

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS FARMACÉUTICAS



**ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE LOS COMPLEJOS DE
INCLUSIÓN DE CICLODEXTRINAS EN DERIVADOS
HETEROCICLOS POLINITROGENADOS Y SU EVALUACIÓN
QUÍMICA-BIOLÓGICA COMO POTENCIALES AGENTES
TRIPANOCIDAS**

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

ANTONIO EDUARDO RAMOS AGUAYO

Director de Tesis: Dr. Claudio Olea Azar

Co-director de Tesis: Dr. Michel Lapier Quezada

Santiago-CHILE

Diciembre 2021

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 y Memoria de Título presentada por el candidato

Antonio Eduardo Ramos Aguayo

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Medicinal y Título de Química, en el examen publico rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar _____

Co-director de Tesis:

Dr. Michel Lapier Quezada _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Morales Valenzuela _____

Dr. David Vasquez Velasquez _____

Dr. Paul Jara Vergara _____

Lugar de desarrollo de la tesis:

Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

Laboratorio Farmacología Molecular y Clínico del Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad de Chile, Santiago de Chile.

Financiamiento:

Los recursos destinados para la realización de esta tesis están financiados por los Proyecto de los directores Prof. Dr. Claudio Olea Azar FONDECYT Regular N° 1190340 y Dr. Michel Lapier Quezada Proyecto de iniciación N°11180712.

EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de esta tesis han sido expuestos en:

XLI CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FARMACOLOGIA (SOFARCHI)

Concepción, Chile, 4-8 de noviembre de 2019.

“EFECTO BIOLÓGICO DE NUEVAS TRIAZOLOPIRIDINAS CONTRA MACRÓFAGOS MURINOS”.

Biological effect of novel Triazolopyridines against macrophages murine.

Ramos-Aguayo A¹; Lapier M¹⁻²; Olea-Azar C¹; Maya J²

XXXIII Jornadas Chilenas de Química

Puerto Varas, Chile, 7-10 de enero de 2020.

“SÍNTESIS RACIONAL, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE TRIAZOLOPIRIDINA”

(Presentación oral)

A. Ramos, M. Lapier, M. Moncada, C Olea-Azar.

⁷ De modo que, en los tiempos futuros, Dios puede ponernos como ejemplos de la increíble riqueza de la gracia y la bondad que nos tuvo, como se ve en todo lo que ha hecho por nosotros, que estamos unidos a Cristo Jesús.

⁸ Dios los salvó por su gracia cuando creyeron. Ustedes no tienen ningún mérito en eso; es un regalo de Dios.

⁹ La salvación no es un premio por las cosas buenas que hayamos hecho, así que ninguno de nosotros puede jactarse de ser salvo.

¹⁰ Pues somos la obra maestra de Dios. Él nos creó de nuevo en Cristo Jesús, a fin de que hagamos las cosas buenas que preparó para nosotros tiempo atrás.

(Efesios 2:7-10)

AGRADECIMIENTOS

Darle las gracias a Dios, por la posibilidad de estudiar en esta universidad y por ayudarme en todo este proceso, gracias Señor por tu amor y fidelidad.

Darle las gracias a mi familia a mis padres por el apoyo, el cariño y porque este logro es tanto mío como de ustedes. Gracias a mis hermanos Orielle y Jorge porque son una bendición para mi vida, al igual que Danae quien fue fundamental en esta etapa de mi vida, y a mi primo Greg por su afecto. Darle la gracia a Dios por ponerme en mi vida a Daniel, a Camila y poder participar del grupo universitario cristiano de la facultad.

Agradezco el apoyo de mis profesores tutores, Profesor Claudio Olea y Michel Lapier, por su paciencia, dedicación y su gran afecto al enseñarme.

Agradezco también a todos mis compañeros del laboratorio de radicales libres y antioxidantes, a Mauricio, Josue, Francisco, Gabriela, la profesora Carolina gracias por su cariño y ayuda (como olvidar los almuerzos de pandemia).

Agradecer a mis amigos que estuvieron en este proceso y a los grandes amigos que hice en esta etapa, especialmente a Gabriel (negrito), cuántas conversaciones en microclima, Tomás (tomates) el cfg de la huerta sin ti no hubiese sido lo mismo, Vicente (vicho) los mejores partidos de ping-pong de mechones, Alejandra, Juan Pablo y sus apuntes.

Mis amigos del Lastarria Francisco (Cbzon), Baltasar (el chico), Maximiliano (chokito) cuantas juntas en la casa del cbzon y cuantas más.

Agradecer a toda la gente que conocí en la facultad y en la universidad, que, de alguna forma, me ayudaron a mi formación como profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ABREVIATURAS (X; XVIII)

1. INTRODUCCION (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)	1
1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS	1
1.1.1. Ciclo biológico del <i>Trypanosoma Cruzi</i>	2
1.1.2. Cuadro clínico	5
1.1.3. Tratamientos en la actualidad	6
1.2. SISTEMAS BIOLÓGICOS; AZOLES, TRIAZOLES	9
1.2.1. Biosíntesis de esteroides	9
1.2.2. Compuestos heterociclos: derivados de triazolopiridina.....	16
1.3. CICLODEXTRINAS	20
1.3.1. Complejos de inclusión	20
1.3.2. Estudios computacionales de los complejos de inclusión; Docking	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
2.1. Hipótesis.....	28
2.2. Objetivo general.....	28
2.3. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIALES Y EQUIPOS	30
3.1. materiales	30
3.2. Equipos.....	31

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	32
4.1. Preparación de los complejos de inclusión.....	32
4.2. Preparación cultivos celulares.....	37
5. METODOLOGIAS	38
5.1. Caracterización de los distintos complejos formados	38
5.2. Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos de inclusión	43
5.3. Estudios de modelación molecular	45
5.4. Estudio de evaluación de viabilidad celular por citometría de flujo	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO [TP4- β-CD]	48
6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS: (SERIE TP1, TP2 Y TP3) ..	53
6.2.1. Complejos [β -CD-TP1], [β -CD-TP2] y [β -CD-TP3].....	53
6.2.2. Complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].	58
6.2.3. Complejos [HP- β -CD-TP1], [HP- β -CD-TP2] y [HP- β -CD-TP3].	64
6.3. CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA. Elección de los complejos con mayor Ka	68
6.3.1. Complejos seleccionados para estudio termodinámico [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].	68
6.3.2. Complejo [M- β -CD-TP1] a las distintas temperaturas.....	71
6.3.3. Complejo [M- β -CD-TP2] a las distintas temperaturas.....	74
6.3.4. Complejos [M- β -CD-TP3] a las distintas temperaturas.....	77
6.3.5. Comparación de los parámetros termodinámicos entre los complejos seleccionados	80
6.3.6. Modelamiento matemático de la interacción de los complejos: Estudio Docking.....	83

6.4. ENSAYO DE VIABILIDAD CÉLULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO: incorporación de sonda zombie UV ®.....	92
6.4.1. Ensayo de viabilidad celular para TP2 compuesto libre: análisis Dot Plots.....	95
6.4.2. Ensayo de viabilidad celular complejo [M-β-CD-TP2]: análisis Dot plots	97
6.4.3. Análisis histogramas del compuesto libre TP2	99
6.4.4. Análisis histograma del complejo de inclusión [M-β-CD-TP2]	102
7. CONCLUSIONES	105
8. BIBLIOGRAFÍA	108

1.ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación del complejo de inclusión TP4.....	33
Tabla 2. Preparación del complejo de inclusión TP1.....	35
Tabla 3. Preparación de los complejos de inclusión TP2 y TP3.....	36
Tabla 4. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes al complejo [TP4-β-CD].	52
Tabla 5. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [TP1-β-CD], [TP2-β-CD] y [TP3-β-CD].....	57
Tabla 6. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [TP1-M-β-CD] [TP2-M-β-CD] y [TP3-M-β-CD].....	62
Tabla 7. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [TP1-HP-β-CD] [TP2-HP-β-CD] y [TP3-HP-β-CD].	67
Tabla 8. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes a todos los complejos de inclusión estudiados.....	69
Tabla 9. Contantes de asociación (Ka) del complejo del [M-β-CD-TP1] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C.....	72
Tabla 10. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP1].	73

Tabla 11. Contantes de asociación (Ka) del complejo del [M-β-CD-TP2] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C.....	75
Tabla 12. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP2].....	76
Tabla 13. Contantes de asociación (Ka) del complejo [M-β-CD-TP3] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C.....	78
Tabla 14. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP3].	79
Tabla 15. Resumen de los valores de los Parámetros termodinámicos de los complejos [M-β-CD-TP1], [M-β-CD-TP2] y [M-β-CD-TP3] a la temperatura de 25°C.....	81
Tabla 16. Datos obtenidos por docking para el proceso de formación para todos los complejos; (A), (B) y (C).	88
Tabla 17. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno β-CD.	90
Tabla 18. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno M-β-CD	91
Tabla 19. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno. HP-β-CD	92

1.ÍNDICE DE FIGURAS Y ECUACIONES

Figura 1. Estructura Trypanosoma cruzi..	2
Figura 2. Ciclo biológico T. cruzi.....	4
Figura 3. Estructura química Nifurtimox y Benzimidazol.....	7
Figura 4. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox y Benzimidazol.	8
Figura 5. Estructura química de los imidazoles y triazoles	10
Figura 6. Interacciones de los azoles con la isoenzima CYP450.....	11
Figura 7. Síntesis de ergosterol en hongos	12
Figura 8. Biosíntesis de esteroides en sistemas biológicos.	15
Figura 9. Familia principal triazolopiridinas.	17
Figura 10. Derivados [1,2,3]triazolo[1,5-a]piridinas (TPs), obtenidas en el laboratorio de la Dra. Belén Abarca, Valencia España.....	18
Figura 11. Estructura base de las ciclodextrinas.....	21
Figura 12. Estructuras químicas de α -CDs, β -CDs y γ -CDs.	21
Figura 13. Dimensiones geométricas aproximadas de α -CDs, β -CDs, γ -CDs...	22

Figura 14. Sitios de modificaciones químicas en la β -CD	24
Figura 15. Estequiometria de los complejos de inclusión.....	26
Figura 16. Espectro de fluorescencia con concentración fija de TP4 y una concentración creciente de β -CD a 28°C.....	50
Figura 17. Método no lineal para el complejo [TP4- β -CD] a la temperatura de 28°C.....	51
Figura 18. Espectro de absorbancia de los complejos de inclusión de TP1, TP2 y TP3 a concentración constante de 30mM y concentración de β -CD creciente	54
Figura 19. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CDs para complejos de inclusión de la serie [TP1- β -CD], [TP2- β -CD] y [TP3- β -CD]. ($r^2 = 0,937$), ($r^2 = 0,972$) y ($r^2=0,965$) respectivamente.....	56
Figura 20. Espectro de absorbancia de los complejos de inclusión TP1 a concentración constante de 30mM y concentración de M- β -CD crecientes.	59
Figura 21. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de los distintos TPs; [TP1-M- β -CD] ($r^2 = 0,992$), [TP2-M- β -CD] ($r^2 = 0,9875$) y [TP3-M- β -CD] ($r^2=0,999$)	61
Figura 22. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de los distintos TPs con [TP1-HP- β -CD] ($r^2 = 0,979$), [TP2-HP- β -CD] ($r^2 = 0,995$) y [TP3-HP- β -CD] ($r^2=0,979$)	66
Figura 23. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M- β -CD-TP1], a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C ($r^2 = 0,983$),	72

Figura 24. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M-β-CD-TP2] a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C (r ² = 0,938).....	75
Figura 25. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M-β-CD-TP1] a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C (r ² = 0,999).	78
Figura 26. Conformación estructural para los complejos (A) más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.....	85
Figura 27. Conformación estructural para los complejos (B), más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.....	86
Figura 28. Conformación estructural para el complejo (C), más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.....	87
Figura 29. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la β-CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina.....	90
Figura 30. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la M-β-CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina.....	91
Figura 31. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la HP-β-CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina.....	92
Figura 32. representación gráfica del mecanismo del fluorocromo, sonda zombie UV ®.....	94
Figura 33. Dot plot representativo de la población control de tripoastigote con TP2 libre, siendo SSC-A referencia a la complejidad de la célula y FSC-A una referencia al tamaño de la célula	96

Figura 34. Dot plot representativo del compuesto TP2 libre a distintas concentraciones de 63 μM , 125 μM y 250 μM de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.....	97
Figura 35. Dot plot representativo la población control de tripomastigote siendo SSC-A una referencia a la complejidad de la célula y FSC-A una referencia al tamaño de la célula para el complejo de inclusión [M- β -CD-TP2],.....	98
Figura 36. Dot plot representativo del complejo [M- β -CD-TP2] a distintas concentraciones de 63 μM , 125 μM y 250 μM de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.....	99
Figura 37. Histograma representativo del compuesto libre TP2 a distintas concentraciones 63 μM , 125 μM y 250 μM , vehículo en DMSO.....	102
Figura 38. Histograma representativo del complejo [M- β -CD-TP2] distintas concentraciones 63 μM , 125 μM y 250 μM , vehículo en DMSO	104

Ecuaciones	39
Ecuación 1. Equilibrio químico de los complejos de inclusión	39
Ecuación 2. Constante de asociación de los complejos de inclusión	39
Ecuación 3. Ecuación lineal de Benesi- Hildebrand	40
Ecuación 4. Ecuación lineal de Benesi- Hildebrand para fluorescencia	41
Ecuación 5. Ecuación del método no lineal es un arreglo de la ecuación de Benesi-Hilderbrand.	42
Ecuación 6. Ecuación de Van't Hoff	43
Ecuación 7. Pendiente proveniente de la ecuación de Van't Hoff	44
Ecuación 8. Intercepto proveniente de la ecuación de Van't Hoff.....	44
Ecuación 9. Energía libre de Gibbs	45
Ecuación 10. Ecuación Lucas-Abellán.....	47

ABREVIATURAS

TP1: 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 2-piridil metanona.

TP2: 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 3-piridil metanona.

TP3: 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 4-piridil metanona.

TP4: 3-Piridil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina.

TPs: Derivado de triazolopiridina

CD: Ciclodextrina.

CDs: Ciclodextrinas.

K_a: constante de asociación o inclusión.

K_{1:1}: constante de inclusión con estequiometría 1:1

M⁻¹: inverso de la concentración Molar.

β-CD: β-ciclodextrina.

M-β-CD: Metil-β-ciclodextrina.

HP-β-CD: Hidroxipropil-β-ciclodextrina.

[TPx-β-CD]: Complejo de inclusión correspondiente a un compuesto de la serie TP1, TP2, TP3 y TP4 con β-ciclodextrina.

[TPx-M-β-CD]: Complejo de inclusión correspondiente a un compuesto de la serie TP1, TP2, TP3 y TP4 con Metil- β-ciclodextrina.

[TPx-HP-β-CD]: Complejo de inclusión correspondiente a un compuesto de la serie TP1, TP2, TP3 y TP4 con Hidroxipropil-β-ciclodextrina.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de los complejos de inclusión de una nueva serie de moléculas triazólicas, conocidas como derivados de [1,2,3] triazolo [1,5-a] piridina cetona en β -ciclodextrina (β -CD), Metil- β -ciclodextrina (M- β -CD) e Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Se determinaron los parámetros termodinámicos que controlan el proceso de inclusión. Además de evaluar el efecto químico-biológico de estos compuestos como potenciales agentes tripanocida.

En primer lugar, las constantes de asociación (K_a) fueron obtenidas empleando la metodología Benesi-Hildebrand. Los resultados obtenidos mediante el uso de la técnica de espectroscopia absorción molecular y de fluorescencia, indicaron que las constantes de inclusión de todos los complejos estudiados tienen una estequiometría 1:1, con un valor constantes de inclusión para todos los complejos por sobre 200 M^{-1} .

Adicionalmente se desarrolló un estudio para determinar los parámetros termodinámicos que controlan el proceso de inclusión a partir de la determinación de sus constantes de asociación para los complejos [TP1-M- β -CD], [TP2-M- β -CD] y [TP3-M- β -CD]. Debido a que estos complejos de inclusión fueron los que presentaron mayor K_a , respecto a los otros complejos

estudiados. Estos parámetros termodinámicos fueron estudiados a distintas temperaturas (20, 28 y 37 ° C). utilizando la ecuación termodinámica de van't Hoff; los valores obtenidos indicaron que la complejación está controlado principalmente por interacciones de tipo van der Waals, las que a su vez se ven complementadas por interacciones de tipo hidrofóbicas.

Mediante el uso del programa Autodock, se realizaron estudios de modelamiento molecular empleando metodologías de *docking* con el propósito de optimizar la geometría de los complejo inclusión entre las ciclodextrinas y los heterociclos polinitrogenado, y así, estimar las contribuciones de las interacciones más importantes para la formación del complejo de asociación entre la molécula anfitrión y la molécula huésped. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos experimentales, encontrándose una buena correlación entre ellos.

Finalmente, se realizaron los estudios biológicos en *T. cruzi* en los cuales se estudiaron la viabilidad de los parásitos con la exposición de la serie de TPs libres TP1, TP2, TP3 y los complejos de inclusión [TP1–M-β-CD], [TP2–M-β-CD] y [TP3–M-β-CD]. Los estudios demostraron el complejo [TP2–M-β-CD] presento actividad frente a la forma *tripomastigote*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una enfermedad de patología zoonótica provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, parásito del género tripanosomatidae [1]. Las enfermedades parasitarias tropicales, especialmente las producidas por parásitos, son un problema de salud pública importante en muchos países latinoamericanos. No hay suficientes medicamentos para tratar estas enfermedades, y en muchos casos la industria farmacéutica no tiene suficiente interés en desarrollar nuevos medicamentos. Según datos de la OMS, esta patología afecta de 6 a 7 millones de personas y más de 25 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad alrededor del mundo [2;3], esto es debido a la migración de personas infectadas con el parásito, lo cual han permitido la propagación a otras regiones no endémicas, aumentando la distribución geográfica de la enfermedad y transformando a este padecimiento en un problema global.

1.1.1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

El *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo de la clase *Kinetoplastea*, familia *Trypanosomatidae*. del género *Trypanosoma*. Este parásito se caracteriza por poseer un solo flagelo y una sola mitocondria (**Figura 1**), dentro de este organelo, su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta zona denominada kinetoplasto.

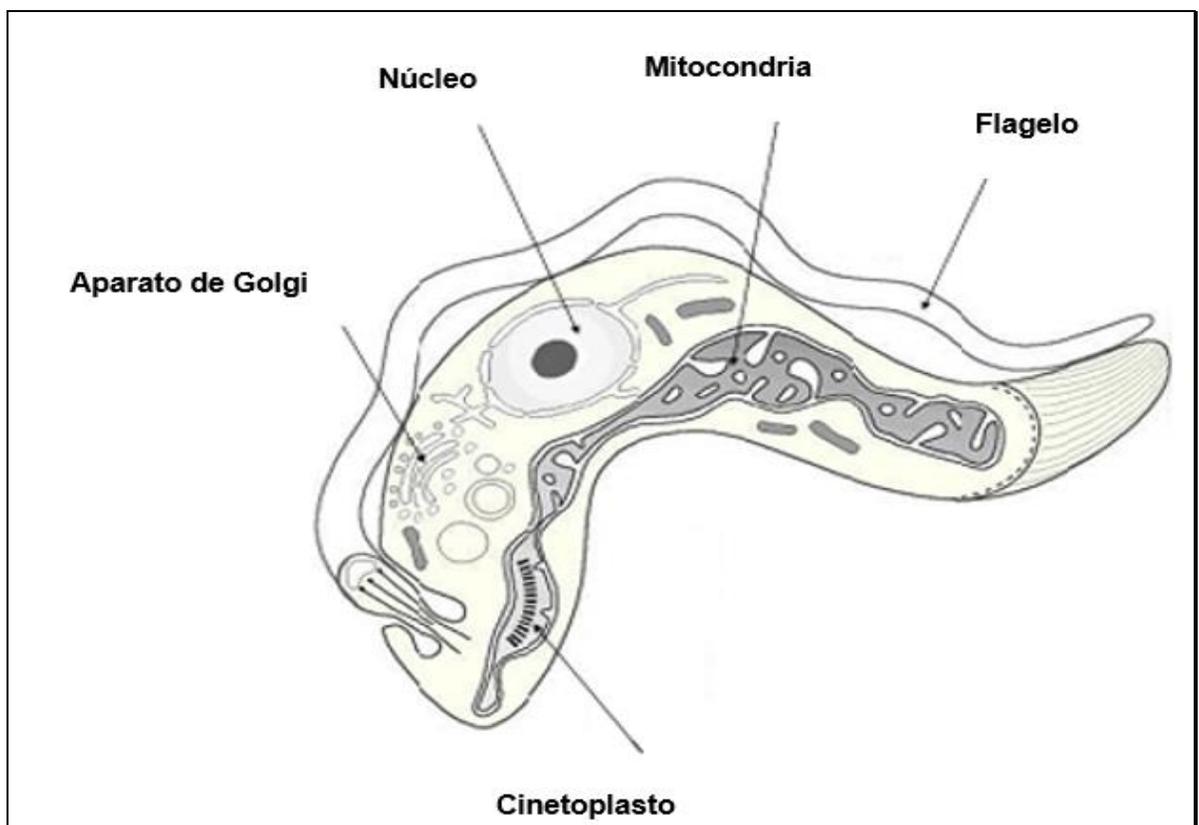


Figura 1. Estructura *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo de vida del parásito (**Figura 2**) involucra tres estadios morfológicos que dependen del hospedero, los cuales pueden ser mamífero o insecto, dependiendo en donde se encuentre el parásito, los distintos estadios morfológicos de este se diferencian por la posición relativa del flagelo, kinetoplasto, núcleo y estos son; *amastigotes* (forma replicativa intracelular), *epimastigotes* (forma replicativa, presente en el vector) y *tripomastigote* (forma infectiva no replicativa del parásito, presente en sangre de los mamíferos infectados).

Este ciclo biológico de *T. cruzi* se inicia cuando el vector triatomino (vinchuca) se alimenta de la sangre de un mamífero. Posterior a este suceso, ocurre la infección, esto es debido a que, este insecto después de alimentarse defeca cerca de la herida, esta deposición contiene una gran carga parasitaria (*tripomastigote*) presente en su intestino, y debido a un efecto mecánico de arrastre por parte del mamífero (picazón), penetran al huésped a través de la herida.

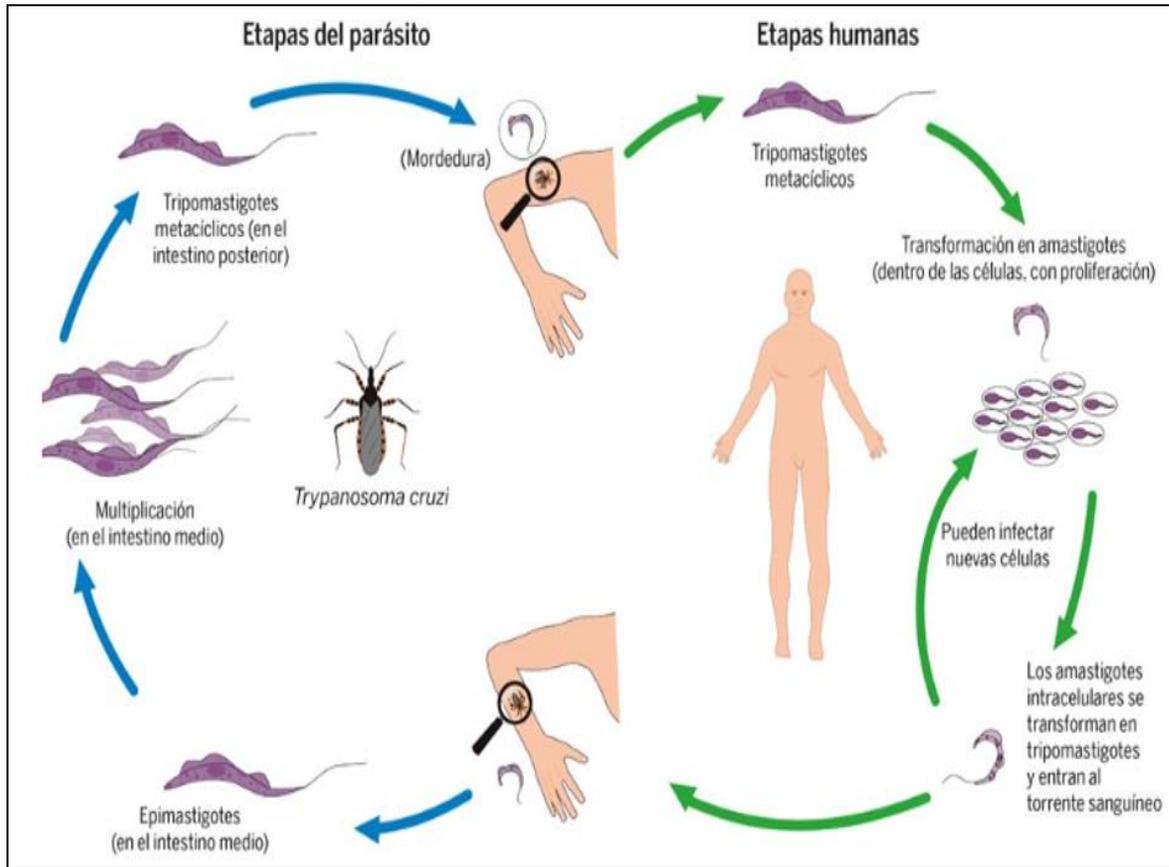


Figura 2. Ciclo biológico *T. cruzi*.

En el interior del mamífero este parásito puede ser fagocitado por macrófagos que son parte de la primera línea de defensa en este hospedero, pero es capaz de evitar la acción oxidativa del macrófago e infiltrarse al citoplasma de las células, para luego diferenciarse a *amastigotes*, posteriormente se multiplican por fisión binaria, y se diferencian en *tripomastigotes* sanguíneos (ingresa al flujo sanguíneo). Estos *tripomastigotes* infectan una gran variedad

de tejidos y se transforman en *amastigotes* intracelulares el gran número de parásitos en la célula genera lisis de la membrana plasmática dando paso a una nueva infección, es decir, es capaz de infectar a cualquier tipo de célula nucleada, iniciando un nuevo ciclo y completándose el ciclo de la enfermedad [4, 5].

1.1.2. Enfermedad de Chagas: Cuadro clínico

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: (a) fase aguda (las primeras semanas de la infección), y (b) fase crónica. Son dos fases marcadas y distintas, de la enfermedad, pero ambas podrían ser asintomáticas y mortales. Los síntomas que podría desarrollar la enfermedad pueden ser fiebre, urticaria, dolor corporal, dolor de cabeza, pérdida de apetito, entre otros [6;7;8].

La fase aguda tiene lugar en las primeras semanas de la infección, generalmente pasa desapercibida por ser asintomática, solo en algunos casos se presentan signos y síntomas leves. Un signo característico inicial “es como” una lesión cutánea o llamado Romana, el cual involucra una hinchazón, inflamación amoratada de un párpado generado por herida dejada por la picadura del insecto. Asimismo, pueden presentar fiebre, dolor de cabeza,

agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico [9; 10].

Durante la fase crónica, la infección, se caracteriza por una baja parasitemia (concentración de parásitos en sangre), ya que los parásitos general y principalmente permanecen en el músculo cardiaco y digestivo. Puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan: complicaciones cardíacas un 30%, y otras complicaciones como, por ejemplo; digestivas un 10%, que pueden incluir megaesófago o megacolon [2;8;9].

1.1.3. Enfermedad de Chagas: Tratamientos en la actualidad

Los fármacos disponibles actualmente son; Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ) (**Figura 3**), presentan baja eficacia y variados efectos adversos tales como anorexia, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, depresión de la médula ósea e hipersensibilidad [11;12]. Por ende, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, con el objetivo de contar con fármacos más eficaces contra la enfermedad y con menos efectos adversos de los que se utilizan en la actualidad.

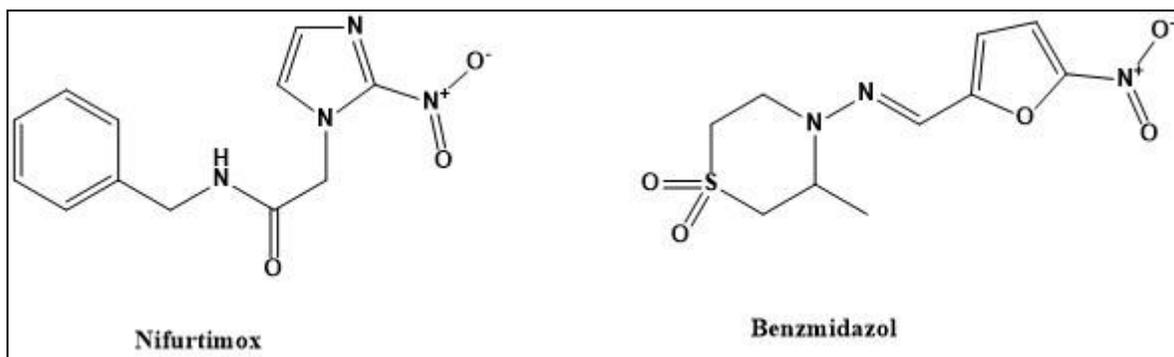


Figura 3. Estructura química Nifurtimox y Benzimidazol.

Se ha propuesto que un posible mecanismo de acción para estos compuestos implica la generación de especies radicalarias durante su metabolismo. El parásito *T. cruzi* es susceptible al daño celular inducido por estos metabolitos activos, debido a que los mecanismos de defensa del parásito contra el estrés oxidativo son precarios en relación con las células mamíferas [9].

Asimismo, la reducción intracelular del grupo nitro y su interacción con el oxígeno molecular induce la formación de un ciclo redox, lo que aumenta la formación de especies altamente reactivas y la formación de intermediarios

electrofílicos que causan daño oxidativo por reacción con biomacromoléculas o indirectamente por generación de radicales libres [8; 9].

El mecanismo de acción más aceptado, tanto para, Nifurtimox y Benznidazol es mediado por el grupo nitro de ambas drogas, el cual es reducido a un radical nitro anión mediante la acción de nitrorreductasas. Esto induce la formación de numerosos radicales libres y metabolitos electrofílicos, tal como se indica en la **Figura 4**.

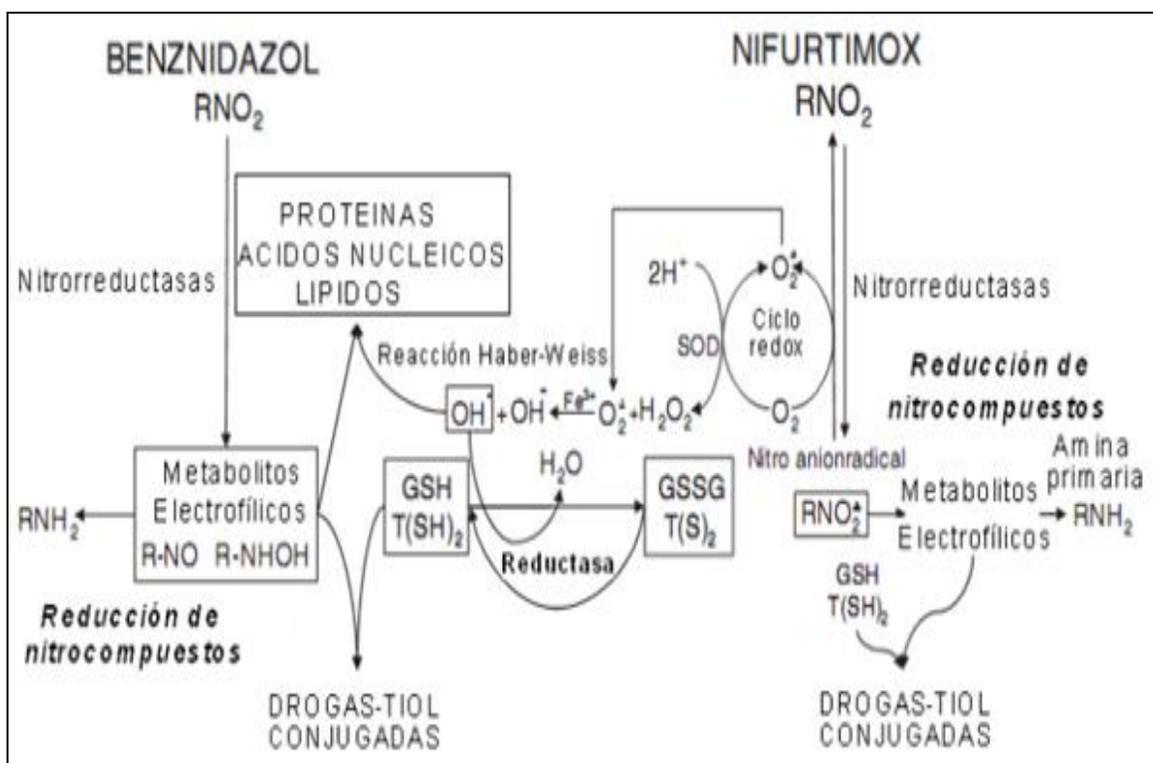


Figura 4. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox Benznidazol.

1.2. Sistemas biológicos, Azoles; Triazoles

1.2.1. Biosíntesis de esteroides.

Un blanco interesante para el diseño de compuestos con actividad contra *T. cruzi* es la ruta metabólica de la síntesis de esteroides. En mamíferos el principal esteroide producido es el colesterol, en comparación a otros organismos como los hongos que producen ergosterol.

Los azoles (**Figura 5**) son un grupo de moléculas que se han caracterizado por presentar actividad antimicótica, actúan inhibiendo el complejo citocromo P450 del hongo (**Figura 6; 7**), principalmente la enzima 14- α desmetilasa (CYP51), esta es una proteína análoga al citocromo P450 humano. Se ha descrito que, a concentraciones altas *in vitro*, del orden, Micromolar. Los azoles son fungicidas; y a bajas concentraciones, del orden de Nanomolar, son fungistáticos.

En estudio de relación estructura-actividad revela que el anillo imidazol puede ser reemplazado por el anillo 1,2,4-triazol sin afectar las propiedades antifúngicas de la molécula.

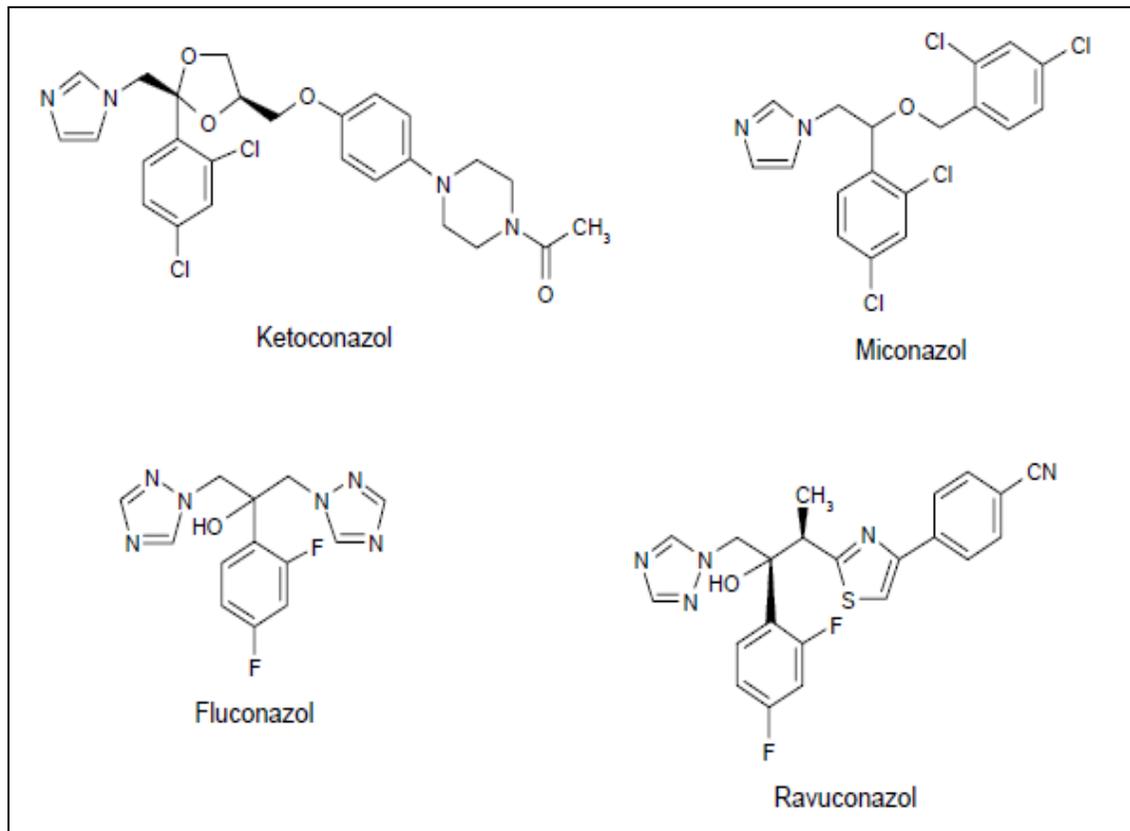


Figura 5. Estructura química de los imidazoles y triazoles.

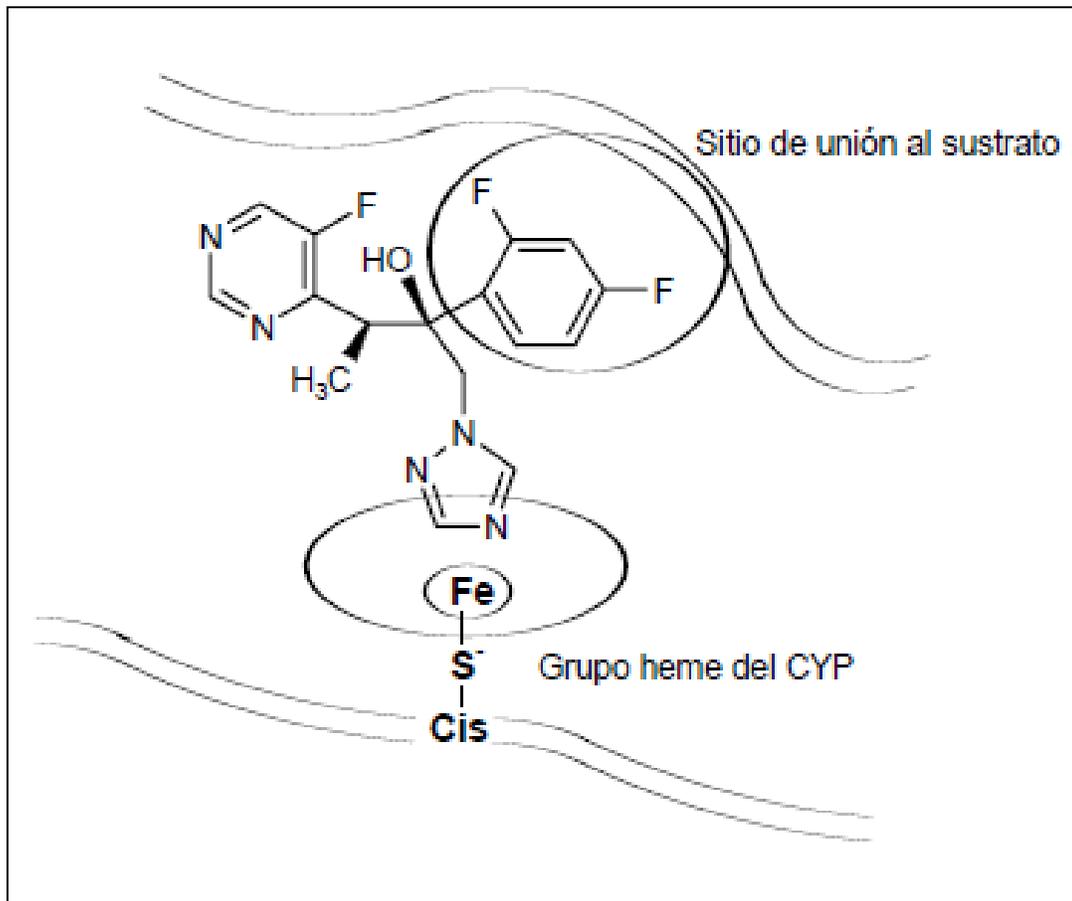


Figura 6. Interacciones de los azoles con la isoenzima CYP450.

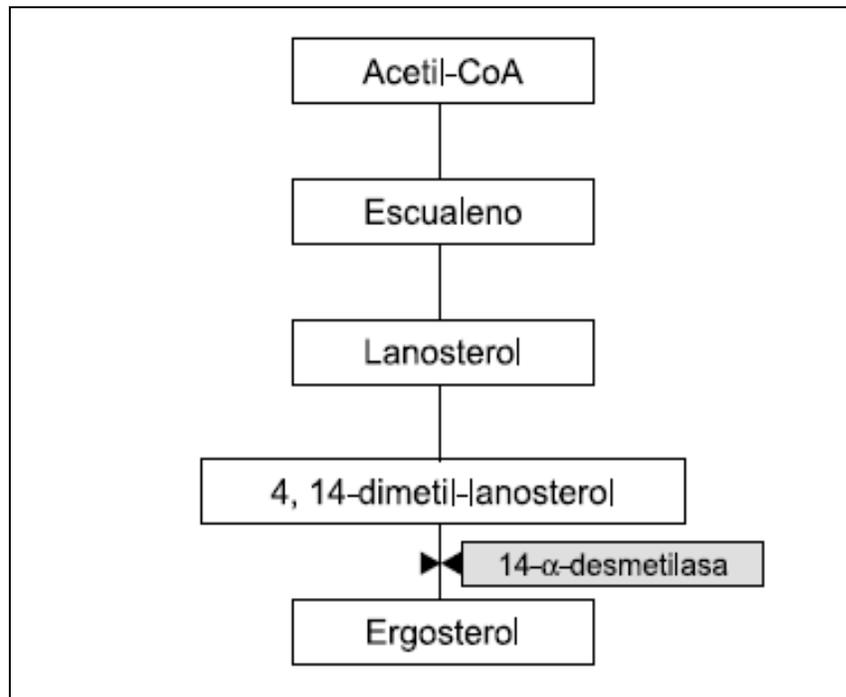


Figura 7. Síntesis de ergosterol en hongos.

El ergosterol, al igual que en los hongos, es el principal componente de las membranas celulares del parásito. Los cuáles son fundamentales para el desarrollo de los distintos estadios de este parásito [13].

Al ser un componente principal de la membrana celular del parásito (**Figura 8**), cualquier tipo de interferencia o inhibición en la síntesis de éste genera una desestabilización en su sistema, es decir, cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular, provocando un incremento en la permeabilidad y haciéndola susceptible al ingreso de sustancias exógenas

[14;15]. Por otro lado, la acumulación de metabolitos intermediarios de estos esteroides provocaría efectos nocivos para el parásito, observándose efectos citotóxicos y/o citoestáticos [16]. Es importante resaltar que las rutas metabólicas del parásito difieren a las rutas metabólicas del mamífero, por lo cual, esta diferencia se presenta como una ventaja, lo que permite una mayor selectividad hacia el *T. cruzi* [17;18].

En el parásito la biosíntesis del ergosterol se lleva a cabo por la enzima 14- α desmetilasa (CYP51) perteneciente al complejo P450. Esta enzima está localizada en las membranas del retículo endoplásmico [19], sin embargo, en tripanosomátidos, la CYP51 se encuentra en la membrana de glicosomas y mitocondrias y no se ha descartado la posibilidad de la localización en múltiples organelos [20, 21]. Esta enzima cataliza la desmetilación de 24- α esteroides, como lanosterol y eburicol mediante reacciones redox sucesivas (reacciones de mono-oxigenación) [22]. Se ha descrito que los *epimastigotes* de *T. cruzi* utilizan eburicol, como sustratos [23;24] al contrario de la producción de esteroides en la forma *amastigote* que utiliza a episterol como principal sustrato [25;26].

Por todo lo anteriormente señalado, un blanco interesante para el diseño de nuevos compuestos con actividad tripanocida es la inhibición de la síntesis de esteroides, mediados por compuestos heterocíclicos polinitrogenados.

Como los derivados de [1,2,3] triazolo [1,5-a]piridin cetona (TPs). Presentan actividad sobre la enzima CYP51 causando efectos citotóxicos y/o citostáticos que inducen la muerte selectiva del parásito [27;28]. Estructuralmente, la actividad tripanocida de estos compuestos se podría explicar debido a que se ha descrito que durante este proceso los inhibidores actúan bloqueando el sitio activo de la enzima [29]. Demostrando que la mejor característica estructural de estos inhibidores es la presencia de nitrógeno. El par de electrones del anillo triazólico, es decir, centro básico de las moléculas, el cual se une a la porfirina (el grupo hemo), del sitio activo de la enzima [30]. Sin embargo, la actividad de estas moléculas se ve afectada por la pobre solubilidad en medio acuoso.

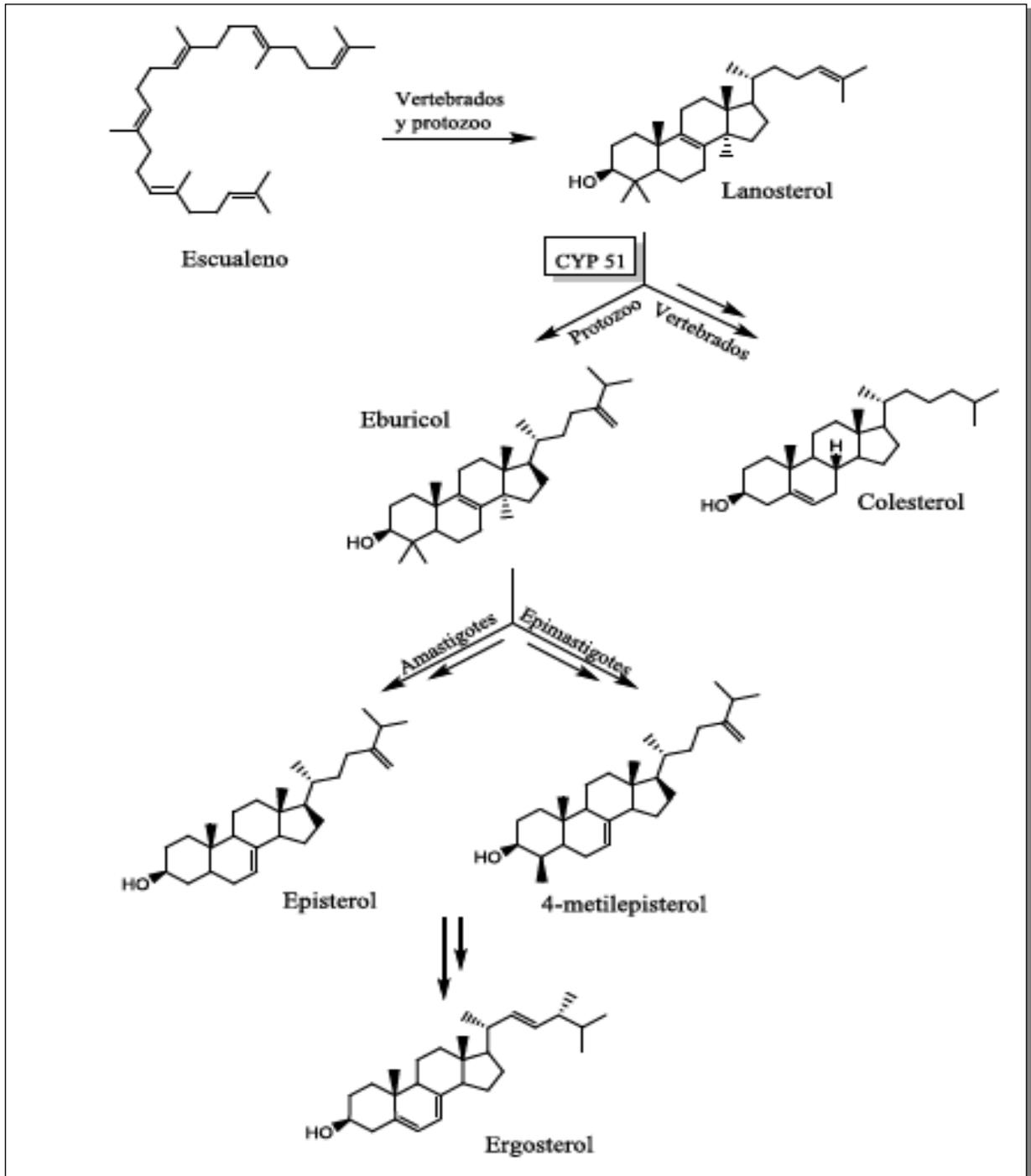


Figura 8. Biosíntesis de esteroides en sistemas biológicos.

1.2.2. Compuestos heterociclos: derivados de triazolopiridina

Los compuestos heterocíclicos son moléculas clave dentro de numerosas áreas de la química. Una cantidad importante de estos compuestos presentan actividad biológica, y son utilizados en la industria farmacéutica, debido a que en su estructura base contienen dichos compuestos [31]. Cabe destacar que los heterociclos polinitrogenados son parte fundamental de la química de la vida, ya que gran número de estos compuestos heterociclos contienen funciones biológicas esenciales, tales como las bases nitrogenadas, vitaminas, etc. Gracias a que estos presentan esta estructura dichos compuestos.

La serie de las triazolopiridinas son compuestos heterociclos que consta principalmente por una familia de moléculas que está compuesta por cinco sistemas heterocíclicos, tres son [1,2,3]-triazoles y dos [1,2,4]-triazoles (**Figura 9**). Tres de estos compuestos presentan un átomo de nitrógeno común “cabeza de puente” de los dos anillos

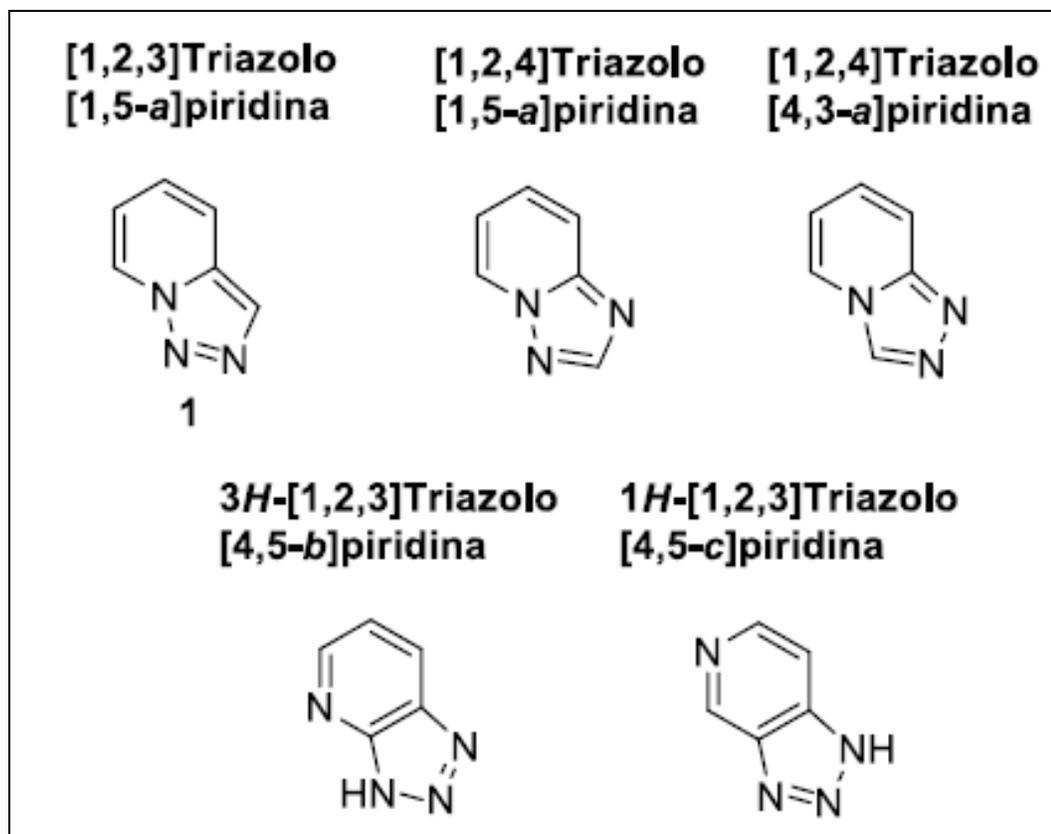


Figura 9. Familia principal triazolopiridinas.

Los derivados [1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina (TPs) son moléculas constituidas por un anillo de [1,2,3]triazol condensado con una piridina [32-33]. Tanto las moléculas 1,2 y 3, respectivamente, de la **Figura 10** tienen una sustitución en la posición 7 del núcleo triazolicopiridinico por un grupo electrodonor, y, por último, un metil en la posición 3 que permiten obtener esta familia de derivados triazolopiridinas, salvo la molécula 4 que solo tiene una sustitución de una piridina en la posición 3.

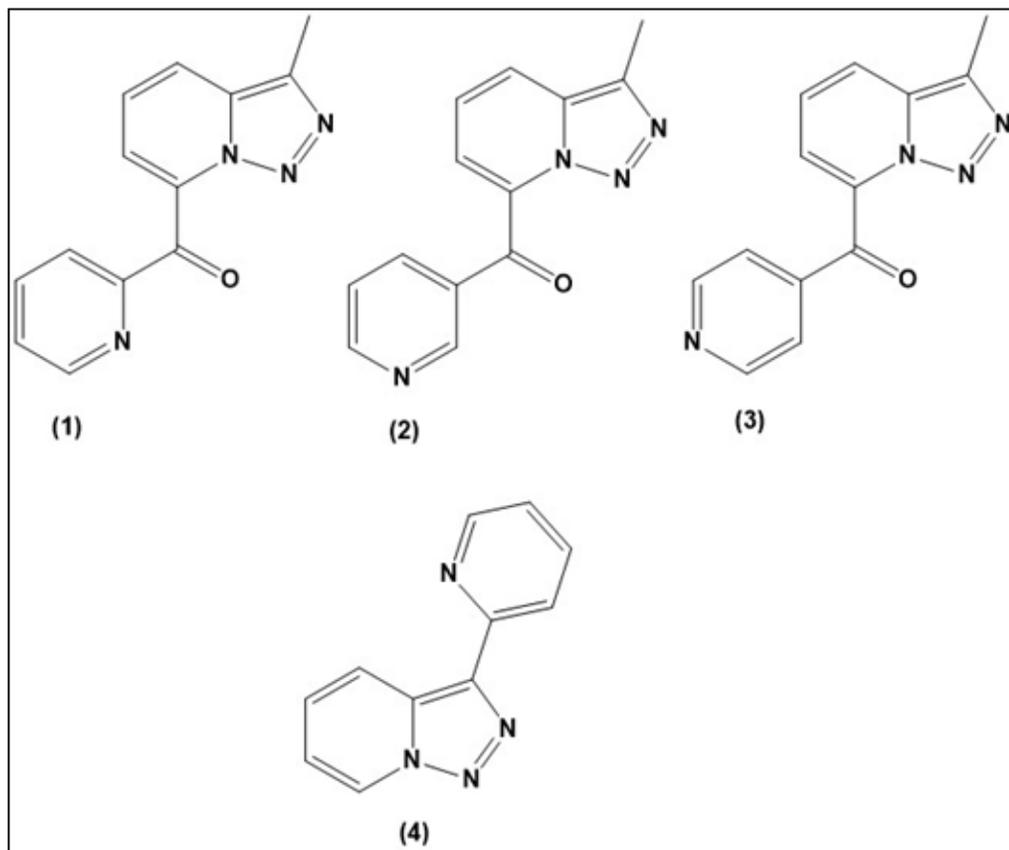


Figura 10. Derivados [1,2,3] triazolo[1,5-*a*]piridinas (TPs), obtenidas en el laboratorio de la Dra. Belén Abarca, Valencia España.

- (1) (TP1) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 2-piridil metanona
- (2) (TP2) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 3-piridil metanona
- (3) (TP3) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 4-piridil metanona
- (4) (TP4) 3-Piridil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina

Finalmente, dada las características de la unidad estructural de triazol, asociada frecuentemente a la actividad antimicótica, proponemos que las nuevas series de derivados de triazolopiridinas de la **Figura 10** como potenciales inhibidores de la síntesis de ergosterol en *T. cruzi*. [29]. Sin embargo, la actividad de estas moléculas se podría ver afectada por la pobre o nula solubilidad en medio acuoso y, por tanto, una baja eficacia o efectividad por parte de los derivados de triazolopiridina en su blanco de acción. Es por ello por lo que una estrategia de mejorar su solubilidad, por tanto, mejorar sus características fisicoquímicas es la formación de complejos de inclusión para poder mejorar sus características utilizando para ello ciclodextrinas como vehículo de inclusión.

1.3. Ciclodextrinas.

1.3.1. Complejos de inclusión

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos producidos por acción enzimática (glucosiltransferasa) sobre el almidón. Estas moléculas contienen varias unidades de glucosa unidas por medio de enlaces α -(1-4) conformando un anillo [34]. Tienen un extremo que contiene grupos hidroxilos primarios, en el otro extremo grupos hidroxilos secundarios y en el interior de la cavidad los grupos CH y oxígeno glicosídicos [35].

Las moléculas de ciclodextrina presentan forma de cono truncado o una forma toroidal, debido a la ausencia de libre rotación de los enlaces glicosídicos y de la conformación silla de las unidades de glucosa (D-glucopiranosas). En su estructura presenta dos grupos hidroxílicos: hidroxilo primario que se encuentran ubicados en el borde más estrecho y ligado a los carbonos C6 los secundarios, mientras que hidroxilo secundario se encuentran localizados en el borde más amplio, están ligados a los átomos de carbono C2 y C3 (**Figura 11**). Esta característica es debido a la libre rotación de los grupos hidroxílicos primarios, que reducen el diámetro efectivo de la cavidad. En cuanto a los grupos hidroxilos secundarios, estos constituyen una cadena relativamente rígida [36]

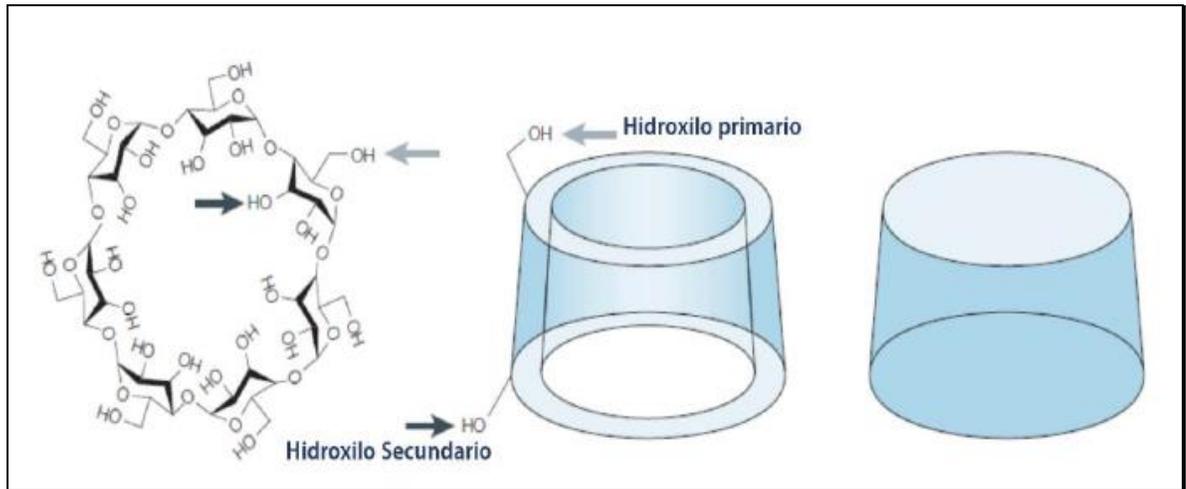


Figura 11. Estructura base de las ciclodextrinas

Las CDs más utilizadas, se componen por 6, 7 u 8 unidades de glucosa que llamadas comúnmente como α , β y γ respectivamente, tal como se muestra en la (Figura 12;13).

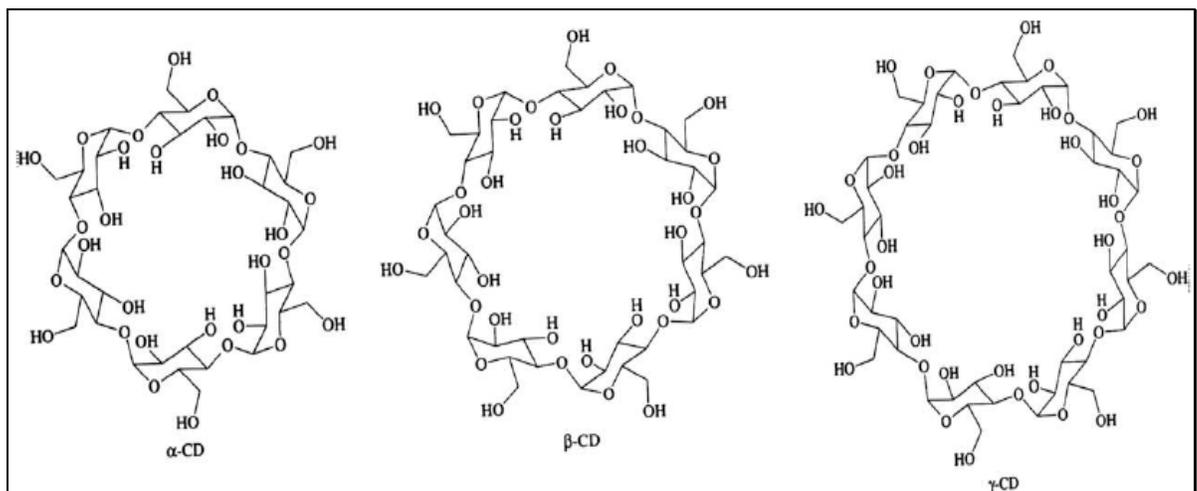


Figura 12. Estructuras químicas de α -CDs, β -CDs y γ -CDs.

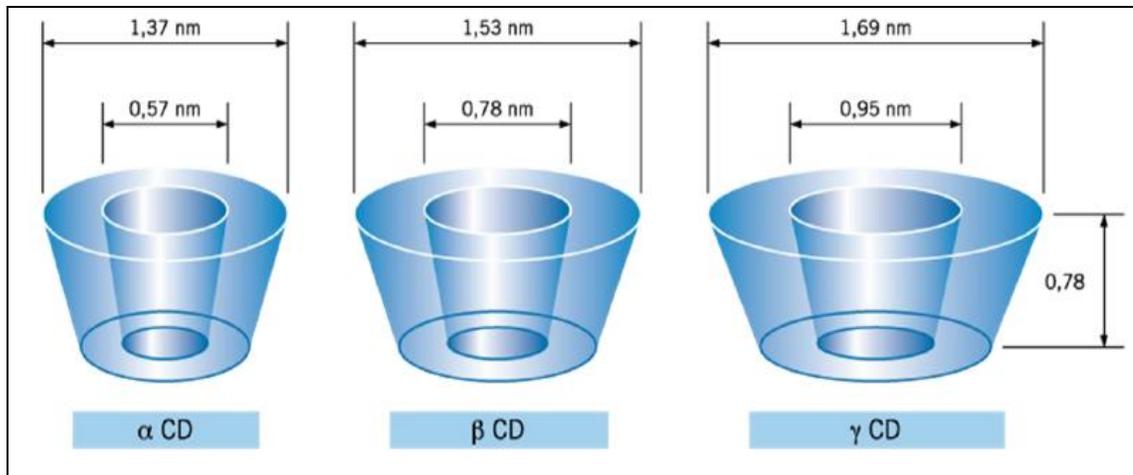


Figura 13. Dimensiones geométricas aproximadas de α -CDs, β -CDs, γ -CDs.

Dentro de la cavidad de las CDs no hay presencia de grupos hidroxilos. Esta zona de la molécula tiene un fuerte carácter hidrófobo (esta característica de su interior genera las fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno que generan la capacidad de hospedar moléculas), mientras que la cara superficial de este cono truncado presenta grupos hidroxilos, lo cual hace que esta zona de la molécula sea de un carácter hidrofílico. De acuerdo con todas estas características, permiten a la ciclodextrina no derivatizadas, es decir, nativas sin ningún tipo de modificación química, tenga la capacidad de alojar pequeñas moléculas en solución acuosa [36]. El tamaño de la cavidad de las CDs permite selectividad para la complejación de moléculas huésped. Las CDs tienen aplicaciones biomédicas muy atractivas debido a su baja toxicidad e inmunogenicidad [37;38].

Por tanto, las principales ventajas de las ciclodextrinas como transportadores son:

- 1) Baja toxicidad
- 2) Estructura química bien definida, además proporcionan muchos sitios potenciales de modificación química.
- 3) Distinto diámetro de ciclodextrinas, es decir, diferente tamaño de cavidades de estas
- 4) Protección del “huésped” incluido la degradación. Su principal aplicación de las ciclodextrinas es la mejora de la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de la molécula “huésped”.

No obstante, en ocasiones, la contribución de la ciclodextrina no es suficiente para obtener la solubilidad deseada, por lo que se han sintetizado numerosas ciclodextrinas derivatizadas, las que, dependiendo del sustituyente, pueden aumentar la solubilidad de la misma ciclodextrina, modificar su volumen e hidrofobicidad y estabilizar a la molécula huésped, lo que puede provocar cambios en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de dichas moléculas. Ejemplo de ello es: la carboximetil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y la 2,6 dimetil- β -ciclodextrina, entre otras.

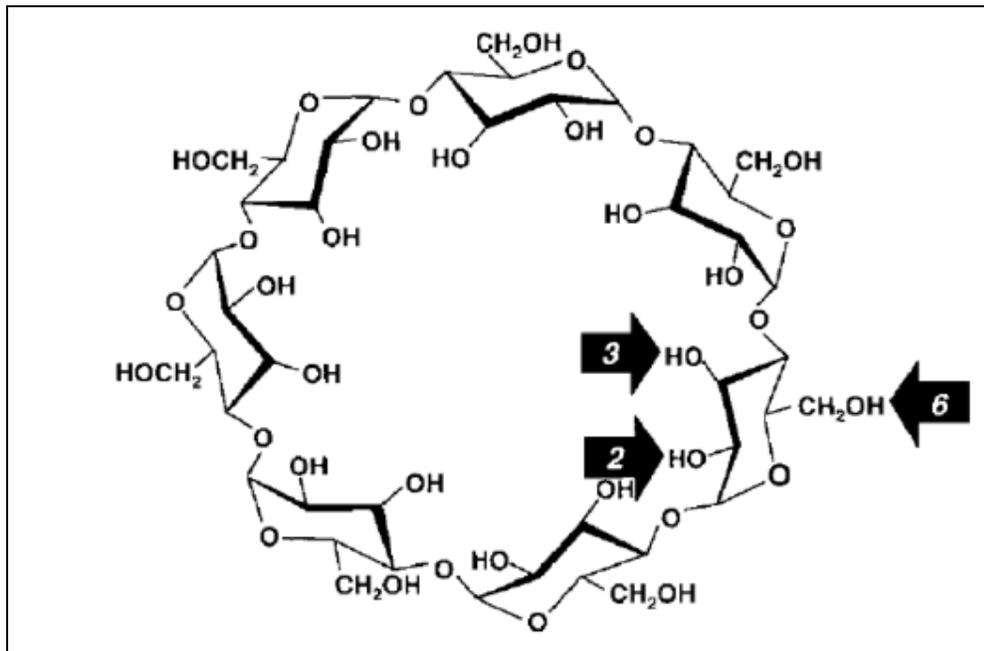


Figura 14. Sitios de modificaciones químicas en la β -CD

Las modificaciones en la estructura de las ciclodextrinas que se evidencian en la (**Figura 14**), generalmente son realizadas por la sustitución de los grupos hidroxilos primarios/secundarios por diversos grupos funcionales, siendo clasificados en derivados hidrofílicos (grupo metil e hidroxipropil), hidrófobos (grupo acetil y etil).

La formación de los complejos de inclusión se caracteriza por una estequiometría bien definida y la ausencia de enlaces covalentes entre la molécula huésped y el anfitrión (CD). Existen varios tipos de interacciones involucradas en la formación de complejos de inclusión y su contribución relativa depende del tipo de huésped y CD. Estas fuerzas incluyen interacciones

hidrofóbicas, reducción de la tensión de conformación, interacciones dipolo-dipolo, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, entre otras [39]. La capacidad para formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas huésped es una de las propiedades más interesantes de las CDs y ha sido la base para la mayoría de sus aplicaciones en la industria farmacéutica. Se utilizan principalmente para aumentar la solubilidad, mejorar la biodisponibilidad, modular la velocidad de suministro y estabilidad de fármacos [40].

Las constantes de asociación proveen una medida cuantitativa de la estabilidad del complejo y un completo entendimiento del complejo de inclusión. La condición mínima requerida para la formación del complejo de inclusión está en la compatibilidad geométrica entre la molécula receptora y el sustrato. El tamaño y la geometría de la molécula deben ser adecuados para la cavidad apolar de la ciclodextrina, ya que eso, permiten la encapsulación parcial o total dentro de la cavidad hidrófoba de una amplia variedad de compuestos orgánicos, expulsando al mismo tiempo las pocas moléculas de agua de alta energía desde el interior y la polaridad de la molécula huésped pues, en general, las moléculas hidrófobas tienen mayor afinidad por la cavidad apolar de la ciclodextrina cuando está en solución acuosa [41].

Así, la formación del complejo de inclusión está condicionada a la estructura y propiedades fisicoquímico de las moléculas huésped y las ciclodextrinas. La estequiometría de esos complejos puede variar entre las siguientes formas, como se observa en la **Figura 14**, 1:1; 1:2; 2:1 y 2:2; pero siendo más común y muy frecuente los complejos 1:1 [42].

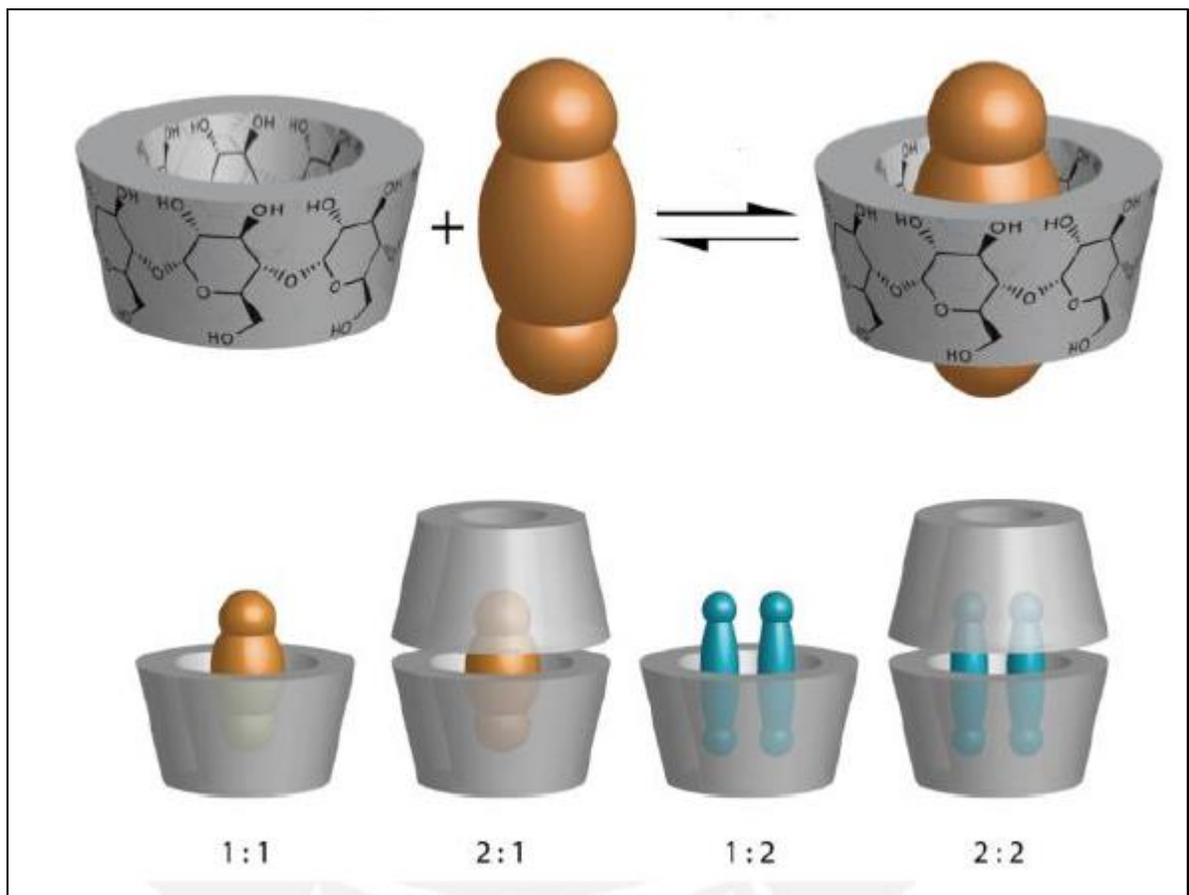


Figura 15. Estequiometría de los complejos de inclusión.

1.3.2. Estudio Computacionales de los complejos de inclusión: Docking

Es importante señalar que además de los resultados obtenidos experimentalmente, es posible complementar el estudio realizando modelamientos moleculares para cada complejo. Cabe destacar que en la literatura existe una amplia variedad de estudios computacionales, que permiten entender la estructura, dinámica y comportamiento químico de las ciclodextrinas. Para este trabajo de investigación se aplicaron unas técnicas de modelamiento molecular, llamada *docking*.

El estudio por *docking* consiste en predecir la estructura tridimensional predominante, favorecida y estable para el complejo formado entre una molécula huésped y una molécula anfitriona. Además, esta técnica involucra la exploración de un espacio definido por la representación molecular de una molécula, usando un criterio energético para determinar la mejor pose, que muestre las interacciones de menor energía entre molécula huésped y la molécula anfitriona.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

“Las características apolares que presentan los nuevos derivados de triazoloopiridina y la presencia de la cavidad semi-apolar de las ciclodextrinas a utilizar en este estudio, permitirían la formación efectiva de los complejos de inclusión. Estos complejos de inclusión podrían mejorar las propiedades fisicoquímicas de esta serie de compuestos, y así aumentar posiblemente la actividad tripanocida, en comparación con los derivados de triazoloopiridina libres.”

2.2. OBJETIVO GENERAL

Formar los correspondientes complejos de inclusión con las distintas ciclodextrinas en solución acuosa a partir de la serie de derivados de triazoloopiridinas (TPs) y así obtener sus constantes de asociación (K_a). Realizar un estudio termodinámico de los complejos de inclusión seleccionados que presenten mayor (K_a), para posterior realizar una evaluación de la actividad tripanocida.

2.3. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- a) Preparar los complejos de inclusión con la serie de derivados de triazolopiridina y sus correspondientes ciclodextrinas.
- b) Caracterizar los complejos de inclusión formados en solución acuosa por espectroscopia de absorción molecular (UV-VIS); serie TP1, TP2, TP3 y espectroscopia de fluorescencia en TP4.
- c) Determinar la constante de asociación (K_a) de los distintos complejos de inclusión por el método de Benesi-Hildebrand.
- d) Realizar un screening de los constante de asociación (K_a) de los complejos que presenten mayor orden de magnitud de (K_a), para obtener los parámetros termodinámicos del proceso de inclusión de dichos complejos a partir de la ecuación de Van't Hoff.
- e) Realizar estudios de modelamiento molecular de todos los complejos asociación formados a partir de la serie TP1, TP2 y TP3.
- f) Determinar la actividad tripanocida de los complejos de inclusión que presentan mayor (K_a), mediante la técnica de citometría de flujo.

3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1. Materiales

- 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 2-piridil metanona.
- 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 3-piridil metanona.
- 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridin-7-il 4-piridil metanona.
- 3-Piridil-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina.
- β -ciclodextrina 98%. Marca Sigma-Aldrich.
- Metil- β -ciclodextrina 98%. Marca Sigma-Aldrich.
- 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina 98%. Marca Sigma-Aldrich.
- Sonda Zombie UV [®]
- Metanol grado analítico.
- Agua Milli-Q grado analítico.

3.2. Equipos

- Los espectros de Absorción Molecular fueron obtenidos en un equipo Agilent 8453. Las celdas utilizadas fueron de cuarzo con paso óptico de 1 cm.
- Los espectros de emisión se registraron en un Espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer LS 55.
- Baño termorregulado con vibración Thermo Scientific modelo 2875, durante 24 horas en condiciones de temperatura controlada.
- Citómetro de flujo LSR Fortessa (BD bioscience,CA,USA).

4. Procedimiento experimental

4.1. Preparación de los complejos de inclusión

La formación de los complejos de inclusión se llevó a cabo mediante la adición de cantidades crecientes de las ciclodextrinas; β -ciclodextrina (β -CD), Metil- β -ciclodextrina (M- β -CD), M- β -CD Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) manteniendo una concentración fija TPs.

Para el compuesto TP4, ya que esta molécula presenta fenómeno de fluorescencia el procedimiento es distinto. Se preparó una solución de 10 ml de β -CD [1mM], y una solución stock del TP4 [1mM] en metanol. Posterior se sacó las alícuotas 27 μ L de la solución stocks del TP4, como se indica en la **Tabla 1**. a una concentración de 40 μ M, para cada Eppendorf. Y finalmente se enrasó con agua Milli-Q a un volumen final de 1000 μ L según corresponda.

Para la preparación de los complejos restantes se dispuso de una solución metanólica de cada uno de los derivados de triazolo piridinas; TP1, TP2 y TP3. Cada solución stock, está a una concentración de 2mM. Cabe destacar que la correspondientes alícuotas de estas soluciones madres,

llevadas al volumen final requerido, estas no deben superar, en el equipo la absorbancia debe ser mayor a 0.7 para evitar fenómeno de autoabsorción.

Posterior se sacó las alícuotas 30 μL de las soluciones stocks de los TPs (TP1, TP2, TP3), correspondiente a una concentración de 40 μL , para cada eppendorf, como se indica en la (**Tabla 2;3**).

Tabla 1: Preparación del complejo de inclusión TP4

N° de Eppendorf	TPs [μL]	CDs [μL]	Volumen final (Agua Milli-Q)
1	27	100	1400
2	27	200	1300
3	27	300	1200
4	27	400	1100
5	27	500	1000

Paralelo a lo anterior, se prepararon las soluciones con las correspondientes ciclodextrinas, con la cual, se formarán los complejos de inclusión, para los compuestos TP1, TP2 y TP3; se preparó β -CD, M- β -CD y HP- β -CD. Estas soluciones stock se llevaron a una concentración de [10mM].

Luego, se sacan las alícuotas correspondientes para cada eppendorf, como se muestra en las **Tablas 2 y 3**, donde se le agrega agua Milli-Q hasta enrasar a un volumen final de 1500 según corresponda. (este procedimiento se realiza para los 4 tipos de ciclodextrinas con sus correspondientes TPs).

La formación de todos los complejos se ha realizado en un baño termostático a 28°C vibración Thermo Scientific modelo 2875, con agitación constante durante 24 horas, hasta lograr el equilibrio. Tras ese periodo de tiempo, se filtran utilizando filtros de jeringa de 0,45 μ m para eliminar el sólido no disuelto. Se detectará la longitud de onda máxima de absorción de los complejos de inclusión en un espectrofotómetro de absorción molecular (UV-Vis) Agilent 845.

Tabla 2: Preparación del complejo de inclusión TP1.

N° de Eppendorf	TPs [μ L]	CDs [μ L]	Volumen final (Agua Milli-Q)
1	30	200	1300
2	30	300	1200
3	30	400	1100
4	30	500	1000
5	30	1000	500
6	30	1200	300
7	30	1400	100

Tabla 3: Preparación de los complejos de inclusión TP2 y TP3.

N° de Frascos	TPs [μL]	CDs [μL]	Volumen final (Agua Milli-Q)
1	30	400	1100
2	30	500	1000
3	30	800	700
4	30	1000	500
5	30	1200	300
6	30	1500	0

4.2. Preparación de los Cultivos celulares.

Los cultivos celulares de *T. cruzi* en los estadíos tripomastigote, fueron obtenidos en el Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.

Para la obtención de tripomastigotes, se infectaron células Vero con tripomastigotes aislados de macrófagos peritoneales de ratones infectados. Posteriormente células Vero se infectaron directamente con tripomastigotes a la relación de dos parásitos por célula. En el caso de amastigotes las células Vero se infectaron con tripomastigotes a una relación 1:10. Epimastigotes de *T. cruzi* clon Dm28c, fueron obtenidos de una colección del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5. Metodologías

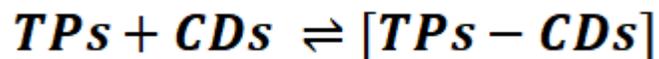
5.1 Caracterización de los distintos complejos formados

Para estimar la constante de asociación y estequiometría del complejo entre los TPs y las distintas ciclodextrinas, se utilizó la metodología de Benesi-Hildebrand, con una concentración fija de los compuestos a estudiar, en este caso la serie de derivados de triazolopiridina y más con la condición experimental de adiciones sucesivas de las distintas ciclodextrinas, es decir, que la concentración de ciclodextrina vaya en aumento, de tal manera de cuantificar exclusivamente la afinidad de los TPs por estas moléculas.

En el proceso de formación de complejos de inclusión es determinante el conocimiento de la constante que rige este sistema. Para obtener los valores que proveen un indicador de los cambios producidos en las propiedades fisicoquímicas de estos complejos, resultado de este proceso dinámico, uno de esos cambios, por ejemplo, es la solubilidad.

El Método de Benesi-Hildebrand para determinar la constante de equilibrio o constante de asociación (K_a) (**ecuación 2**), es útil para obtener la información de la formación de complejos de inclusión es una reacción de equilibrio en la

cual, la molécula huésped (TPs) se incluye dentro de las ciclodextrinas, molécula anfitriona (**Ecuación 1**).



(Ecuación 1)

La constante de asociación (Ka) se define por

$$Ka = \frac{[TPs - CDs]}{[TPs][CDs]}$$

(Ecuación 2)

Donde:

[TPs]= Corresponde a la concentración de derivado de triaolopiridina, (molécula huésped)

[CDs]= Corresponde a la concentración de la ciclodextrina, (molécula anfitriona)

[TPs-CD]= Concentración del complejo de inclusión formado

Las constantes de formación del complejo vienen dadas por la **Ecuación 2**, como se ha mencionado, y la constante de asociación de los complejos con estequiometría 1:1, se obtuvo mediante la ecuación lineal de Benesi-Hildebrand [43] (**Ecuación 3**). Cabe destacar que esta metodología también es válida para compuesto que presentan fenómenos luminiscentes, que es el caso de la molécula TP4 como se muestra en la **Ecuación 4**.

$$\frac{1}{A_i - A_0} = \frac{1}{K\alpha \cdot \alpha} \cdot \frac{1}{[CDs]} + \frac{1}{\alpha}$$

(Ecuación 3)

Donde:

A_i= Absorbancia con una particular concentración de las CDs

A₀= Intensidad de absorción de las TPs ausencia de las CDs

K_a= Constante de asociación.

[CDs]= Concentración de las distintas ciclodextrinas.

α = Constante instrumental

La molécula TP4 emite fluorescencia, por tanto, si presenta fenómeno luminiscencia. Se determinó la constante de asociación de acuerdo con la ecuación de decaimiento de fluorescencia (**ecuación 4**). Se supone el siguiente equilibrio, para el caso de los complejos de inclusión con estequiometría 1:1

$$\frac{1}{F_i - F_0} = \frac{1}{K_a \cdot \alpha} \cdot \frac{1}{[CDs]} + \frac{1}{\alpha}$$

(Ecuación 4)

Donde:

F_i= Intensidad de fluorescencia del complejo de inclusión.

F₀= Intensidad de fluorescencia de las TPs en ausencia de las CDs.

K_a= Constante de asociación.

[CD]= Concentración de las distintas ciclodextrinas.

α = Constante instrumental.

En este caso, la intensidad de la fluorescencia se relacionó con el aumento de la concentración de ciclodextrina en la formación de complejos de inclusión, a través de la ecuación de Connors (**Ecuación 5**) [44]. Llamado método no-lineal. Cabe destacar que la ecuación del método no-lineal es básicamente solo un arreglo de la ecuación de Benesi-Hilderbrand (**Ecuación 4**).

$$F = F_0 + \frac{(F_{\infty} - F_0)K_a[\beta CD]_0}{1 + K_a[\beta CD]_0}$$

(Ecuación 5)

Donde

F_i = Intensidad de fluorescencia del complejo de inclusión

F_0 = Intensidad de fluorescencia del TP en ausencia de las β -CD.

K_a = Constante de asociación.

F_{∞} = Intensidad de fluorescencia cuando TP se encuentra completamente incluidos en la. β -CD.

$[\beta\text{-CD}]$ = Concentración de la beta ciclodextrina.

5.2 Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos de inclusión

La determinación de la termodinámica de inclusión, es decir, los valores termodinámicos de los complejos de inclusión se obtuvieron determinando las constantes de asociación a diferentes temperaturas 20, 28 y 37°C.

Estos valores fueron obtenidos de acuerdo con la ecuación de Van't Hoff, [45] que relaciona la variación de la constante de asociación con la variación de temperatura, de acuerdo con la siguiente relación (**Ecuación 6**).

$$\mathbf{\ln (Ka) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}}$$

(Ecuación 6)

Donde:

R = 8,314 J/K*mol

Ka = constante de asociación

T = temperatura en kelvin

Por tanto, graficando $\ln(K_a)$ vs. $1/T$, es decir, haciendo una regresión lineal del logaritmo natural de la constante de asociación (K_a) y el inverso de la temperatura ($1/T$), en la cual a través de este ajuste lineal se obtiene los valores de pendiente e intercepto que corresponden a ΔH y ΔS respectivamente de acuerdo con las **Ecuaciones 7 y 8**.

$$m = -\frac{\Delta H}{R} \quad n = \frac{\Delta S}{R}$$

(Ecuaciones 7; 8)

Dónde:

m=pendiente

n=intercepto

Con los valores anteriormente obtenidos se calcula ΔG mediante la ecuación de energía libre de Gibbs (**Ecuación 9**), donde la temperatura corresponde a 298 K (25°C).

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$$

(Ecuación 9)

5.3. Estudios de modelación molecular

Los derivados de triazolopiridina fueron construidos usando GAUSSIAN 09 y su geometría fue optimizada usando el método semiempírico PM6. Para generar los complejos de partida se utilizó Autodock 4.2. La visualización y el análisis de los resultados se realizaron mediante Pymol.

5.4. Estudio de evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo.

Para determinar la viabilidad de los parásitos (*trypomastigotes*, Dm28) se utilizó la sonda Zombie-UV ®. Esta interacciona con proteínas que poseen grupos aminos en las células muertas, la sonda al ser sometida a radiación UV genera una fluorescencia en longitud de detección de 450 nm.

Los cultivos celulares fueron expuestos a las distintas concentraciones de los compuestos a las concentraciones 63 μM , 125 μM y 250 μM y luego de 24 horas fueron cosechados para agregar 1uL de sonda Zombie UV ®. Se incubo por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavaron los parásitos con 100uL de PBS (solución salina). Se resuspendieron en 200uL de buffer (cell staining buffer) y se llevaron a medir las intensidades de fluorescencia en un citómetro de flujo.

La adquisición de datos y análisis fueron realizados en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD bioscience,CA,USA), los datos fueron analizados con el software Weasel v3.2.1. Se consideraron un total de población de 10,000 eventos. Los parásitos se seleccionaron según la región correspondiente a la zona de parásitos intactos.

Cabe destacar que para los complejos de inclusión la concentración de [TPs] adicionada fue determinada por la ecuación Lucas-Abellán [46].

$$= \frac{-([CD]_0 K_a - [TPs]_0 K_a + 1) + \sqrt{([CD]_0 K_c - [TPs]_0 K_a + 1)^2 + 4K_a [TPs]_0}}{2K_a}$$

(Ecuación 10)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Caracterización del complejo [TP4- β -CD].

La caracterización espectroscópica de 3-Piridil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina (TP4). Se registró tanto un espectro de absorción molecular, como en uno de fluorescencia, para la molécula TP4 ya mencionada. Se realizaron ambas técnicas, ya que esta molécula presenta fenómeno luminiscente. En ambas se utilizaron como solvente metanol.

En el espectro de absorbancia se observan dos bandas una de mayor energía centrada en 218 nm y otra de menor energía, esta última más ancha a 304 nm. La banda con mayor λ , es decir, con mayor longitud de onda es utilizada para excitar en el espectrofotómetro de fluorescencia y así tener el espectro de fluorescencia, ya que, al ser irradiada por la luz visible al pasar del estado fundamental al estado excitado presenta menor energía, por tanto, para volver a su estado basal presenta menos posibilidad de perder la emisión de fluorescencia por otro tipo de transferencia de energía no radiativa.

El espectro de fluorescencia presenta un máximo de 408, en el cual los parámetros para su obtención corresponden a la longitud de onda de excitación de 304 nm, el barrido se realizó entre 320 y 550 nm.

Para el complejo de inclusión [TP4- β -CD], se determinó la constante de asociación del complejo formado. Para ello se dejaron en agitación durante 24 horas. A una temperatura constante de 28°C por medio del baño termostático, para posterior registro de los espectros. En la **Figura 16**, se muestra que a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina la intensidad de fluorescencia va disminuyendo. En este caso la disminución de la emisión de fluorescencia en presencia de β -ciclodextrina, puede explicarse en función de que esta molécula es poco soluble en agua y, por lo tanto, fue necesario utilizar metanol como co-solvente para solubilizar el compuesto y así por tanto poder solubilizar el compuesto TP4. La presencia de este co-solvente, si bien es necesario, para realizar este procedimiento experimental, la alícuota de TP4 en metanol, es pequeña en comparación a la solución final. En la formación del complejo de estas especies, ocurre un decremento en la fluorescencia. Este fenómeno es llamado extinción, y tiene lugar cuando la banda de emisión de la especie fluorescente TP4 cubre la banda de absorción del extinguidor β -CD. A distancias intermoleculares cortas, como en la formación de este complejo [TP4- β -CD], se transfiere energía del estado excitado de TP4 al estado basal de la ciclodextrina, y se reduce la intensidad de fluorescencia.

Se corrobora en la **Figura 16** cuando la TP4 se incluye en β -ciclodextrina, se observa claramente una disminución de la emisión de fluorescencia a medida que la concentración de β -ciclodextrina aumenta. Este

comportamiento como se ha mencionado corrobora la formación del complejo de inclusión entre TP4 y β -ciclodextrina y consecuentemente las interacciones huésped/hospedero no favorecen la emisión de fluorescencia del compuesto TP4.

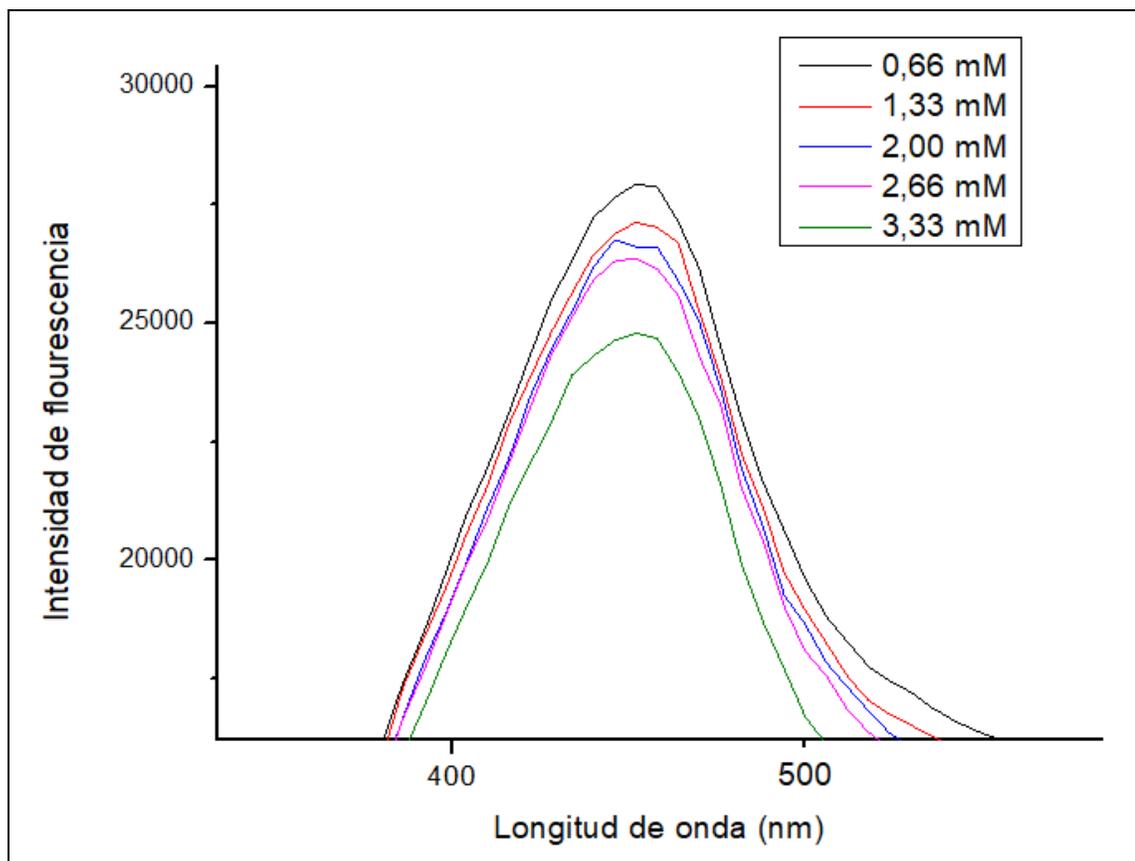


Figura 16. Espectro de fluorescencia con concentración fija de TP4 y una concentración creciente de β -CD a 28°C.

Para la determinación de la constante de asociación fueron graficados los máximos de intensidad de fluorescencia para el complejo [TP4- β -CD]

versus la concentración de β -CD (**Tabla 4**). La **Figura 17** se muestra el gráfico, desde las cuales tras un ajuste no-lineal de los puntos (representada por una línea roja en la gráfica), se obtuvo el valor de la constante de asociación.

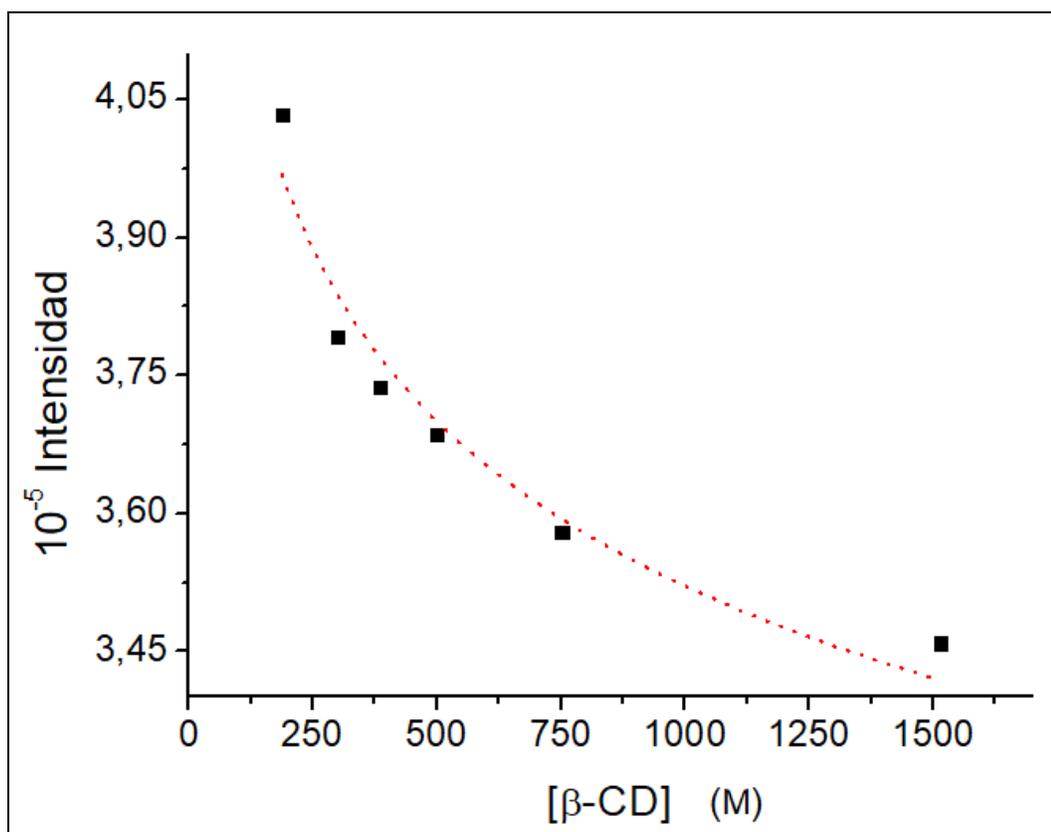


Figura 17. Método no-lineal para el complejo [TP4- β -CD] a la temperatura de 28°C.

Tabla 4. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes al complejo [TP4-β-CD].

Complejos de inclusión con Ciclodextrinas	Ka (M ⁻¹) ± SD
[TP4- β-CD]	222 ± 10

El análisis no lineal estudiado para el complejo [TP4-β-CD]. Como se observa en la (**Tabla 4**), da un valor de Ka de 222 M⁻¹ y un coeficiente de determinación R² 0,988 – 0,993.

Con el estudio anterior se pudo corroborar experimentalmente que la molécula TP4 se incluye en la β-ciclodextrina. En base a este resultado se realizarán los siguientes estudios experimentales, es decir, se utilizará una metodología similar para la serie TP1, TP2 y TP3 de los derivados de triazolopiridina (ya que tiene estructuras relativamente similares). Estos se enfrentarán a las ciclodextrinas correspondientes, para poder lograr la inclusión y formación de los complejos de inclusión de esta serie de compuestos.

6.2. Caracterización de los complejos: (Serie TP1, TP2 y TP3)

6.2.1. Complejos [β -CD-TP1], [β -CD-TP2] y [β -CD-TP3].

Las series de compuestos de derivados de triazolopiridina son compuestos apolares y tienen baja solubilidad en agua como se ha mencionado anteriormente. Con el propósito de incrementar la solubilidad en este medio, fueron incluidas en β -CD, M- β -CD y HP- β -CD y así poder estudiar cuál de estas ciclodextrinas presentan mejor comportamiento frente a esta serie de derivados de compuestos TP1, TP2 y TP3. Se estudió el efecto que produce el aumento de la concentración de esta ciclodextrina sobre estos compuestos empleando espectroscopia de absorción molecular. Se emplea solo esta técnica debido a que esta serie de moléculas no presentan fluorescencia como si presentaba TP4.

Esta técnica al igual que la anterior, permite caracterizar termodinámica y fisicoquímicamente el proceso de formación de los complejos de inclusión, entre los derivados de triazolopiridina y las correspondientes ciclodextrinas. En la **Figura 18** se puede observar, a modo de ejemplo, el espectro de absorción de la molécula TP1 de la **Figura 10**, enfrentada a β -CD; se puede observar que a medida que aumente la concentración de la ciclodextrina va aumentando el máximo de absorbancia, esto implica que, nuestro compuesto está siendo

incluido por las ciclodextrinas y, por tanto, está siendo solubilizado a medida que las concentraciones de estas van aumentando. El aumento en los máximos de absorbancia es originado por la polaridad de las moléculas TPs, en este caso específico por TP1, es decir, al ser una molécula de un gran carácter apolar con respecto al entorno o al medio en que se encuentra (medio acuoso), las moléculas tienden a incorporarse dentro de β -ciclodextrina, ya que, la cavidad de esta tiene un carácter más hidrofóbico respecto al entorno en que se encuentran, este efecto da cuenta de la formación del complejo de inclusión.

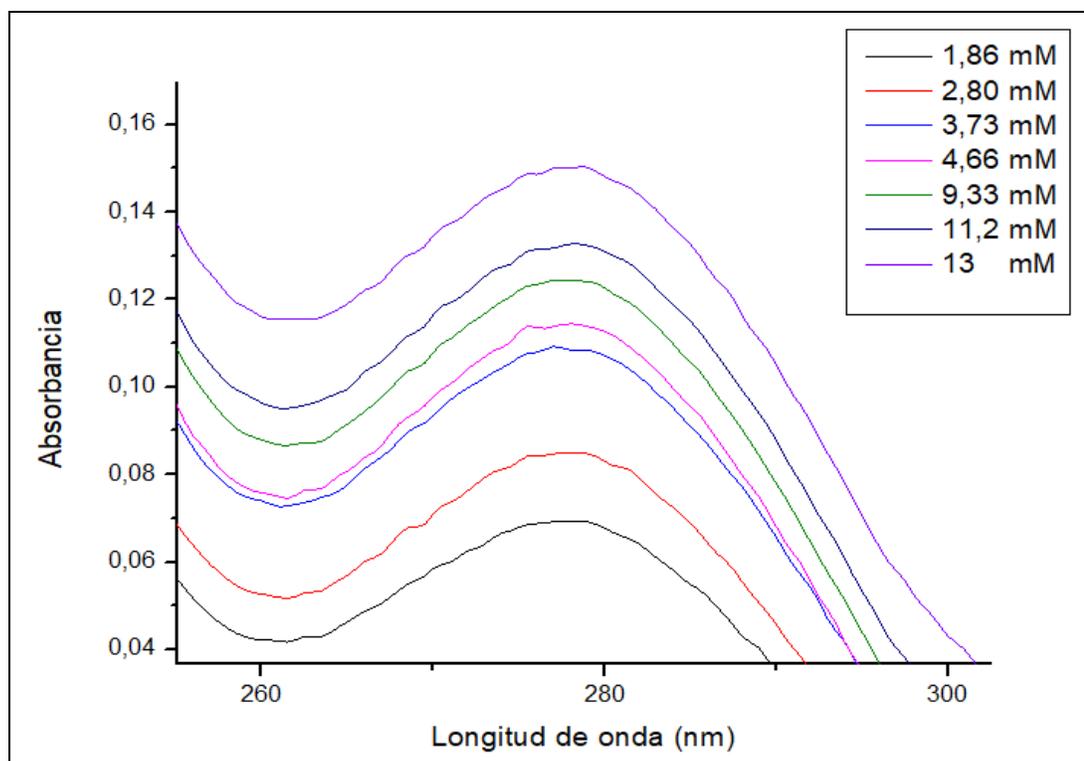


Figura 18. Espectro de absorción del complejo de inclusión de TP1 a una concentración constante de 30mM y concentración de β -CD crecientes.

Tanto la regresión lineal y los valores de constantes de asociación para los distintos complejos, se determinados mediante la ecuación de Benesi-Hildebrand.

En la **Figura 19** se muestra el gráfico de dobles recíprocos, es decir, el inverso de la diferencia de los máximos de absorbancia, en función del inverso de la concentración de CDs para cada uno de los complejos de inclusión estudiados, de acuerdo con la **Tabla 2** y **ecuación 3**. Se observa que para todos los casos se ajusta a una curva lineal con coeficiente de determinación R^2 similares (**Figura 19**), lo que confirma una estequiometría 1:1. Presentan valores de constante de asociación ($K_{1:1}$) relativamente grande evidenciando que el desplazamiento del equilibrio estaría dado para formación de los complejos.

Se calcularon los valores de las constantes de asociación (K_a) para cada complejo de inclusión formada por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD). Como se observa en la **Tabla 5**, a partir de la pendiente e intercepto de la curva obtenidas de la **Figura 19**.

Cabe destacar que la formación de complejos de inclusión y determinación de constantes de asociación de los compuestos TP1, TP2 y TP3 en las distintas ciclodextrinas estudiadas en el presente trabajo, no ha sido descrito en literatura.

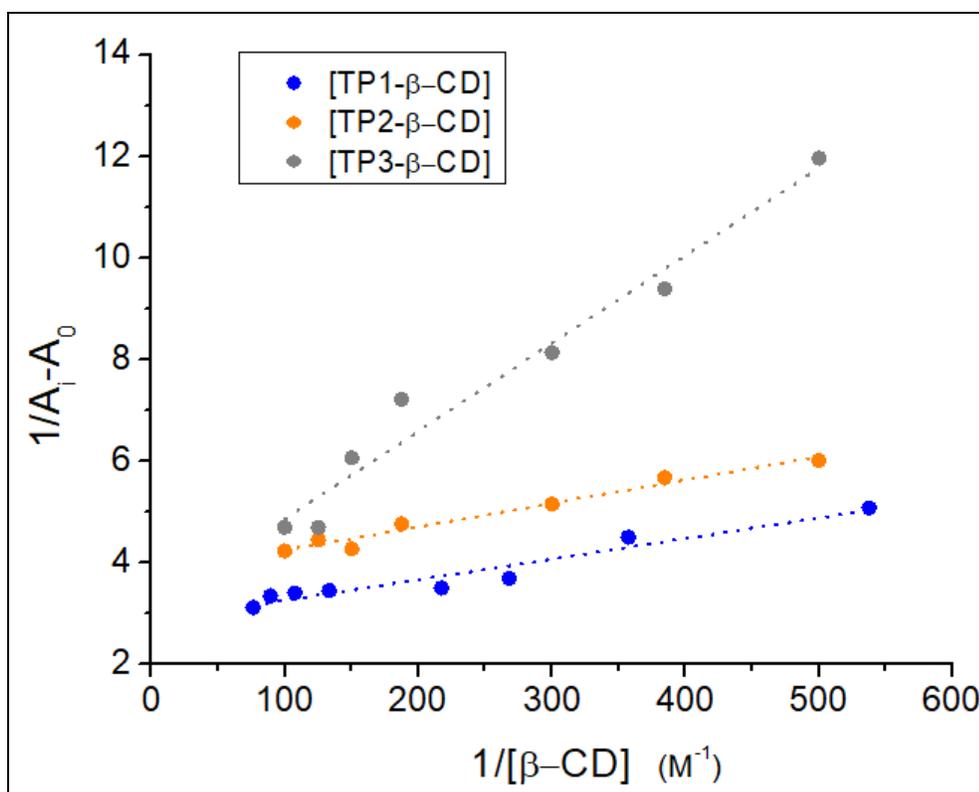


Figura 19. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CDs para complejos de inclusión de la serie [TP1- β -CD], [TP2- β -CD] y [TP3- β -CD]. ($r^2 = 0,937$), ($r^2 = 0,972$) y ($r^2=0,965$) respectivamente.

Tabla 5. Contantes de asociación (K_a) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [TP1- β -CD], [TP2- β -CD] y [TP3- β -CD].

Complejos de inclusión con Ciclodextrinas	K_a (M^{-1}) \pm SD
[β -CD-TP1]	700 \pm 4
[β -CD-TP2]	944 \pm 120
[β -CD-TP3]	202 \pm 80

En este caso se observa, la tendencia creciente de los valores de las constantes de asociación para estos complejos formados como se denota en la **Tabla 5** [β -CD-TP2] > [β -CD-TP1] > [β -CD-TP3], es decir, la β -CD con TP2 presentan una K_a mayor en comparación con los otros complejos de inclusión enfrentados con la misma ciclodextrina, si bien no es una diferencia en un orden de magnitud considerable. Esto es interesante y se puede explicar a partir de las mayores interacciones posibles de β -CD con TP2, ya que la única variante de esta serie de moléculas TP1, TP2 y TP3 es la sustitución de la piridina, en el caso de TP2 en posición Meta con respecto al carbonilo en posición 7 en referencia al núcleo triazólico. Comparados con TP1 y TP3 que tienen la piridina en Orto y Para respectivamente. Por tanto, la posición de la piridina en TP2 respecto al carbonilo suministra una mayor disponibilidad de interacción con

respecto a la β -CD, lo que se expresa en una mayor asociación relativa que da cuenta de una constante de asociación (K_a) mayor. Como se puede apreciar en la **Tabla 5**.

Cabe destacar que las interacciones asociadas a la inclusión de los compuestos se profundizaran más adelante cuando se expliquen los estudios termodinámicos correspondientes.

6.2.2. Complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].

En la **Figura 20** muestra a modo de ejemplo, el espectro de absorción de la molécula TP1 de la **Figura 10**, pero ahora enfrentadas con una ciclodextrina derivatizada como es el caso de Metil- β -ciclodextrina, para cada una de las correspondientes series de moléculas TP1, TP2 y TP3 (**Figura 8**).

Se pudo observar que a medida que aumente la concentración de la ciclodextrina va aumentando el máximo de absorbancia, al igual que en caso anterior, esto implica que, nuestro compuesto está siendo incluido por las ciclodextrinas y, por tanto, está siendo solubilizado a medida que las concentraciones de estas van aumentando.

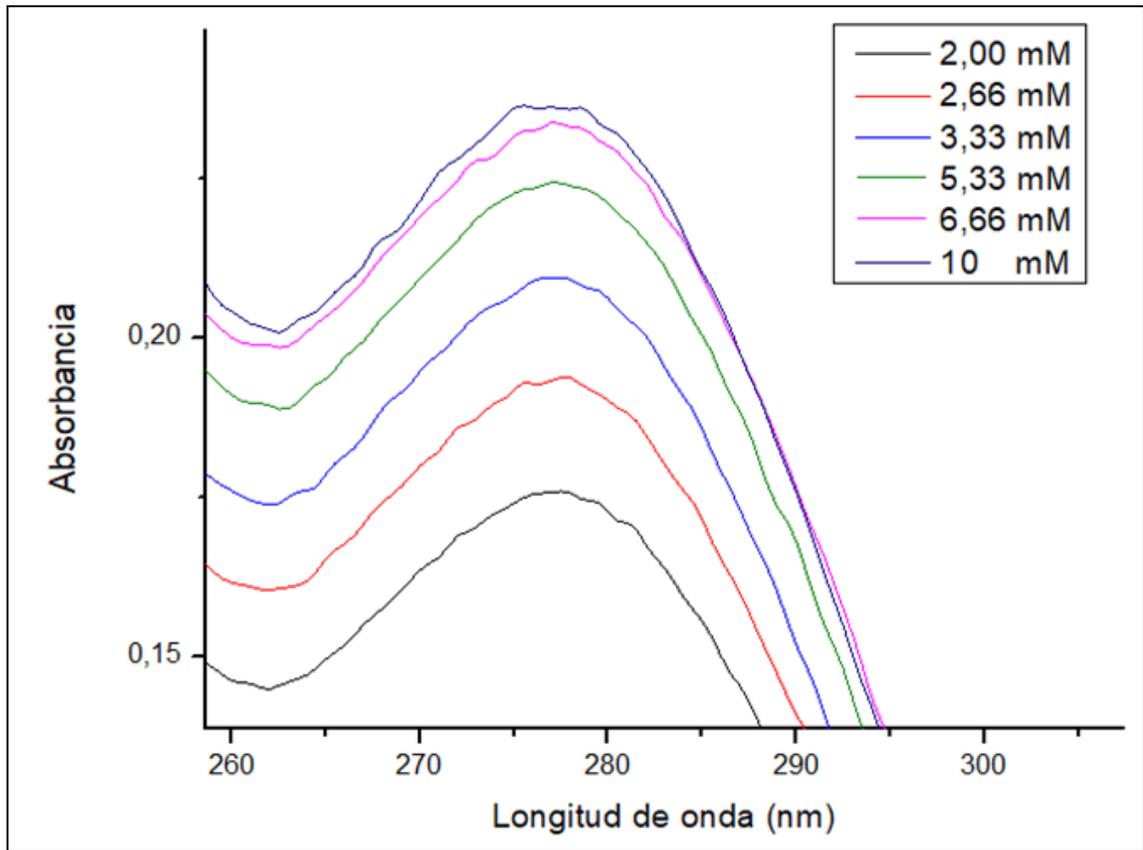


Figura 20. Espectro de absorción del complejo de inclusión TP1, a concentración constante de 30mM y concentración de M-β-CD crecientes.

Este aumento en el máximo de absorción es originado por la polaridad de las moléculas TPs, en este caso específicamente de TP1, al igual que en caso anterior. Al ser una molécula de un gran carácter apolar con respecto a un entorno o medio en que se encuentra (medio acuoso), las moléculas también tienden a incorporarse dentro de la Metil-β-ciclodextrina, ya que, la cavidad de esta CD tiene un carácter más hidrofóbico respecto al entorno en que se encuentran, pero una de las diferencias importantes de esta ciclodextrina

derevatizada con respecto a la nativa (β -ciclodextrina), son las sustituciones adicionales que tiene en su estructura; que son sus metilos respectivos en su superficie, comparados con la ciclodextrina nativa. Por tanto, las ciclodextrinas derivatizadas suministran o dispone una superficie más afín para estos TPs debido a que aumenta el carácter apolar en su superficie con estos metilos, generando una mayor interacción con estas moléculas con gran carácter apolar como lo son los derivados de triazolopiridina, para su posterior inclusión en la cavidad semi-apolar de éstos. Con estos cambios (derivatización), al añadir metilos en la superficie se pierde un poco la solubilidad de la ciclodextrina, ya que, como se menciona le añade un carácter más apolar, es decir, un carácter más hidrofóbico a la molécula, pero con esto se logra o se adquiere una mayor inclusión debido al cambio químico del entorno superficial de esta ciclodextrina. Lo que favorece un mayor número de interacciones posibles con TPs, ya que esta serie de moléculas tienen un carácter altamente apolar como se ha mencionado, lo que se expresa en una mayor asociación relativa generando un mayor orden de magnitud en las contantes de asociación K_a (del orden de 1000 M^{-1}), como se puede observar en el caso de M- β -CD, con respecto a la ciclodextrina nativa, es decir, una contante de asociación (K_a) mayor en ordenes de magnitud. Y esto se muestra con claridad en la **Tabla 6**.

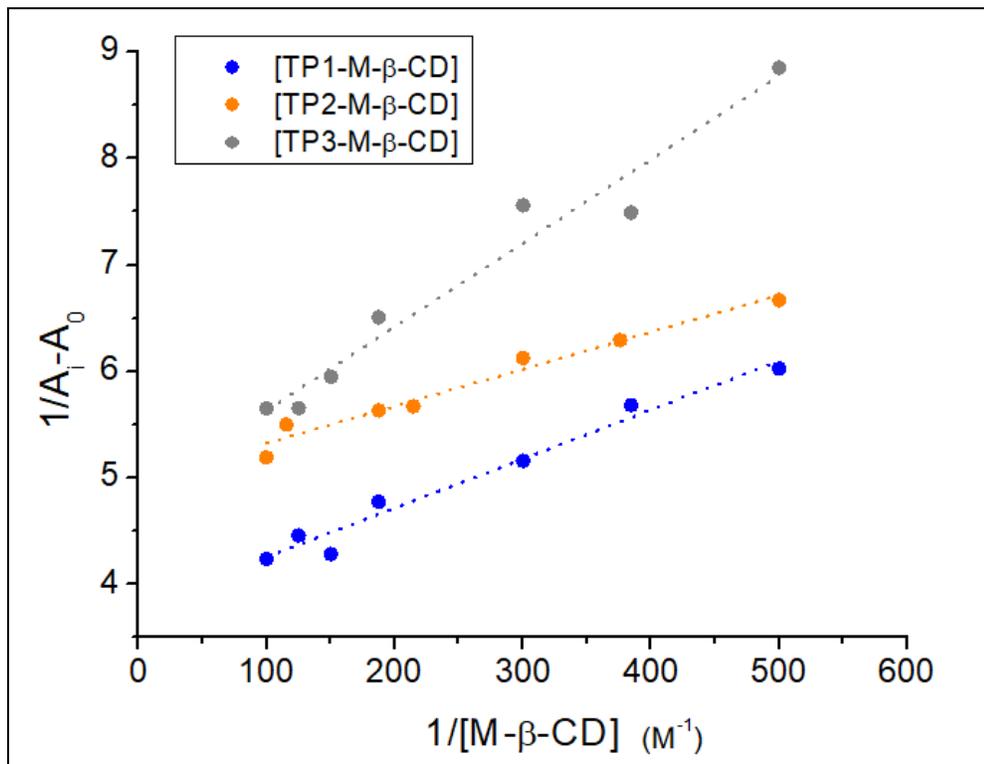


Figura 21. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de los distintos TPs; [TP1-M-β-CD] ($r^2 = 0,992$), [TP2-M-β-CD] ($r^2 = 0,9875$) y [TP3-M-β-CD] ($r^2=0,999$)

De acuerdo con la **Figura 21** y **ecuación 3**, se observa que para todos los casos de esta serie de TPs con M-β-CD se ajusta a una curva lineal, y se confirma una estequiometría 1:1. Se calcularon los valores de las constantes de asociación ($K_{1:1}$) para cada complejo de inclusión formada por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD), como se observa en la **Tabla 6**, a partir de la pendiente e intercepto de la curva obtenidas de la **Figura 21**.

Tabla 6. Contantes de asociación (K_a) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [TP1-M- β -CD], [TP2-M- β -CD] y [TP3-M- β -CD].

Complejos de inclusión	K_a (M^{-1}) \pm SD
[M- β -CD-TP1]	822 \pm 2
[M- β -CD-TP2]	1588 \pm 77
[M- β -CD-TP3]	684 \pm 73

Teniendo en consideración que hay formación de complejo de inclusión, como se observa en la **Tabla 6**, y la posible explicación de la formación de estos complejos anteriormente mencionados, al igual que en el caso anterior con la ciclodextrina nativa (β -CD). Se observa la tendencia creciente de los valores de las constantes de asociación de los complejos:

[M- β -CD-TP2] > [M- β -CD-TP1] > [M- β -CD-TP3]. Cabe destacar que se genera la misma orden de la serie de moléculas con respecto a β -CD del caso anterior.

Esto es esperable, ya que todas las moléculas de esta serie son estructural y químicamente iguales y solo cambia la posición de la piridina en función del carbonillo como ya ha sido mencionado. La sustitución de la serie de TP2 de la piridina en posición Meta respecto al carbonilo, comparado con TP1, TP3.

Al parecer estos cambios suministra una mayor disponibilidad de interacción con respecto a los otros TPs frente a M- β -CD en este caso, lo que se expresa en la misma orden de tendencia creciente de los valores de las constantes de asociación (K_a) y este fenómeno ya ha sido explicado en el caso anterior de la ciclodextrina nativa.

6.2.3. Complejos [HP- β -CD-TP1], [HP- β -CD-TP2] y [HP- β -CD-TP3].

Se muestra de igual manera como en todos los casos anteriores, que los distintos complejos de inclusión formados, por las correspondientes series de moléculas TP1, TP2 y TP3 (**Figura 10**) respectivamente, se enfrentan a una CD en este caso es enfrentadas con una nueva ciclodextrina derivatizada como es el caso de Hidroxipropil- β -ciclodextrina, para cada TPs.

Resulta la misma dinámica que en los dos casos anteriores, a medida que aumente la concentración de la ciclodextrina va aumentando el máximo de absorbancia, esto se explica de igual forma, ya que el compuesto está siendo incluido por las ciclodextrinas y, por tanto, está siendo solubilizado a medida que las concentraciones de estas van aumentando, lo cual, generan la mismas rectas lineales (**Figura 22**), en el gráfico del inverso de la Absorbancia en

función del inverso de la concentración de la [HP- β -CD] para complejos de inclusión de los distintos TPs

Esto se explica, al igual que en los dos casos anteriores también es originado por la polaridad de las moléculas TPs, en este caso. Al ser una molécula de un gran carácter apolar con respecto a un entorno o medio en que se encuentra (medio acuoso), las moléculas también tienden a incorporarse dentro de la Hidroxipropil- β -ciclodextrina, ya que, la cavidad de esta CD tiene un carácter más hidrofóbico respecto al entorno en que se encuentran, pero una de las diferencias importantes de esta ciclodextrina derivatizada (en este caso HP- β -ciclodextrina), con respecto a la nativa β -ciclodextrina y a la, Metil- β -ciclodextrina. Son las sustituciones que presenta en esta ocasión son sus hidroxilos en su superficie, comparados con los dos casos anteriores. Ya que le añade un carácter más polar con respecto a las otras CDs, esto quiere decir que, esta sustitución de hidroxilo le otorga un carácter más hidrofílico a la molécula, lo que genera una menor inclusión debido al cambio químico del entorno superficial de esta ciclodextrina, lo que perjudica las interacciones entre ellos generando un menor número de interacciones posibles con TPs, ya que esta serie de moléculas tienen un carácter altamente apolar. Lo que se expresa en una menor asociación relativa generando un menor orden de magnitud en las constantes de asociación K_a del orden de 100 M^{-1} en general.

Como se observa en este caso con HP- β -CD, con respecto a la β -ciclodextrina y a la Metil- β -ciclodextrina, es decir, una constante de asociación (K_a) de menor ordenes de magnitud con respecto a los dos casos anteriores. Como se muestra en la **Tabla 5**, **Tabla 6** comparados con la **Tabla 7**.

De acuerdo con la con la **Figura 18** y **ecuación 3**. Se observa que para todos los casos de esta serie de TPs con HP- β -CD se ajusta a una curva lineal, como en los casos ya mencionados, y se ratifica que para estos compuestos su estequiometría es 1:1. Se calcularon los valores de las constantes de asociación ($K_{1:1}$) para cada complejo de inclusión formada por triplicado como se observa en la **tabla 7**, a partir de la pendiente e intercepto de la curva obtenidas de la **Figura 19**.

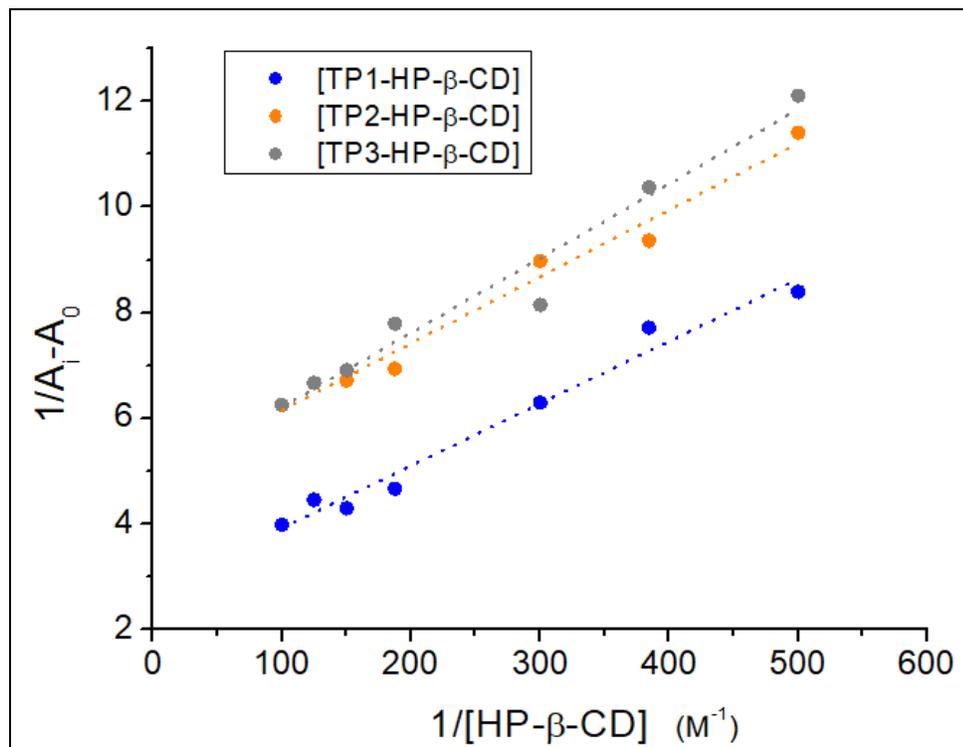


Figura 22. Gráfico del inverso de la Absorbancia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de los distintos TPs con [TP1-HP-β-CD] ($r^2 = 0,979$), [TP2-HP-β-CD] ($r^2 = 0,995$) y [TP3-HP-β-CD] ($r^2=0,979$)

Tabla 7. Contantes de asociación (K_a) a la temperatura 28°C correspondientes a los complejos [HP-β-CD-TP1], [HP-β-CD-TP2] y [HP-β-CD-TP3].

Complejos de inclusión con Ciclodextrinas	K_a (M^{-1}) \pm SD
[HP-β-CD-TP1]	215 \pm 5
[HP-β-CD-TP2]	387 \pm 47
[HP-β-CD-TP3]	344 \pm 20

Se vuelve a observar la misma tendencia creciente de los valores de las constantes de asociación de los complejos:

$[HP-\beta-CD-TP2] > [HP-\beta-CD-TP1] > [HP-\beta-CD-TP3]$. Esto es esperable, ya que se genera el mismo fenómeno que en los experimentos anteriores. La sustitución de la serie de TP2 de la piridina en posición Meta respecto al carbonilo, comparado con TP1, TP3. Suministra una mayor disponibilidad de interacción con respecto a los otros TPs frente a HP- β -CD, lo que se expresa en la misma orden de tendencia creciente de los valores constante de asociación (K_a) y este fenómeno ya ha sido explicado.

6.3. Caracterización termodinámica: Elección de los complejos con mayor Ka

6.3.1. Complejos seleccionados para estudios termodinámicos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].

Como se discutió con anterioridad, en general los compuestos de derivados de triazolopiridinas, presentan el fenómeno de inclusión, es decir, ocurre la formación de los complejos de inclusión con las ciclodextrinas que se utilizaron en este presente trabajo. Este comportamiento se ha podido observar a través del estudio espectroscópico, que permite caracterizar, tanto, termodinámica como fisicoquímicamente el proceso de formación de los complejos de inclusión.

Al determinar los valores de Ka de todos los complejos estudiados se determinó, que los que presentaron mayor valor de constantes, son los complejos que se presentan en la **Tabla 6** con Metil- β -Ciclodextrina, al compararlo entre sí como se puede apreciar en la **Tabla 8** a modo de resumen.

Tabla 8. Contantes de asociación (Ka) a la temperatura 28°C correspondientes a todos los complejos de inclusión estudiados.

Complejos de inclusión	Ka (M ⁻¹) ± SD
[β-CD-TP1]	700 ± 4
[β-CD-TP2]	944± 120
[β-CD-TP3]	202 ± 80
[M-β-CD-TP1]	822 ± 2
[M-β-CD-TP2]	1588 ± 77
[M-β-CD-TP3]	684± 73
[HP-β-CD-TP1]	215 ± 5
[HP-β-CD-TP2]	387 ± 47
[HP-β-CD-TP3]	344± 20

Por tanto, para los estudios, a posteriori, para la determinación de las constantes de asociación de los distintos complejos estudiados a distintas temperaturas se determinó seguir con los complejos que presentan mayor orden de magnitud Ka de toda la serie estudiada los cuales son:

[M-β-CD-TP1], [M-β-CD-TP2] y [M-β-CD-TP3].

Los parámetros termodinámicos, entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) son los que determinaran si la formación de estos complejo inclusión, pueden estar controlada por interacciones entre las TPs, y las ciclodextrinas ya sean puentes de hidrógeno, interacciones de van der waals o por el efecto hidrofóbico resultante de la inclusión de la molécula huésped en la molécula anfitrión. Se podrá determinar cuál de este parámetro es el que porta mayoritariamente a la formación de los complejos de inclusión.

La energía libre de Gibbs (ΔG°), es el parámetro termodinámico que da cuenta de la espontaneidad del proceso de inclusión y junto con la constante de inclusión, permiten validar si el equilibrio es termodinámicamente favorecido hacia la formación de complejos de inclusión.

Con todo lo anteriormente señalado, se utilizaron los complejos de asociación que presentaron mayor constante de asociación (K_a), es decir, los TPs con Metil- β -ciclodextrina; [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3] presentes por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD). Como se muestra en las **Tablas 8**. Para calcular los parámetros termodinámicos, tanto energía libre de Gibbs, como entalpía y de entropía (ΔG° , ΔH° y ΔS°).

Para determinar si la formación de estos complejos de inclusión está regida por una aportación mayoritariamente entrópica o entálpica. Estos complejos de inclusión se llevaron a diferentes temperaturas de acuerdo con la ecuación de van't Hoff (**Ecuación 6**).

6.3.2. Complejo [M-β-CD-TP1] a las distintas temperaturas.

En la **Tabla 9** se muestra el valor de las constantes de asociación para el complejo de inclusión [M-β-CD-TP1] a las distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C presentes por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD). Se puede observar una disminución de su valor a medida que aumenta la temperatura.

En la **Figura 23** se muestra gráfico Van't Hoff que es el Ln (Ka) en función del inverso de la temperatura en Kelvin. Con lo cual se determinaron los parámetros termodinámicos. Los valores de pendiente e intercepto (4461,280 y -8,0471) obtenidos, permitieron la obtención ΔH y ΔS respectivamente según la **ecuación 9**.

Tabla 9. Contantes de asociación (K_a) del complejo del [M- β -CD-TP1] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C.

Complejos de inclusión	K_a (M^{-1}) \pm SD	T° (K)
[M- β -CD-TP1]	1231 \pm 115	293
[M- β -CD-TP1]	822 \pm 2	301
[M- β -CD-TP1]	531 \pm 1,4	310

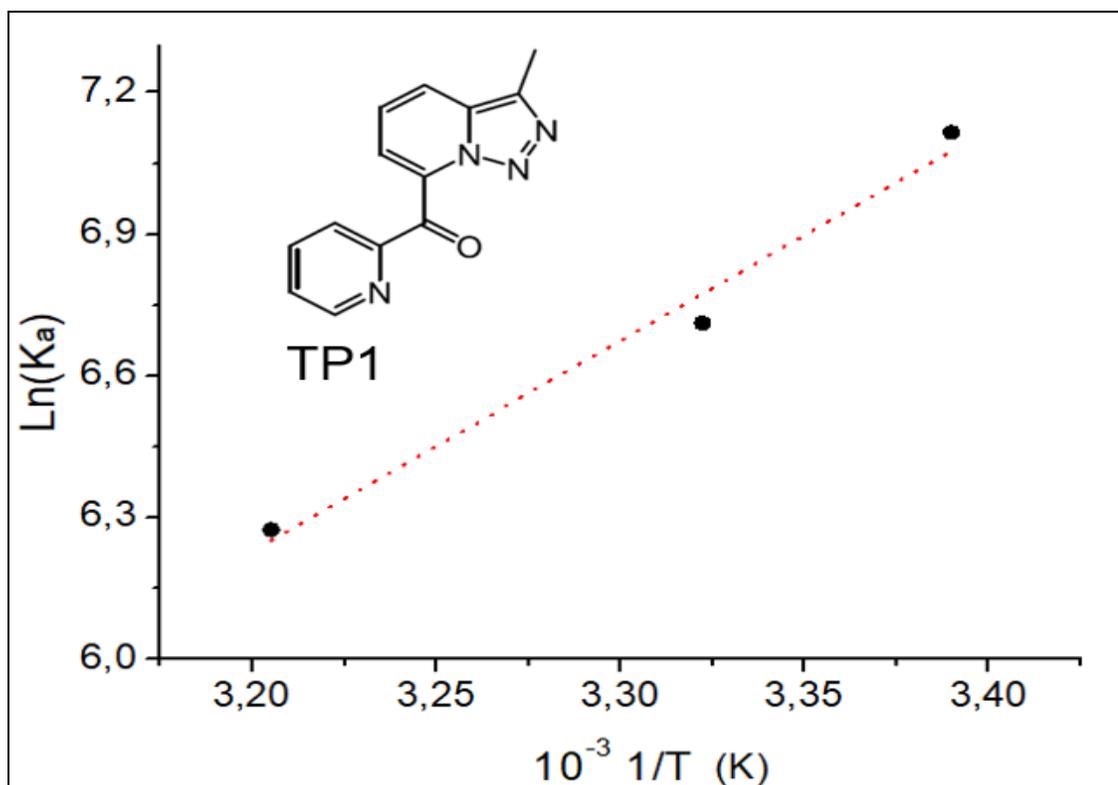


Figura 23. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M- β -CD-TP1], a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C ($r^2 = 0,983$),

Tabla 10. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP1].

Complejos de inclusión	ΔH° (KJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T· ΔS° (KJ·mol ⁻¹)	ΔG° (KJ·mol ⁻¹)
[M-β-CD-TP1]	-37,09	-66,90	-19,93	-17,15

En la **Tabla 10** se observa el análisis de la energía libre de Gibbs permite determinar que el proceso es espontáneo, ya que, el valor de este parámetro termodinámico es negativo, además. Se observó que es un proceso exotérmico debido a un valor de entalpía negativo y el aporte es mayormente entálpico. Lo que indica que la formación de este complejo se ve afectado o desfavorecido a mayores temperaturas. También se observa que hay una contribución parámetro en entrópico este proceso, debido a que hay un aporte del factor entropía a la energía libre de Gibbs, pero es más bien minoritario, pero denota que también hay fuerzas hidrofóbicas rigiendo este proceso.

6.3.3. Complejo [M-β-CD-TP2] a las distintas temperaturas.

En la **Tabla 11** nuevamente se muestra el valor de las constantes de asociación para el complejo de inclusión [M-β-CD-TP2] a las distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C presentes por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD). Se muestra una disminución de su valor a medida que aumenta la temperatura. Al igual que en el caso anterior.

En la **Figura 24** se muestra gráfico Van't Hoff, con la cual se determinaron los parámetros termodinámicos. obteniéndose los valores de pendiente e intercepto de (4094,739 y -8,0471) obtenidos, permitieron la obtención ΔH y ΔS respectivamente según la **ecuación 9**.

Tabla 11. Contantes de asociación (K_a) del complejo del [M- β -CD-TP2] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C.

Complejos de inclusión	K_a (M^{-1}) \pm SD	T° (K)
[M- β -CD-TP2]	1745 \pm 100	293
[M- β -CD-TP2]	1588 \pm 77	301
[M- β -CD-TP2]	844 \pm 36	310

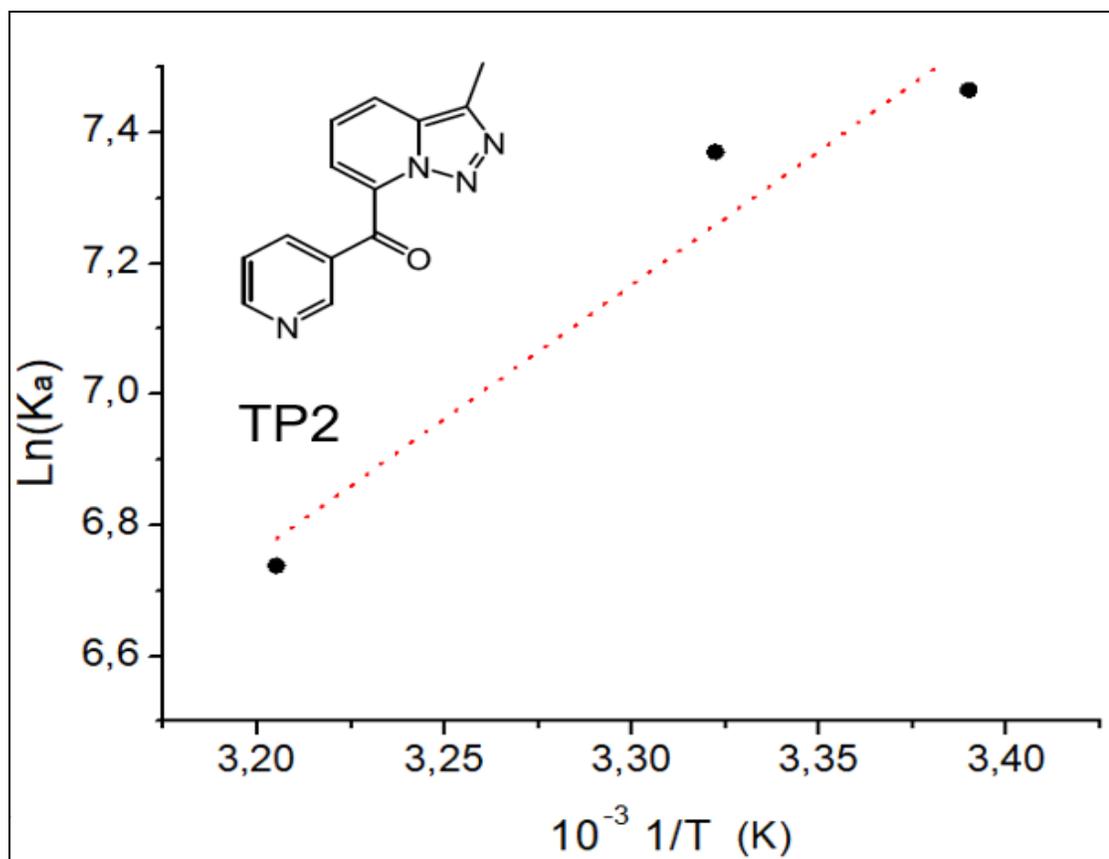


Figura 24. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M- β -CD-TP2], a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C ($r^2 = 0,938$),

Tabla 12. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP2].

Complejo de inclusión	ΔH° (KJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T· ΔS° (KJ·mol ⁻¹)	ΔG° (KJ·mol ⁻¹)
[M-β-CD-TP2]	-34,04	-52,75	-15,72	-18,32

Como se observa en la **Tabla 12** Con los valores de ΔH y ΔS obtenidos, se determinó el valor de ΔG el cual indica que el complejo [M-β-CD-TP2] es un proceso espontaneo y además exotérmico, debido a que los valores de ΔG , ΔH son negativos y nuevamente hay un aporte mayor de la entalpia, por tanto, se ve favorecida la formación del complejo cuando no se aplica calor al sistema, es decir, se ve favorecido el equilibrio hacia los productos en estas condiciones. Además, presenta un valor más bien pequeño del factor entropía y es negativo, por tanto, el sistema no debe presentar demasiada perturbación en la formación del complejo.

6.3.4. Complejos [M- β -CD-TP3] a las distintas temperaturas.

En la **Tabla 13**, como en los casos anteriores, se muestra el valor de las constantes de asociación para el complejo de inclusión [M- β -CD-TP3] a las distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C. Presentes por triplicado con su correspondiente desviación estándar (SD). Se muestra una disminución de su valor a medida que aumenta la temperatura igual que en los dos casos anteriores.

, En la **Figura 25** se muestra el gráfico de Van't Hoff que es el Ln (Ka) en función del inverso de la temperatura en Kelvin. Con lo cual se determinaron los parámetros termodinámicos. Los valores de pendiente e intercepto (6154,547 y -13,909) obtenidos respectivamente permitieron la obtención ΔH y ΔS según la **ecuación 9**.

Tabla 13. Contantes de asociación (K_a) del complejo [M- β -CD-TP3] a la temperatura de 20°C, 28°C y 37°C

Complejos de inclusión	K_a (M^{-1}) \pm SD	T° (K)
[M- β -CD-TP3]	1053 \pm 56	293
[M- β -CD-TP3]	684 \pm 73	301
[M- β -CD-TP3]	337 \pm 32	310

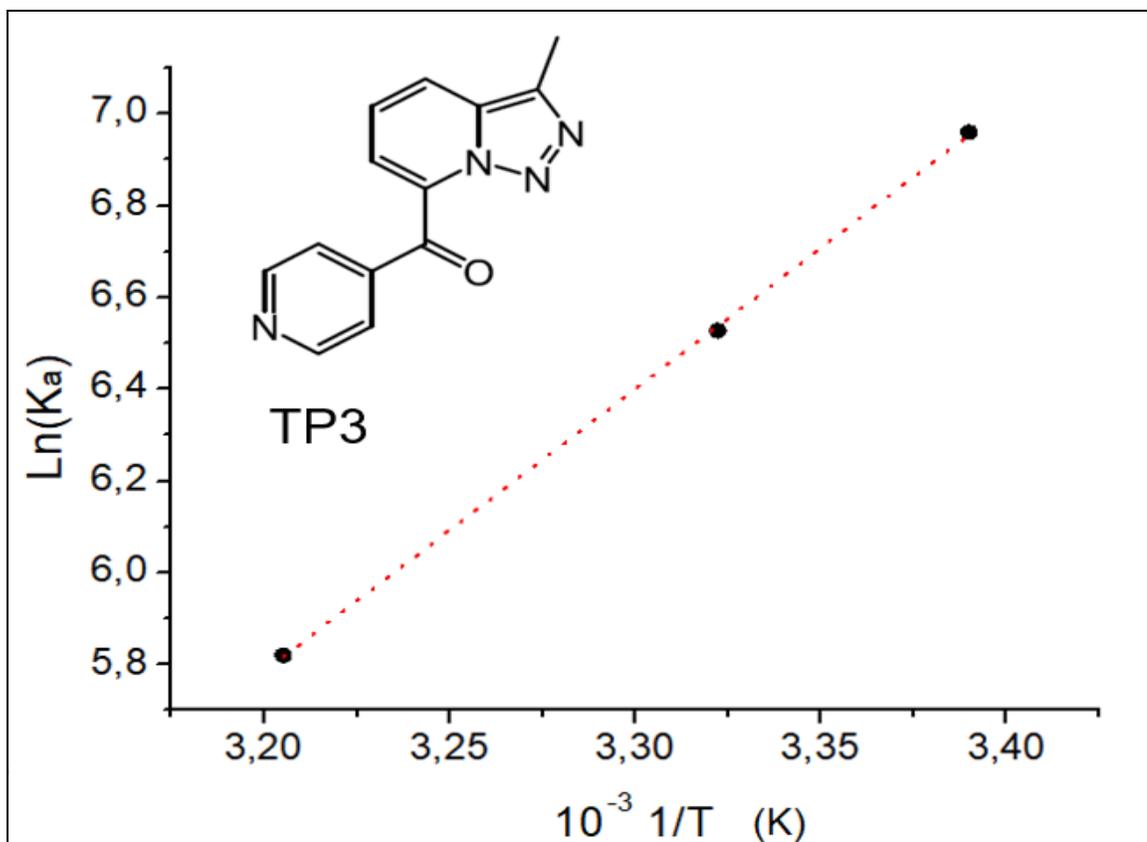


Figura 25. Gráfico de Van't Hoff para el complejo [M- β -CD-TP1] a distintas temperaturas 20°C, 28°C y 37°C ($r^2 = 0,999$),

Tabla 14. Parámetros termodinámicos del complejo [M-β-CD-TP3].

Complejos de inclusión	ΔH° (KJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T· ΔS° (KJ·mol ⁻¹)	ΔG° (KJ·mol ⁻¹)
[M-β-CD-TP3]	-51,16	-115,64	-34,46	-16,70

Como se observa en la **Tabla 14**. El análisis de la energía libre de Gibbs permite determinar que el proceso es espontáneo, ya que, el valor de este parámetro termodinámico es negativo, además. Se observó que es un proceso exotérmico debido a un valor de entalpía negativo, y el aporte del factor entropía es pequeño y negativo al igual que en los dos casos anteriores.

6.3.5. Comparación de los parámetros termodinámicos entre los complejos seleccionados.

A partir de todos los parámetros termodinámicos estudiados, se muestra una tabla resumen (**Tabla 15**), con los valores de los parámetros termodinámicos de los complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3] entalpía ΔH , entropía ΔS energía libre de Gibbs (ΔG°) para el proceso de inclusión estudiados.

Los valores de ΔG° negativos para [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3] en unidades de (kJ/mol), para estos complejos muestran que el proceso de inclusión para todos los complejos es favorecido termodinámicamente y sugieren que el complejo [M- β -CD-TP2], es decir, la molécula TP2 es la más favorecida para este proceso termodinámico, cabe destacar que estas diferencias ΔG° son menores, por tanto, se podría concluir que el proceso de formación de complejos esta favorecido para todos los complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].

Tabla 15. Resumen de los valores de los Parámetros termodinámicos de los complejos [M-β-CD-TP1], [M-β-CD-TP2] y [M-β-CD-TP3] a la temperatura de 25°C

Complejos de inclusión	ΔH° (KJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T· ΔS° (KJ·mol ⁻¹)	ΔG° (KJ·mol ⁻¹)
[M-β-CD-TP1]	-37,09	-66,90	-19,93	-17,15
[M-β-CD-TP2]	-34,04	-52,75	-15,72	-18,32
[M-β-CD-TP3]	-51,16	-115,64	-34,46	-16,70

En la **Tabla 15**, también se muestran que las serie [M-β-CD-TP1], [M-β-CD-TP2] y [M-β-CD-TP3] tienen entalpías negativas ($\Delta H^\circ < 0$), y mayoritario respecto al factor entrópico también negativo ($T\Delta S < 0$). Si bien, son muy similares en magnitud, la entalpia es mayor, en aporte, lo que indica al ser negativa que el proceso de inclusión es exotérmico y que, por lo tanto, esta favorecido a menor temperatura. y que estaría principalmente controlado por interacciones de Van der Waals entre el huésped y la cavidad de la ciclodextrina [47]. Estas interacciones están constituidas por interacciones i)

dipolo-dipolo, consistentes en las interacciones entre dipolos permanentes, ii) dipolo-dipolo inducido, consistentes en un dipolo permanente que induce un dipolo en otra molécula, y iii) de dispersión, que son causadas por la sincronización del movimiento electrónico entre dos moléculas, lo que resulta en dipolos momentáneos que se orientan para provocar su atracción. Dada la polarizabilidad de ambas moléculas (huésped y anfitrión) estas interacciones pueden explicar los valores negativos de entalpía como se había mencionado [48]. Asimismo, se debe considerar la formación de enlaces por puentes de hidrogeno entre el huésped y los grupos hidroxilo del anfitrión.

El valor de entropías ($\Delta S^\circ < 0$), es negativas y es más bien pequeño con respecto al ΔH° lo que indica que, el cambio entrópico del sistema no es significativo en la estabilización del complejo de inclusión. Este fenómeno se explica considerando que la inclusión de los compuestos TP1, TP2 y TP3 en la ciclodextrina, produce una reorganización y desolvatación asociada con la formación del complejo de inclusión, debido a que las moléculas de agua que se encuentran dentro de la cavidad de la ciclodextrina son expulsadas para que ingrese los TPs. Por lo tanto, el cambio de entropía observado puede ser originado por la ganancia entrópica, derivada a partir de la reorganización de las moléculas de agua que originalmente solvatan a la molécula anfitrión, junto con la pérdida entrópica del ligando, la cual se relaciona con la disminución de los

grados de libertad después del proceso de complejación. Como estos efectos, son opuestos la variación de entropía es negativa (**Tabla 15**) y, por lo tanto, no es un aporte significativo a la estabilización del complejo de inclusión.

A modo de resumen, ya que los valores termodinámicos en magnitud son muy similares se puede determinar que para los complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3], se observa que $\Delta H^\circ > T\Delta S^\circ$, en consecuencia, el control termodinámico para la formación del complejo de inclusión es entálpico. Por consiguiente, la entalpía aporta más que el factor entrópico en la estabilización de los complejos de inclusión.

6.3.6. Modelamiento matemático de la interacción de los complejos; Estudio Docking

Como resultado del docking molecular se obtuvieron distintas conformaciones de los de todos los complejos de inclusión estudiados:

- (A) [β -CD-TP1], [β -CD-TP2] y [β -CD-TP3].
- (B) [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].
- (C) [HP- β -CD-TP1], [HP- β -CD-TP2] y [HP- β -CD-TP3].

Dentro de la cavidad de las distintas ciclodextrinas, se analizaron las conformaciones más probables y la energía de acoplamiento más estables, de estos se obtuvieron 3 tipos de conformaciones que corresponde a la conformación más probable. Cabe destacar que la serie de moléculas TP1, TP2 y TP3 están superpuestas en las ciclodextrinas correspondientes como se puede apreciar en las siguiente (**Figuras 26,27 y 28**).

Como se ha mencionado, las siguientes representaciones de los modelos obtenidos por docking para los complejos de inclusión entre Metil- β -ciclodextrina y las TPs. Para destacar los heteroátomos se emplearon los colores blancos para el átomo de hidrógeno, rojo para el átomo de oxígeno, azul para el átomo de nitrógeno.

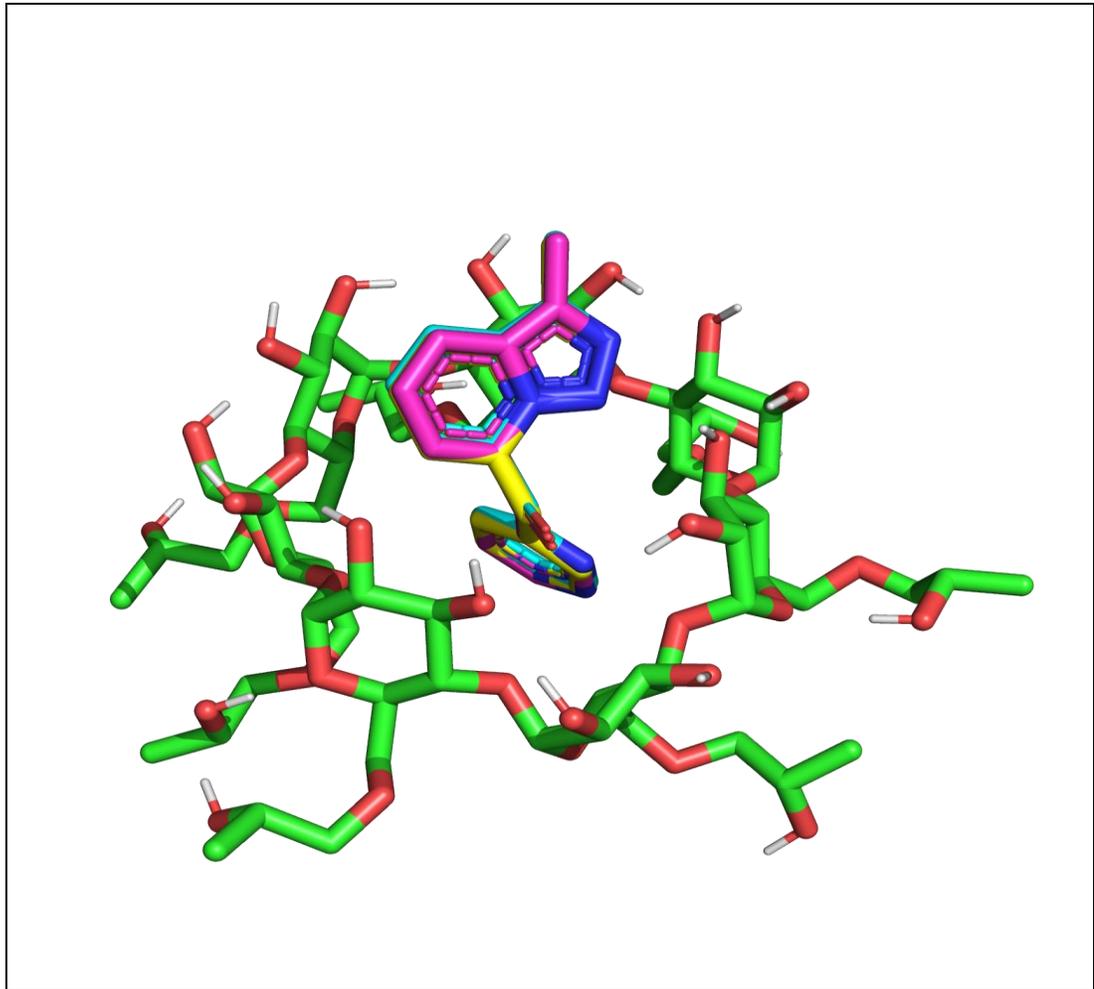


Figura 26. Conformación estructural para los complejos (A) más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.

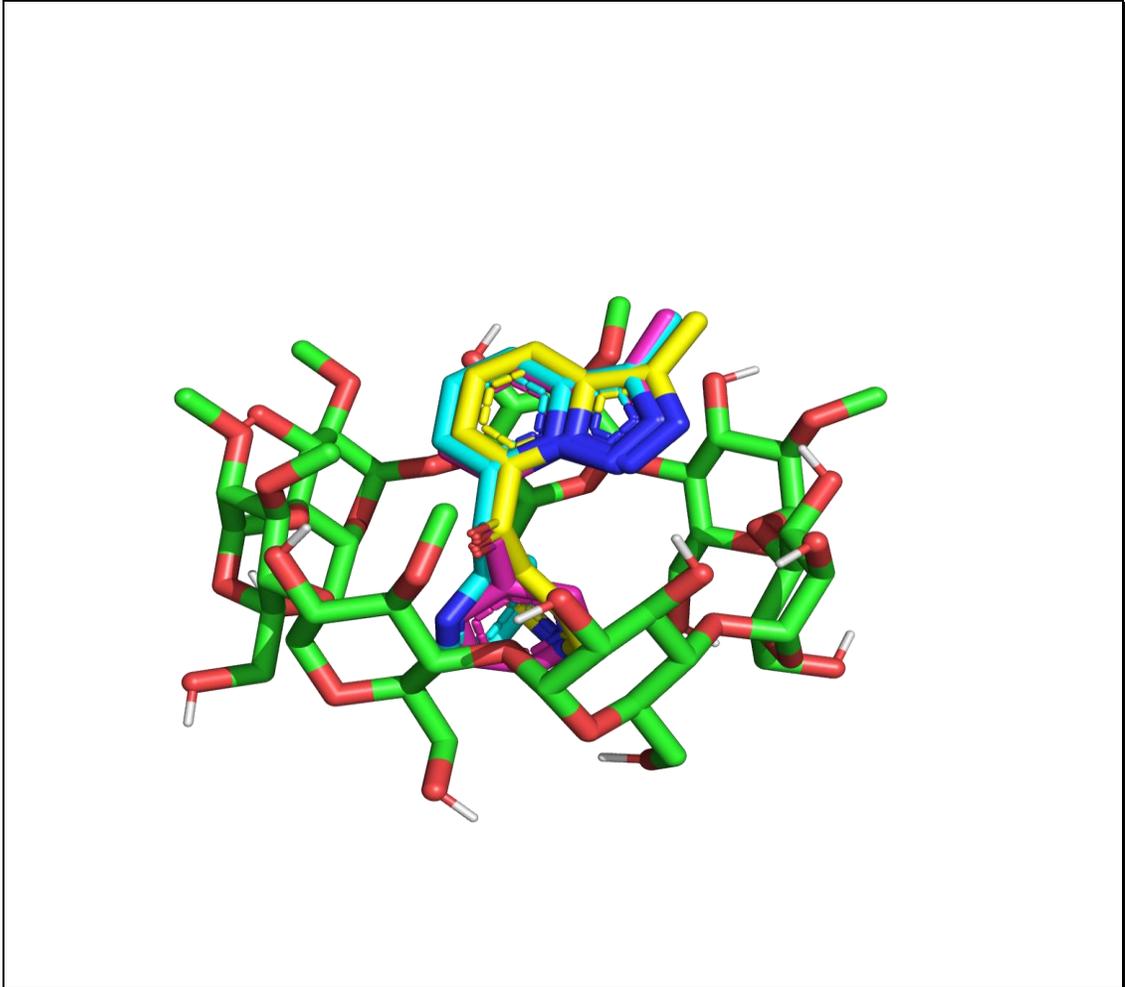


Figura 27. Conformación estructural para los complejos (B), más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.

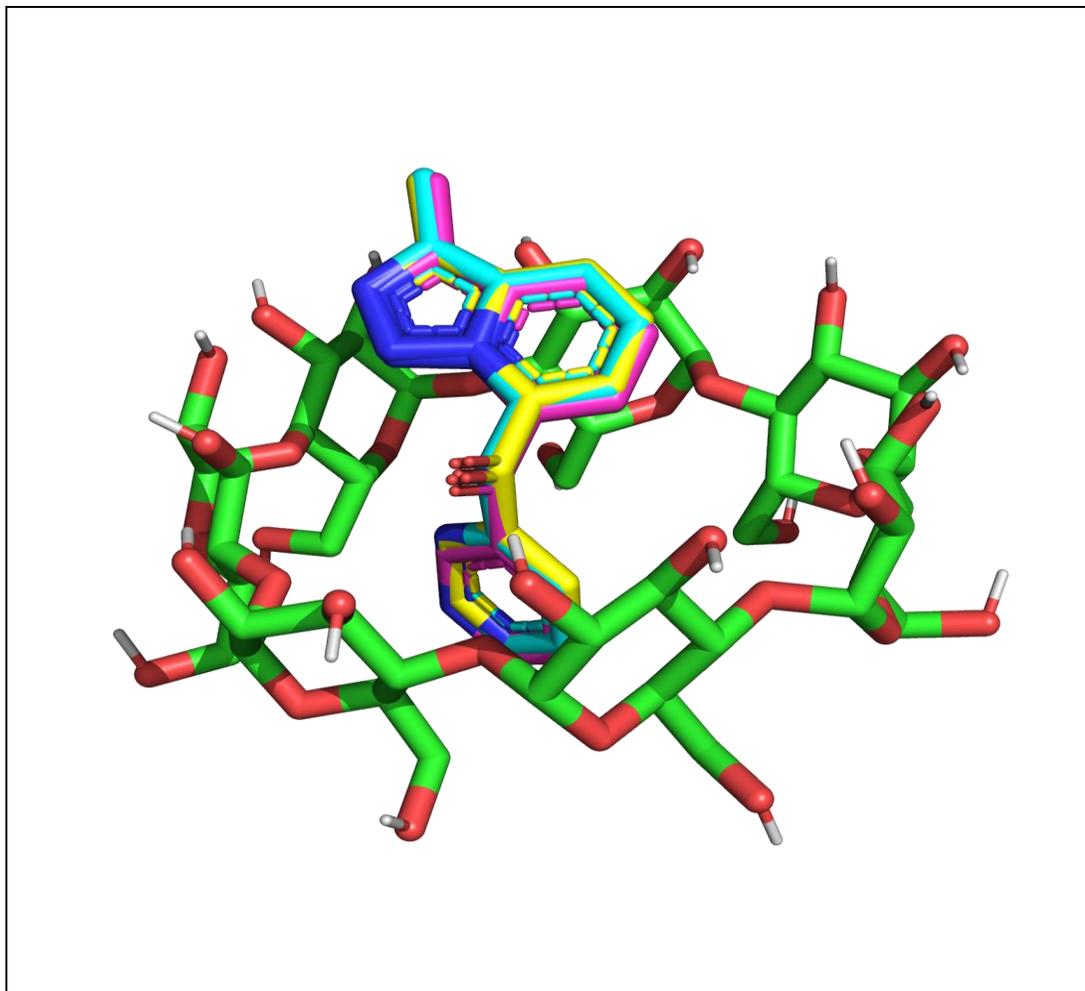


Figura 28. Conformación estructural para los complejos (C), más probable, es decir, estructuralmente más favorecida obtenido por docking molecular.

Tabla 16. Datos obtenidos por docking para el proceso de formación para todos los complejos; (A), (B) y (C).

Ciclodextrinas	TP1(score)	TP2 (score)	TP3 (score)
β -CD	-5.43	-5.51	-5.44
M- β -CD	-6.16	-6.13	-6.31
HP- β -CD	-6.19	-6.16	-6.26

Las conformaciones (A), (B) y (C) son altamente probables, es decir, las moléculas de la serie de derivados de triazolopiridinas TP1, TP2 y TP3 (ligandos) enfrentadas a las ciclodextrinas (receptores) de este estudio. Todas tienen el anillo pirimidínico del carbonillo de la posición 7 del núcleo triazolicopiridinico dentro, incluida en la CDs; quedando afuera el resto las moléculas, para cada una de las conformaciones estudiadas.

Esto es interesante, y se puede corroborar la explicación dada al inicio del estudio, ya que, por un análisis estructural de las moléculas TP1, TP2 y TP3, era de esperar que la inclusión ocurriera por la sección de anillo piridinico del carbonillo de la posición 7 del núcleo triazolicopiridinico de las tres moléculas presentes en este estudio.

En la **Tablas 16** se puede ver los valores de score para cada conformación, las energías son muy similares, por tanto, con esto valores de Docking no se podría corroborar la explicación que se presenta en el estudio experimentales de el por qué, la molécula TP2 presenta mejores Ka en todos los casos. Para poder determinar cuál de las estructuras es más probable, ya que las obtenidas por acoplamiento no muestran diferencias. Para estudios posteriores se deberá realizar estudios de dinámica molecular, de las cuales se obtendrían datos de comportamiento para los complejos.

Se analizaron las distancias entre átomos para buscar posibles puentes de hidrógenos en las estructuras determinadas, de acuerdo con la **Tabla 17, 18 y 19**. Se observan puente de hidrógeno en las tres conformaciones, lo que nos ratifica que hay un aporte entálpico por la formación de los mismo pero que a su vez también indica que hay aporte entrópico, ya que, si bien hay formación puentes de hidrogeno estos son escasos, lo que se puede deber nuevamente al aporte entrópico específicamente las interacciones hidrofóbicas.

Para los complejos de inclusión realizados en docking, se puede ver en las siguientes Figuras y tablas las distancias de interacción de los puentes de hidrógenos y el lugar en donde se generan respectivamente.

Tabla 17. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno con β -CD.

Complejos de inclusión	Distancia Donor- Aceptor (Å)
[β -CD-TP1]	2,9
[β -CD-TP2]	3,0
[β -CD-TP3]	2,9

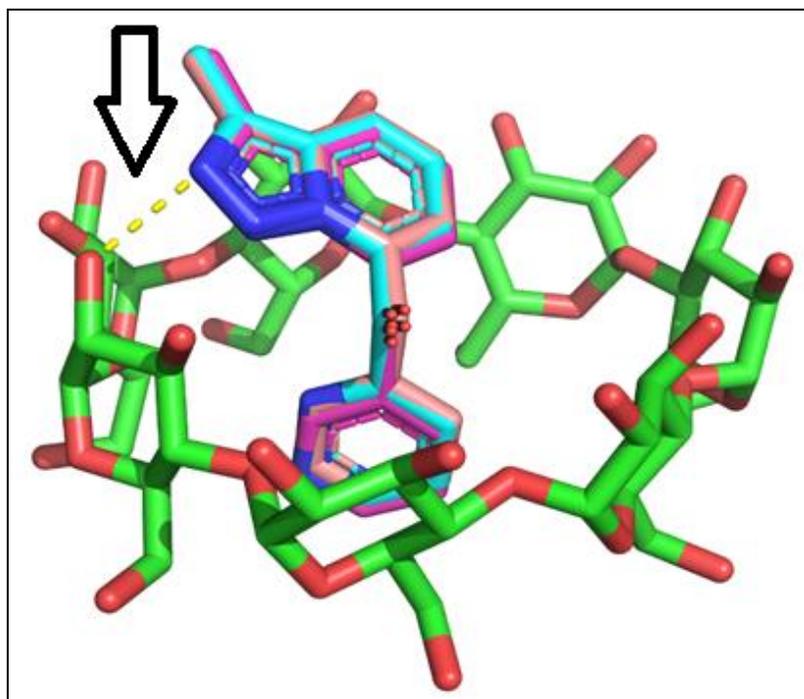


Figura 29. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la β -CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina.

Tabla 18. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno con M- β -CD.

Complejos de inclusión	Distancia Donor- Aceptor (Å)
[M- β -CD-TP1]	3,0
[M- β -CD-TP2]	3,0
[M- β -CD-TP3]	3,0

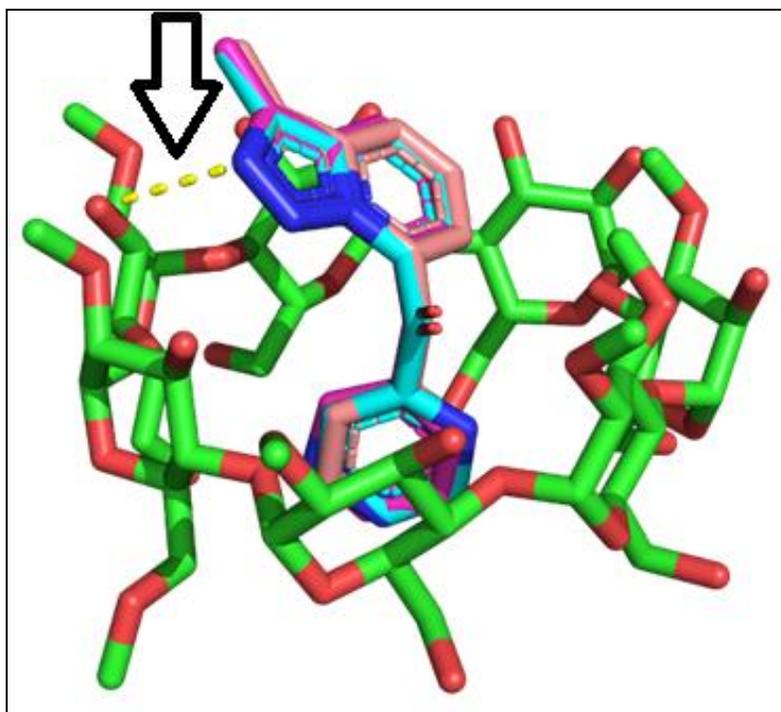


Figura 30. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la M- β -CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina

Tabla 19. Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrógeno con HP- β -CD.

Complejos de inclusión	Distancia Donor- Aceptor (Å)
[HP- β -CD-TP1]	2,8
[HP- β -CD-TP2]	2,9
[HP- β -CD-TP3]	2,8

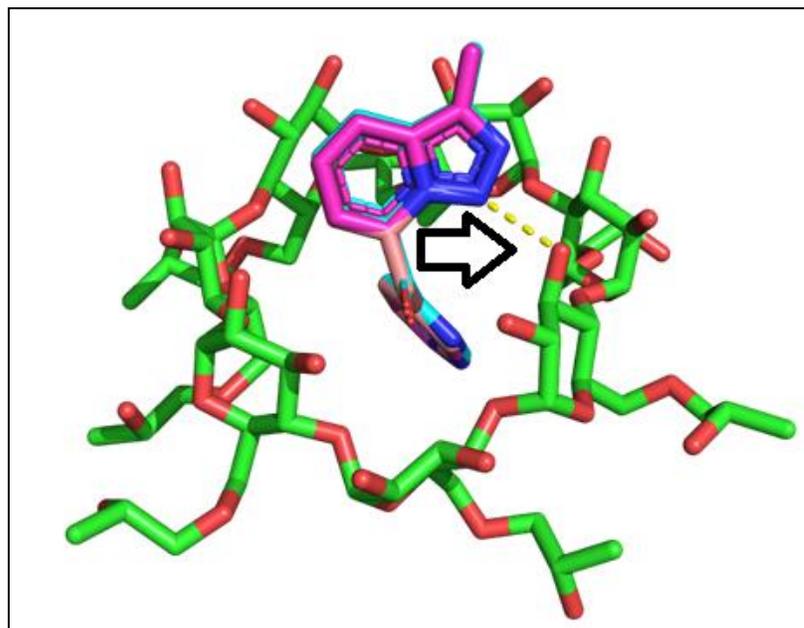


Figura 31. Distancia donador-aceptor para formación de puente de hidrógeno entre hidroxilo (R-OH) de la HP- β -CD y el nitrógeno (N) del derivado de triazolopiridina.

6.4. Ensayo de actividad tripanocida por citometría de flujo: Incorporación de sonda Zombie UV ®.

Dado que los derivado triazolopiridinas son activa frente al parásito *tripanosoma cruzi* [49] en las formas no infectivas, en la presente tesis se ha evaluado la actividad de las series de derivado de triazolopiridina TP1, TP2, TP3. Sobre la forma infectiva del parásito mediante la técnica de citometría de flujo. Esta técnica se basa en la utilización de variados láseres en distintas longitudes de ondas, que permiten evaluar distintos parámetros celulares, entre ellos, la forma y la complejidad interior de las células. Junto con distintos fluoróforo, se puede determinar algunos fenómenos como la despolarización de membranas y constitución de las mismas (fluidez, componentes, etc.).

Para este estudio, se ha utilizado un fluorocromo no permeable llamada sonda zombie UV ®. Esta sonda es un sensor capaz de atravesar la membrana celular de las células muertas y adherirse a los grupos aminos en el interior de estas. Sin embargo, en las células que están vivas el fluoróforo no es capaz de ingresar, quedando retenidas en la membrana celular del parásito (**Figura 32**).

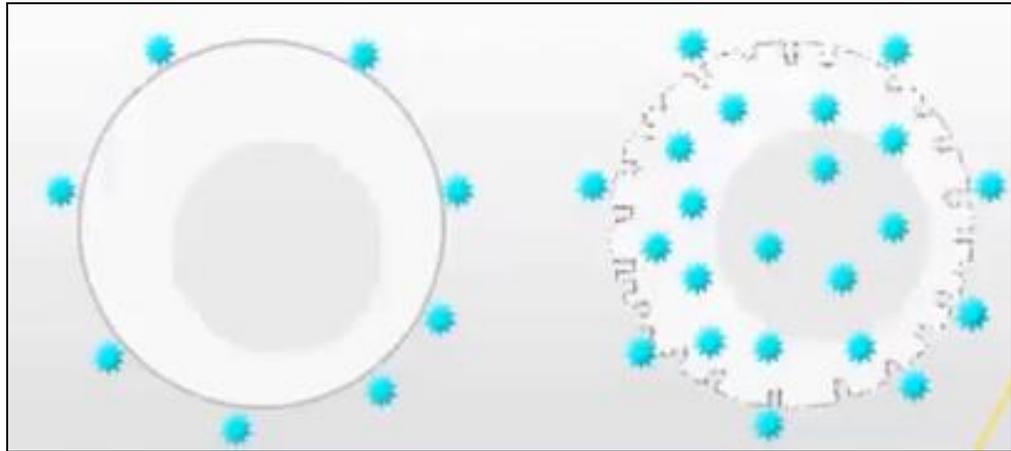


Figura 32. representación gráfica del mecanismo del fluorocromo, sonda zombie UV ®.

Debido a lo anterior, es posible diferenciar entre células vivas que el fluorocromo no ingresa a estas y las células muertas, que sí logra entrar al interior de la célula. El citómetro es capaz de diferenciar la intensidad del fluoróforo en el interior de las células y cuantificarlas, de manera que se discrimina por número de células y por el aumento de la fluorescencia.

Mediante la utilización de la dispersión o la transmitancia del láser (ssc/fsc) del citómetro de flujo, se ha podido observar que existe dos grupos de células que corresponden a dos poblaciones diferentes de parásito. Estas varían en su complejidad y su forma; SSC-A y FSC-A respectivamente.

En este experimento se consideró estas características para determinar la población de estudio (control).

Para evaluar la actividad de los derivados de triazolopiridinas, los *tripomastigote* se incubaron con los TPs libre y con los complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3] para comparar la efectividad de esta serie de compuestos. Los ensayos se realizaron durante 24 horas.

Los resultados arrojaron que los TPs libres presenta una mayor actividad tripanocida, a diferencia de los complejos de inclusión de esta serie que no se observó un efecto tan marcado en la concentración floróforo. Esto se puede deber a que el complejo de inclusión no libera a los TPs en el interior del parásito, por el contrario, no ingresan al interior del parasito, pero esto se discutirá con detalle más adelante.

Cabe destacar que los análisis a exponer son del compuesto TP2 libre y el complejo de inclusión [M- β -CD-TP2], los cuales presentaron la mayor actividad de toda la serie. Ya que los resultados de los complejos [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP3] no fueron concluyentes.

6.4.1 Ensayo de viabilidad celular. para TP2 compuesto libre: análisis Dot Plots

En la siguiente **Figura 33** se seleccionó la población, en la cual se realizaron todos los estudios de viabilidad celular para el compuesto TP2 libre.

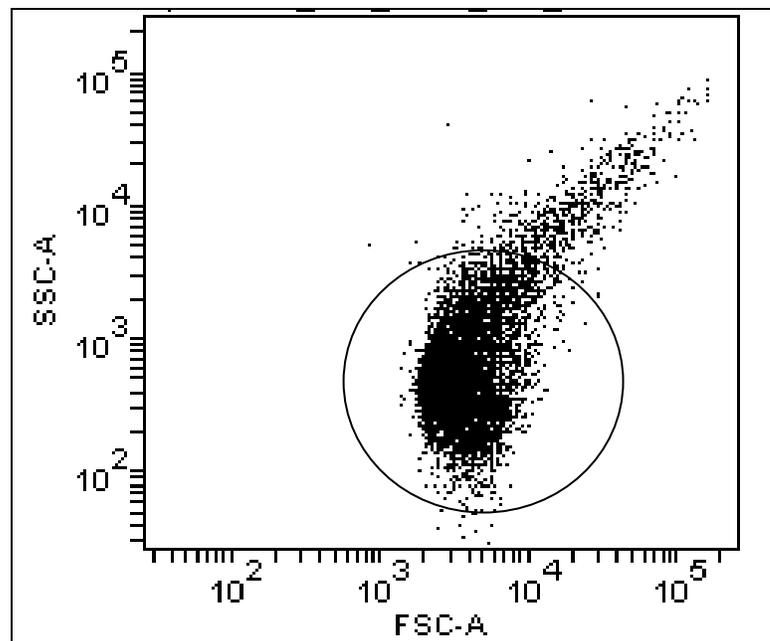


Figura 33. Dot plot representativo de la población control de *tripoastigote* con TP2 libre, siendo SSC-A referencia a la complejidad de la célula y FSC-A referencia al tamaño celular.

En la siguiente **Figura 34**, se observa en la parte superior del gráfico la presencia de algunos parásitos de forma irregular. La población seleccionada corresponde a 10.000 parásitos los cuales son considerados en todas las mediciones.

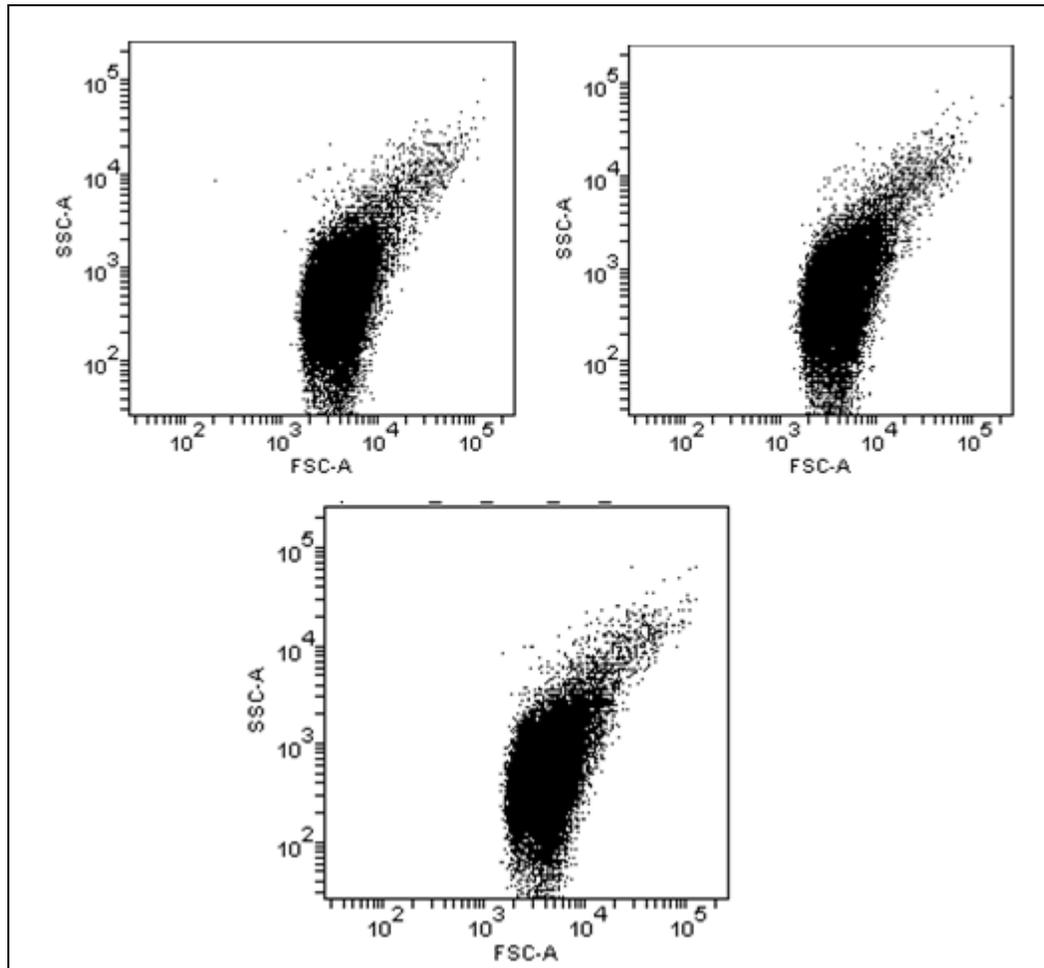


Figura 34. Dot plot representativo del compuesto TP2 libre a distintas concentraciones de 63 μ M, 125 μ M y 250 μ M de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.

A diferencia del control, al añadir TP2, estos parásitos mostraron que hay un cambio en la población referente al tamaño de célula y a la complejidad interna de este, es decir, que aumenta el volumen celular en el interior del parásito y aumenta la granularidad del citoplasma, respectivamente.

6.4.2. Ensayo de viabilidad celular complejo [M-β-CD-TP2]: análisis Dot plots

En la siguiente **Figura 35** se seleccionó la población, en la cual se realizaron todos los estudios de viabilidad celular para el complejo [M-β-CD-TP2] al igual que en el experimento anterior.

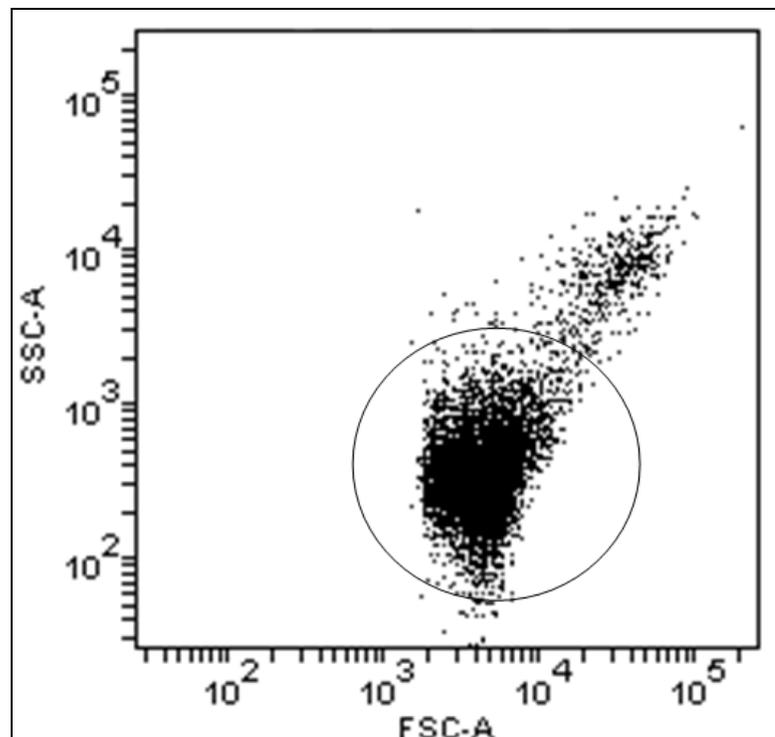


Figura 35. Dot plot representativo la población control de *tripomastigote* siendo SSC-A una referencia a la complejidad de la célula y FSC-A una referencia al tamaño de la célula para el complejo de inclusión [M-β-CD-TP2].

A diferencia Dot Plot de la población control, mostraron que la interacción del complejo [M-β-CD-TP2] con los parásitos, modificaron la complejidad interna de los parásitos, sin embargo, respecto al tamaño celular se ve reflejado

un aumento del volumen del parasito, esto se potencia a medida que se aumenta la concentración del complejo como se aprecia en la **Figura 36**.

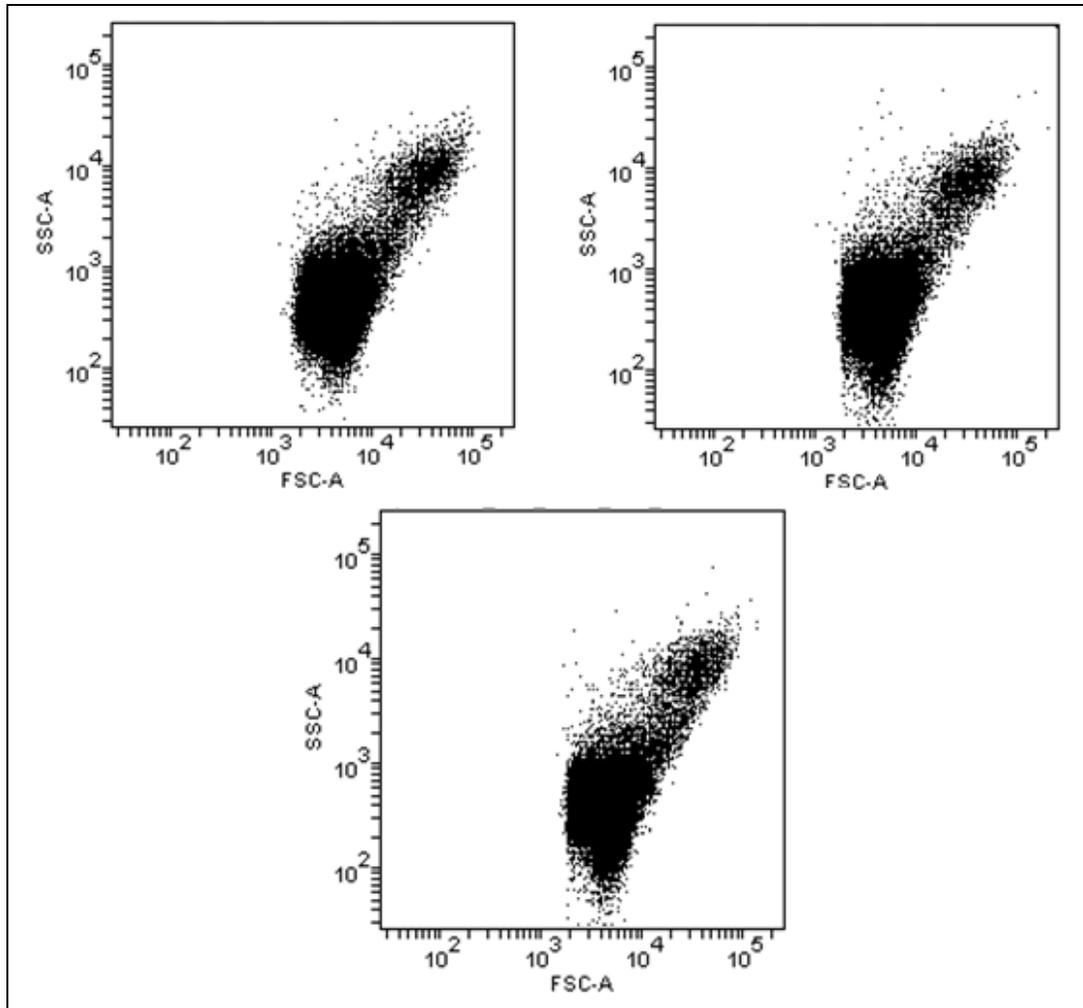


Figura 36. Dot plot representativo del complejo [M-β-CD-TP2] a distintas concentraciones de 63 μM, 125 μM y 250 μM de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.

6.3.4. Análisis histogramas del compuesto libre TP2

En los ensayos y estudios preliminares [49], se ha logrado identificar que los derivados de triazolopiridina libres, tienen un valor de IC_{50} , en ensayos de MTT, por sobre 100 μM . Por lo cual, se seleccionaron 3 concentraciones de IC_{50} . Los cuales son; uno por encima de ese valor IC_{50} 250 μM , una próxima al IC_{50} 125 μM y una por debajo de 63 μM .

Mediante la sonda zombie UV ®, se logró identificar aquellas células que incorporaban a la sonda fluorescente, es decir, se logra identificar las células muerta como se observa en la **Figura 37**, en donde el primer pick corresponde a las células vivas y el segundo pick corresponde a las células muertas respectivamente.

Los resultados muestran que al aumentar la concentración se logra un máximo de muerte de un 30 % del cultivo total de *tripomastigote*, sin embargo, en los datos experimentales obtenidos en estudios anteriores para *epimastigote* forma replicativa [49]. Se encontró que la muerte de los parásitos era del orden de concentraciones de 6,8 μM , esto mediante la técnica de MTT. Por tanto, los valores de viabilidad obtenidos en *tripomastigote* por citometría de flujos son

distintos a los obtenidos por MTT en epimastigote forma replicativa, esto se debe a que los estadios son distintos respecto al parásito. Un estadio es replicativo (*epimastigote*) y el otro estadio es infeccioso (*trípomastigote*). Al ser replicativo uno de ellos, va a producir un efecto adverso en la ruta del metabolismo de la síntesis de esteroides como se ha expuesto anteriormente.

Por el contrario, los *trípomastigotes* al ser infecciosos y no replicativos el efecto sobre la síntesis de esteroides es menor, esto debido a la morfología distintiva dependiente del estadio del parásito.

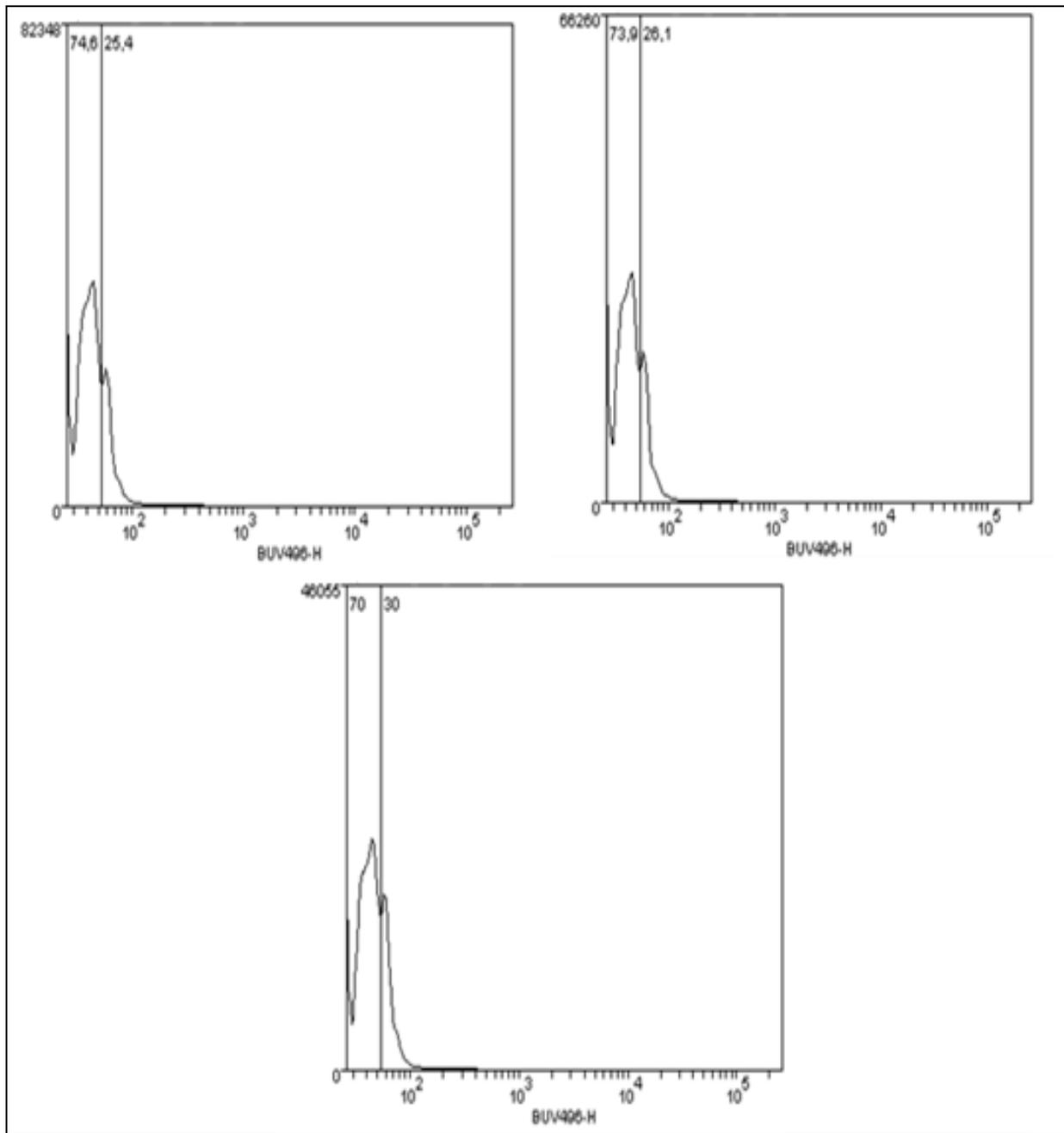


Figura 37. Histograma representativo del compuesto libre TP2 a distintas concentraciones 63 μM , 125 μM y 250 μM , de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.

6.3.4. Análisis histograma del complejo de inclusión [M-β-CD-TP2].

En el caso del complejo [M-β-CD-TP2], como se observa en la **Figura 38**, el efecto sobre la viabilidad fue menor en comparación con el compuesto libre, esto debido a que posiblemente no ingrese al interior parasito, sin embargo, según los Dot Plots anteriores se pudo observar un aumento en el volumen celular. Esto se podría explicar por una acumulación del complejo [M-β-CD-TP2] sobre la membrana celular del parasito produciendo el efecto explicado anteriormente.

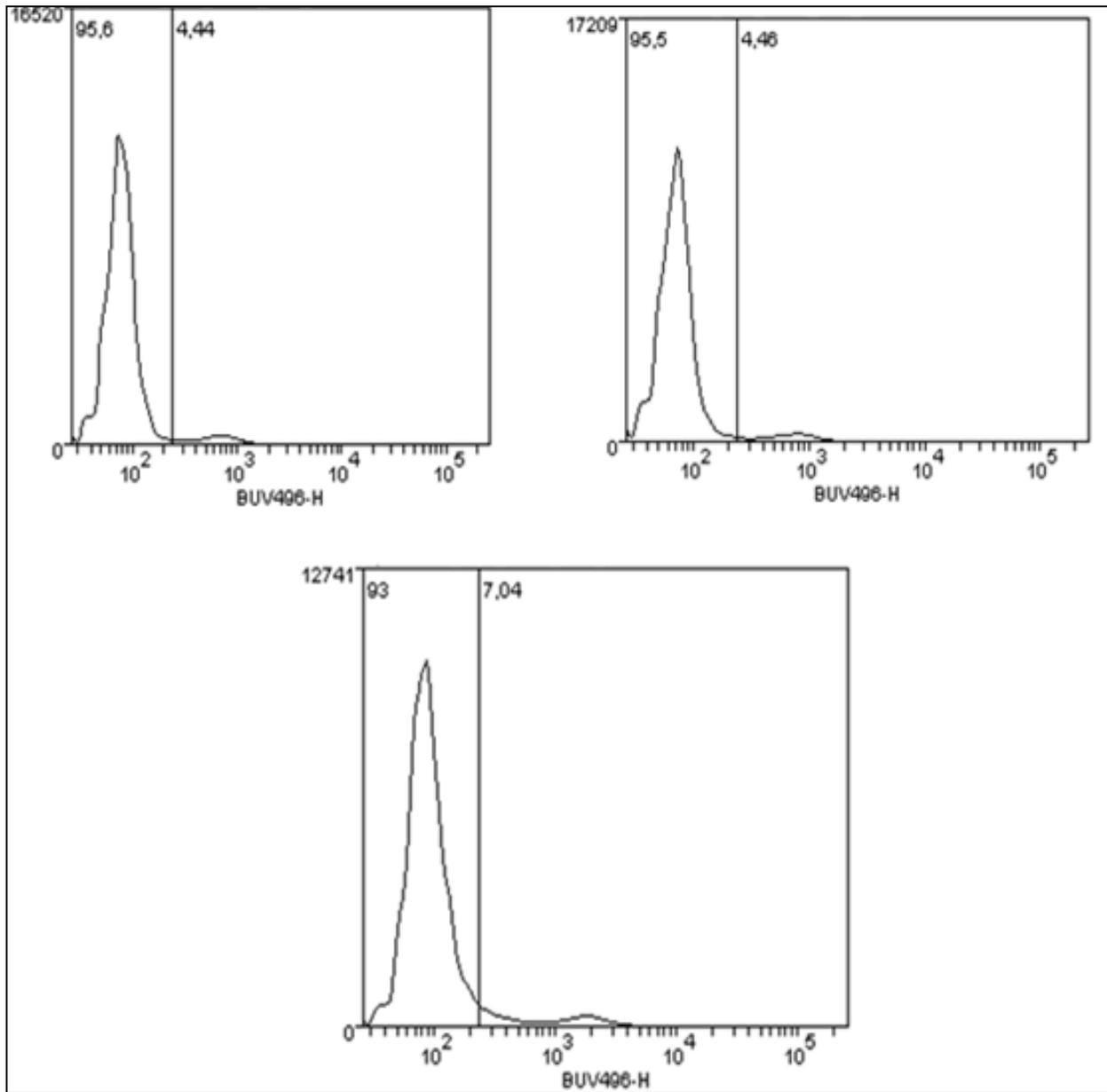


Figura 38. Histograma representativo del complejo [M-β-CD-TP2] distintas concentraciones 63 μM, 125 μM y 250 μM, de izquierda a derecha respectivamente; vehículo en DMSO.

Por lo tanto, los datos obtenidos a través de citometría de flujo mostraron que el compuesto TP2 libre es activo a la forma *tripomastigote* pero tiene mayor potencia sobre el estadio *epimastigote*. Respecto al complejo de inclusión [M- β -CD-TP2], resultados muestran que no es muy efectivo debido a que posiblemente se retiene en la membrana celular del parásito disminuyendo el efecto a diferencia del compuesto TP2 libre.

7. Conclusiones

Los valores de las constantes de asociación obtenidas por el método Benessi-Hildebrand indican los TPs se incluye dentro de las ciclodextrinas, es decir, los derivados de triazolopiridina forman complejos de inclusión con β -ciclodextrina, Metil- β -ciclodextrina y la Hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Toda la serie de complejos de inclusión estudiados presentan una estequiometría 1:1, de acuerdo con la ecuación de Benessi-Hildebrand. Las constantes de inclusión obtenidas se encuentran en un orden de magnitud mayor a 200 M^{-1} para todos los complejos estudiados. La formación de estos complejos de inclusión con la ciclodextrina permitió aumentar la solubilidad en fase acuosa y fue posible estudiar su comportamiento termodinámico. Demostrando que los complejos de inclusión con M- β -CD presentaron los mejores valores para la inclusión de estos compuestos.

Para los estudios termodinámicos, solo se analizaron que los complejos que presentaron mayor valor de constantes de asociación la serie TP1, TP2 y TP3, los cuales fueron; [M- β -CD-TP1], [M- β -CD-TP2] y [M- β -CD-TP3].

Los valores del cambio de energía libre de Gibbs muestran que la formación de los complejos de inclusión es favorecida termodinámicamente para la serie TP1, TP2 y TP3 con Metil- β -ciclodextrina. Además, para esta serie de complejos de inclusión, los valores de entalpía ($\Delta H^\circ < 0$) son negativos, por lo cual, el proceso es exotérmico. Los valores de entropías ($\Delta S^\circ < 0$), son negativos y es más bien pequeño con respecto al ΔH° lo que indica que, el cambio entrópico del sistema no es significativo en la estabilización del complejo de inclusión, lo cual indica que este proceso es controlado por la entalpía y consecuentemente son las interacciones TPs/ciclodextrinas las que estabilizan al complejo de inclusión.

Los estudios de anclaje molecular (*docking*) para la serie de derivados de triazolopiridina TP1, TP2 y TP3 indicaron que las interacciones, principalmente de puentes de hidrógeno, favorecen la inclusión de la molécula dentro de las ciclodextrinas y aportan en la estabilización de los complejos. Se evidenció también la geometría de inclusión TPs-ciclodextrina.

Finalmente, los estudios en citometría de flujo mostraron que los parámetros de complejidad celular y tamaño de célula observados con el TP2 libre y el complejo [M- β -CD-TP2], demostraron que la capacidad de liberación del compuesto dentro de la célula se ve disminuido por una posible retención en

la membrana celular, no así en el caso TP2 libre que logra ingresar a la célula produciendo el efecto deseado.

8. Bibliografía

- [1] Korolkovas, A., et al. Compendio esencial de química farmacéutica. *Ed Reverté*, 1983.
- [2] Organization, W.H., Chagas disease (American trypanosomiasis). Updated March 2015. Fact sheet N°340.
- [3] Dias, J., A. Silveira, and C. Schofield, The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002. 97: p. 603-612.
- [4] Lee, BY., et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*, 2013. 12: 342–48.
- [5] Pérez Molina, J., et al. Chagas disease. *Lancet*, 2018. 391: 82–94.
- [6] Conteh, L., et al. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 2010. **375**(9710): 239-247.
- [7] Lee, BY., et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*, 2013. **12**: 342–48.
- [8] Pérez Molina, J., et al. Chagas disease. *Lancet*, 2018. **391**: 82–94.
- [9] Korolkovas, A., et al. Compendio esencial de química farmacéutica. *Ed Reverté*, 1983.
- [10] Bray, F., et al. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* **13**, 790-801.

- [11] Abuhamidah, A.; Sanchez, D. R.; Soverow, J.; Traina, M. I.; Hernandez, S.; Meymandi, S. K.; Olmedo, W.; Forsyth, C. J. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **2016**, 63, 1056-1062
- [12] Organization, W.H. Chagas disease (american tripanosomiasis). Updated March 2015. Fact sheet N°340.
- [13] de Macedo-Silva, S.T., W. de Souza, and J.C. Rodrigues, Sterol Biosynthesis Pathway as an Alternative for the Anti-Protozoan Parasite Chemotherapy. *Curr Med Chem*, 2015. 22(18): p. 2186-98.
- [14] Parks, L.W. and W.M. Casey, Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol*, 1995. 49: p. 95-116.
- [15] De Vas, M.G., et al., The NADPH-cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway. *Int J Parasitol*, 2011. 41(1): p. 99-108.
- [16] de Macedo-Silva, S.T., W. de Souza, and J.C. Rodrigues, Sterol Biosynthesis Pathway as an Alternative for the Anti-Protozoan Parasite Chemotherapy. *Curr Med Chem*, 2015. 22(18): p. 2186-98.
- [17] Meyer, H. and G.G. Holz, Jr., Biosynthesis of lipids by kinetoplastid flagellates. *J Biol Chem*, 1966. 241(21): p. 5000-7.
- [18] Chen, C.K., et al., Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. 4(4): p. e651.

- [19] Yu, X., et al., Dynamics of CYP51: implications for function and inhibitor design. *J Mol Recognit*, 2015. 28(2): p. 59-73.
- [20]. Peña-Díaz, J., et al., Mitochondrial Localization of the Mevalonate Pathway Enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase in the Trypanosomatidae. *Molecular Biology of the Cell*, 2004. 15(3): p. 1356-1363.
- [21]. Quiñones, W., et al., The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. *Experimental Parasitology*, 2004. 106(3–4): p. 135-149.
- [22]. Lepesheva, G.I., F. Villalta, and M.R. Waterman, Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). *Advances in parasitology*, 2011. 75: p. 65-87.
- [23]. Liendo, A., K. Lazardi, and J.A. Urbina, In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother*, 1998. 41(2): p. 197-205.
- [24]. Urbina, J.A., et al., Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(7): p. 1771-7.
- [25]. Liendo, A., et al., Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 1999. 104(1): p. 81-91.
- [26]. Doyle Patricia S., et al., A Nonazole CYP51 Inhibitor Cures Chagas' Disease in a Mouse Model of Acute Infection *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(6): p. 2480–2488.

- [27] de Souza, W. and J.C. Rodrigues, Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009. 2009: p. 642502.
- [28] Moraes, C.B., et al., Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*, 2014. 4: p. 4703.
- [29] Xu, J., et al., Design, synthesis and antifungal activities of novel 1,2,4-triazole derivatives. *Eur J Med Chem*, 2011. 46(7): p. 3142-8.
- [30] Lepesheva, G.I., et al., Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 2010. 285(33): p. 25582-90.
- [31] A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry Vol. I, II, III*, Ed. Elsevier Science Ltd., 1984, 1996, 2008.
- [32] G. Jones, D. R. Sliskovic, *Adv. Heterocyclic Chem.* 1983, 34, 79.
- [33] B. Abarca, G. Jones, *Adv. Heterocyclic Chem.* 2010, 100, 195.
- [34] Pinho, Eva, Grootveld, Martin, Soares, Graca; Henriques, Mariana. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 101, p. 121-135.
- [35] Mura, Paola. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, vol. 101, p. 238-250.

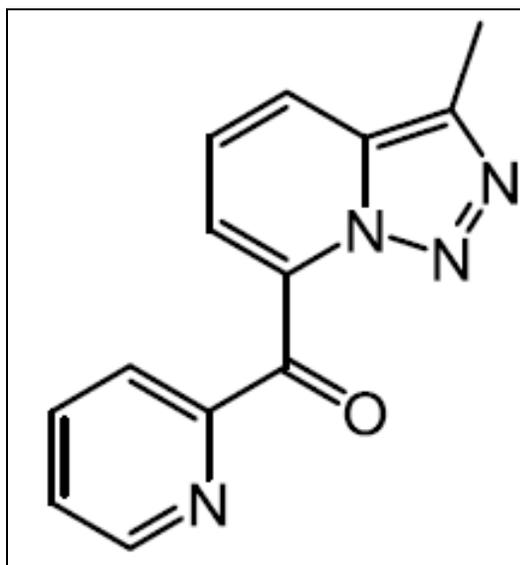
- [36]. Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), 665–681.
- [37]. Zhang, Jlanxiang; Ma, Peter X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, vol. 65, (9), p. 1215-1233.
- [38]. Kurkov, Sergey v.; Loftsson, Thorsteln. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, vol. 453, (1), p. 167-180.
- [39]. Folch-Cano, C., Jullian, C., Spelsky, H.; Olea-Azar, C. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. *Food Research International*, 2010, vol. 43, (8), p. 2039-2044.
- [40]. Mura, Paola. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, vol. 101, p. 238-250.
- [41]. Loftsson, T., Maasson, M., Brewster, M.E. (2003). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*93,1091–1099
- [42]. Crini, G. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114(21), 10940-10975.
- [43] Benesil, H. A.; Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 1949, vol. 71, (8), p. 2703-2707.

- [44] Ackermann, TH. K. A. Connors: Binding constants — the measurement of molecular complex stability, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore 1987. 411 Seiten, Preis: £ 64.15. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1987, vol. 91, (12), p. 1398-1398.
- [45] Acuña-Rouguier, C.;OLEA-AZAR, C. Thermodynamic and geometric study of diastereoisomeric complexes formed by racemic flavanones and three cyclodextrins through NMR. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2013, vol. 75, (1), p. 119-136.
- [46]. Lucas-Abellan, C., Fortea, I., Gabaldon, J. A.; Nunez-Delicado, E. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. J Agric Food Chem, 2008, vol. 56, (1), p. 255-259.
- [47] Yang, Chao, Liu, Lei, Mu, Ting-Wwi;Guo, Qing-Xiang. Improved Accuracy and Efficiency in the Determination of Association Constants with the Spectrophotometric Method. Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry, 2001, vol. 39, (1), p. 97-101.
- [48] Roy, Aditi, Saha, Subhadeep; Roy, Mahendra Nath. Study to explore host-guest inclusion complexes of cyclodextrins with biologically active molecules in aqueous 106 environment. Fluid Phase Equilibria, 2016, vol. 425, (1). p. 252-258.
- [49] Michel Lapier, Benjamín Aguilera-Venegas, María Carolina Zuñiga, Rosa Adam, Belén Abarca, Rafael Ballesteros, Rodrigo López-Muñoz. Juan Diego Maya and Claudio Olea-Azar. "Evaluation of the novel antichagasic activity of [1,2,3]Triazolo[1,5-a]pyridine derivatives" 2015.

APÉNDICE

Derivados [1,2,3] triazolo[1,5-a]piridinas (TPs), obtenidas en el laboratorio de la Dra. Belén Abarca, Valencia España.

(TP1) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 2-piridil metanona



1,07g 60%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (ddd, *J* = 4.7, 1.6, 0.9 Hz, 1H), 8.21 (dt, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.95 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.83 – 7.76 (m, 1H), 7.49 (ddd, *J* = 7.7, 4.8, 1.3 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 6.8, 1.3 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 5.4, 3.4 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H).

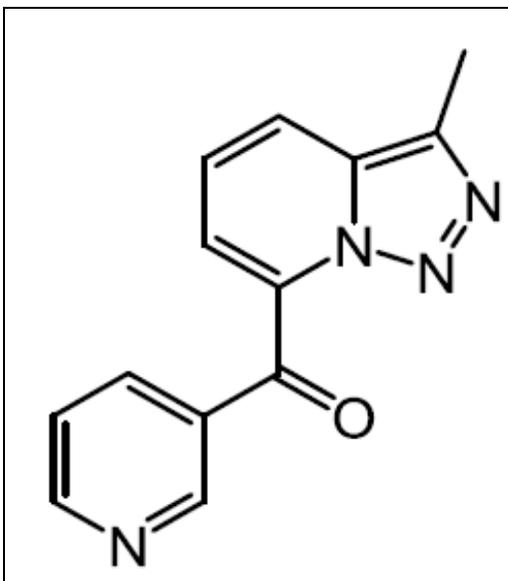
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.72, 153.59, 149.55, 137.71, 135.07, 134.87, 132.40, 127.96, 124.23, 123.37, 120.76, 118.81, 10.76.

IR 3050,7; 2925,8; 2853,7; 1682,3; 1574,1; 1310,4; 1277,1; 780,3; 752,5; 733,1; 691,4.

Pf 167-168°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 117.06, 128.05, 130.06, 140.05, 141.06, 142.06, 154.06, 155.06, 156.08, 166.06, 167.07, 168.07, 181.07, 182.08, 183.09, 184.06, 192.07, 193.07, 194.06, 209.07, 210.08, 211.08, 239.09

(TP2) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 3-piridil metanona



1,24g 69%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.85 (dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz, 1H), 8.75 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.10 – 7.97 (m, 1H), 7.83 – 7.71 (m, 1H), 7.36 (dtd, *J* = 5.9, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 7.28 – 7.13 (m, 2H), 2.59 (s, 3H).

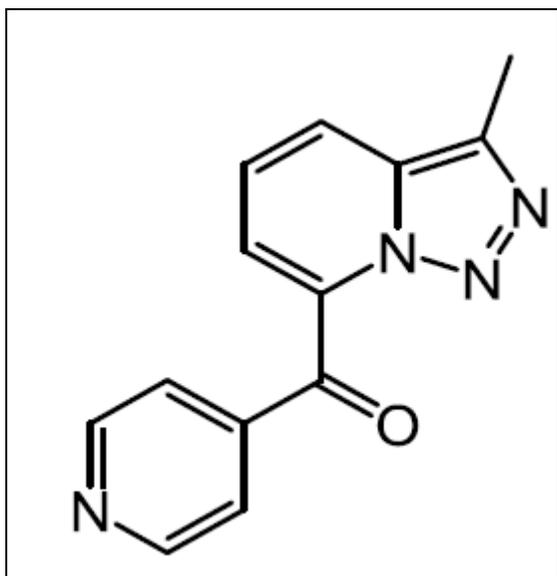
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 186.95, 154.30, 150.97, 137.02, 135.44, 133.44, 132.29, 131.67, 123.83, 123.51, 123.13, 121.16, 118.73, 77.58, 77.16, 76.74, 10.44.

IR 3017,4; 2923,1; 2848,1; 1657,4; 1571,3; 1410,3; 1304,1; 1282,7; 899,6; 744,2; 727,6; 697,0.

Pf 172,7-173,9°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 117.06, 128.05, 129.07, 130.06, 154.06, 155.06, 156.08, 166.06, 167.07, 168.07, 181.07, 182.08, 183.09, 184.06, 192.07, 193.07, 194.08, 196.06, 209.07, 210.08, 211.08, 239.09

(TP3) 3-metil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-7-il 4-piridil metanona



926mg 52%, precipitated with ethyl acetate/hexane.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (ddd, *J* = 11.5, 4.4, 1.6 Hz, 1H), 7.89 – 7.78 (m, 1H), 7.55 (dd, *J* = 4.4, 1.7 Hz, 1H), 7.29 – 7.24 (m, 1H), 2.64 (s, 1H).

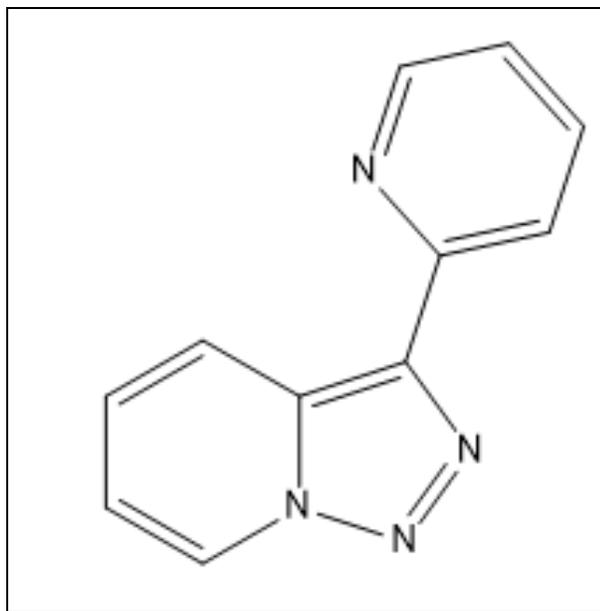
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.17, 151.47, 150.72, 142.81, 139.06, 135.99, 133.40, 132.69, 128.18, 125.23, 124.27, 123.28, 122.62, 121.91, 119.80, 10.05.

IR 3079,5; 3056,4; 3017,4; 1668,5; 1529,7; 1410,3; 1263,2; 1238,2; 1224,4; 1027,3; 838,6; 730,3; 669,2

Pf 196,3-196,7°C (ethyl acetate)

EM (I.E) m/z 104.05, 155.06, 156.08, 168.07, 181.07, 182.08, 183.09, 211.08

(TP4) 3-Piridil-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina



RMN 1H (300MHz) □(CDCl₃): 8.69 (m, 3H), 8.27 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.71 (dd, $J = 8.0, 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.28 (dd, $J = 9.0, 6.6\text{Hz}$, 1H), 7.13 (dd, $J = 7.5, 5.1\text{Hz}$, 1H), 6.96 (dd, $J = 7.3, 6.6\text{Hz}$, 1H).

RMN 13C (75MHz) □(CDCl₃): 155.1 (C), 151.9 (C), 149.2 (CH), 136.5 (CH), 131.9 (C), 126.3 (CH), 125.1 (CH), 121.9 (CH), 121.2 (CH), 120.3 (CH), 115.8 (CH).