procesos redox y ácido-base.

7- Existen varios derivados de las familias de naftoquinonas estudiadas en esta tesis, con mayor potencial tripanocida que las drogas actualmente utilizadas, que podrían seguir siendo investigadas, en su parte biológica y farmacológica, como eventuales alternativas al Nifurtimox o Benznidazol.

Bibliografía

- Abad-Franch, F., W. S. Santos, et al. (2010). "Research needs for Chagas disease prevention." *Acta Trop* **115**(1-2): 44-54.
- Abarca, B., B. Ballesteros, et al. (2004). "Triazolopyridines. Part 24: New polynitrogenated potential heliacting ligands." *Tetrahedron* **60**: 5785–5792.
- Arce L. ^{a,b}, Mastrantonio G. ^c, Marsón M.E. ^c y Carama J. A. Comportamiento electroquímico del benzimidazol en solventes no acuosos
^a INIFTA, Diag. 113 y 64. La Plata, ARGENTINA. E-mail: carama@inifta.unlp.edu.ar
^b Área de Toxicología, Depto. Cs. Químicas, FCEyN-UNLPam
^c Área de Toxicología, Depto. Cs. Biológicas, FCE-UNLP
- Babich H. and Stern, J. *Appl. Toxicol.*, 1993, 13, 353-358.
- Balassiano I.T., De Paulo S.A., Silva N.H., Cabral M.C., Carvalho M.C., 2005. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis *Oncology Reports*, 13: 329-333.
- Bitter S. Gorohovski O., Paz-Tal L., Becker J.Y., 2002 Synthesis, electrochemical and spectral properties of some w-u-uinonyl amino acids. *Amino acids*, 22:71-93.
- Buckner, F. S. and J. A. Urbina (2012). "Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease." *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **in press**.
- Bourguignon S.C.; Cavalcanti D.F.B.; De Souza A.M.T.; Castro H.C.; Rodrigues .R.; Albuquerque M.G.; Dilvani S.O.; Gomes Da Silva G.; Da Silva F.C.; Ferreira V.F.; Pinho R.T.; Alves C.R. *Experimental Parasitology*, 2011, 127, 160.
- C. A.; de Castro, S. L., *Eur. Journal. Med. Chem.* 2008, 43, 1774 Comportamiento electroquímico del benzimidazol en solventes no acuosos
- Cavalli, A. and M. L. Bolognesi (2009). "Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*." *J Med Chem* **52**(23): 7339-7359.
- Coura, J. and Dias, J. *Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009, vol.104, suppl, pp. 31-40.
- Chen, C. K., P. S. Doyle, et al. (2009). "Trypanosoma cruzi CYP51 inhibitor derived from a Mycobacterium tuberculosis screen hit." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(2): e372.
- Chen, C. K., S. S. Leung, et al. (2010). "Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(4): e651.
- D Silva, E. N., Jr., R. F. Menna-Barreto, et al. (2008). "Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*." *Eur J Med Chem* **43**(8): 1774-1780.
- Da Silva Júnior, E.N.; Souza, M.V; Pinto, A.V; Pinto, M. C. F. R; Ferreira, V. F; Manna-Barreto, R. F.S.; Teixeira, D. V.; de SiLida Arcea, b, Guido Mastrantonio, c, María Elena Marsón, c y José A. Carama

- De Vas, M. G., P. Portal, et al. (2011). "The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway." *Int J Parasitol* **41**(1): 99-108.
- Docampo, R., F. S. Cruz, et al. (1978). "Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in beta-lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." *Arch Biochem Biophys* **186**(2): 292-297.
- Doyle Patricia S., Chen Chiung-Kuang , et al. (2010). "A Nonazole CYP51 Inhibitor Cures Chagas' Disease in a Mouse Model of Acute Infection." *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **Vol. 54**(No. 6): p. 2480–2488.
- Hall, B. S., C. Bot, et al. (2011). "Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites." *J Biol Chem* **286**(15): 13088-13095.
- Hall, B. S. and S. R. Wilkinson (2012). "Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(1): 115-123.
- Hargrove, T. Y., Z. Wawrzak, et al. (2011). "Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*." *J Biol Chem* **286**(30): 26838-26848.
- Hata, M., Y. Ishii, et al. (2010). "Inhibition of ergosterol synthesis by novel antifungal compounds targeting C-14 reductase." *Med Mycol* **48**(4): 613-621.
- Hernández, L., Gómez M., F.I. González, I. González, C. Fontana, Towards a molecular level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin>: an electrochemical and apectroelectrochemical approach. *Org. Biomol.Chem*, 2009, 7, 1896-1903
- Ji, H., W. Zhang, et al. (2000). "A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals." *J Med Chem* **43**(13): 2493-2505.
- Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK (2012) The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 10: 221-247.
- Lepesheva, G. I., T. Y. Hargrove, et al. (2010). "Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* **285**(33): 25582-25590.
- Lepesheva, G. I., H. W. Park, et al. (2010). "Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections." *J Biol Chem* **285**(3): 1773-1780.
- Liendo, A., K. Lizardi, et al. (1998). "In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*." *J Antimicrob Chemother* **41**(2): 197-205.
- Liendo, A., G. Visbal, et al. (1999). "Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes." *Mol Biochem Parasitol* **104**(1): 81-91.
- Maya, J. D., B. K. Cassels, et al. (2007). "Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**(4): 601-620.
- Meyer, H. and G. G. Holz, Jr. (1966). "Biosynthesis of lipids by kinetoplastid flagellates." *J Biol Chem* **241**(21): 5000-5007.

- Nicholson, R.: Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible and Kinetic System. Anal Chem. 1964. 36 (4). 706-723
- Olea-Azar, C., B. Abarca, et al. (2008). "ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridyl pyridyl ketones and dipyrindyl ketones derivatives." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **71**(2): 703-709.
- Olea-Azar, C., B. Abarca, et al. (2005). "ESR and electrochemical studies of 2-acylpyridines and 6,6'-diacyl-2,2'-bipyridines." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **61**(9): 2261-2266.
- Pagano, M., B. Demoro, et al. (2009). "Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones." Eur J Med Chem **44**(12): 4937-4943.
- Parks, L. W. and W. M. Casey (1995). "Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast." Annu Rev Microbiol **49**: 95-116.
- Pinto V.A.; Lisboa de Castro S.; Molecules, 2009, 14, 4570-4590.
- Z.F. Plyta et al., "Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives", BIOORG MED, 8(23), 1998, pp. 3385-3390
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.
- Rodriguez, J., A. Gerpe, et al. (2009). "Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies." Eur J Med Chem **44**(4): 1545-1553.
- Salas C. et al., Natural and Synthetic Napthoquinones Active Against Trypanosoma Cruzi; An Initial Step Towards New Drugs fir Chagas Disease, Current Medicinal Chemistry, 2011, 18, 144-161
- Samon-Chemin, L. et al, 2-and 3-Substituted 1,4-napthoquinones derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J. Med. Chem.*, 2001, 44-548-565
- Sheng, C., X. Che, et al. (2011). "Design and synthesis of novel triazole antifungal derivatives by structure-based bioisosterism." Eur J Med Chem **46**(11): 5276-5282.
- Stoppani A. Quimioterapia de la enfermedad de chagas, Medicina (Buenos Aires) 1999; 59 (sup.II): 147-165
- Urbina, J. A. (2010). "Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches." Acta Trop **115**(1-2): 55-68.
- Urbina, J. A., G. Payares, et al. (1998). "Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1771-1777.
- Urbina, J. A., G. Payares, et al. (2003). "In vitro and in vivo activities of ravuconazole on Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease." Int J Antimicrob Agents **21**(1): 27-38.
- Vieites, M., L. Otero, et al. (2009). "Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-Trypanosoma cruzi activity." J Inorg Biochem **103**(3): 411-418.
- Vieites, M., L. Otero, et al. (2008). "Platinum(II) metal complexes as potential anti-Trypanosoma cruzi agents." J Inorg Biochem **102**(5-6): 1033-1043.

Wang, B. L., Y. X. Shi, et al. (2010). "Synthesis and biological activity of some novel trifluoromethyl-substituted 1,2,4-triazole and bis(1,2,4-triazole) Mannich bases containing piperazine rings." *J Agric Food Chem* **58**(9): 5515-5522.

Xu, J., Y. Cao, et al. (2011). "Design, synthesis and antifungal activities of novel 1,2,4-triazole derivatives." *Eur J Med Chem* **46**(7): 3142-3148.