

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA Y DE LOS
MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIPARASITARIA DE DOS
NUEVAS FAMILIAS DE NITROCOMPUESTOS: DERIVADOS DE
NITROFURANO Y NITROINDAZOL”.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Doctor en Química
Por:

MARÍA DE LOS ANGELES ARAVENA CASTRO

**Director de Tesis:
Dr. Claudio Alberto Olea Azar**

**SANTIAGO-CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APORBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que a Tesis presentada por la candidata:

MARÍA DE LOS ÁNGELES ARAVENA CASTRO

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.....de..... del 2016.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea A.

Comisión Informante:

Dra. Soledad Bollo (Presidenta)

Dra. María Soledad Ureta

Dr. Marcelo Campos

Dr. Gerald Zapata

“Dedicada con amor a mis hijos, esposo y familia”

“A la memoria de mis padres”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco amablemente a mi Director de Tesis Dr. Claudio Olea Azar y a los integrantes de mi comisión doctoral, Dra. Soledad Bollo, Dra. Ma. Soledad Ureta, Dr. Marcelo Campos y Dr. Gerald Zapata.

Del mismo modo agradezco al Dr. Juan Diego Maya del ICBM de la Universidad de Chile, a los Drs. Hugo Cerecetto y Mercedes Gonzáles del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de la República de Montevideo, al Dr. Vicente J. Arán del CSIC España, al Dr. Germán Barriga G. de la Universidad de Santiago de Chile y al Dr. Víctor Asencio de la Universidad Federico Sta. María.

Finalmente agradezco a la beca doctoral otorgada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnología (CONICYT) el año 2007.

RESUMEN

La presente tesis doctoral exhibe un estudio químico y biológico de dos familias de nitrocompuestos: derivados de Nitrofurano y derivados de Nitroindazol, con el propósito principal de obtener nuevos aspectos acerca de los mecanismos de acción tripanocida de estos potenciales nuevos fármacos, capaces de superar las limitancias que presentan las actuales drogas empleadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Nifurtimox, Benznidazol y otros fármacos empleados en contra el mal de Chagas y algunos tipos de cánceres son capaces de producir radicales libres, los cuales en presencia de oxígeno, generan a través de un ciclo redox, especies reactivas de oxígeno, las cuales son sustancias altamente reactivas. El exceso de radicales libres puede generar daño celular (estrés oxidativo), este daño ocurre sólo si la acción de estos radicales no es remediada por los mecanismos de defensa presentes en cada organismo, como son los antioxidantes. En el mismo orden de ideas, se utilizó la Resonancia de Espín Electrónico para obtener información directa de las especies radicalarias.

Además el uso de la técnica de spin trapping permitió evidenciar especies reactivas de oxígeno en medio biológico, durante la metabolización de los compuestos testeados.

Voltamperometría cíclica se empleó como una herramienta valiosa para evaluar el mecanismo de reducción de ambas familias, donde fue posible identificar un mecanismo de autoprototonación. Además resultó útil para la determinación parámetros de significancia biológica tales como el potencial E^l_7 y la constante de equilibrio K_{O_2} ($O_2/O_2^{\cdot-}$).

Por otra parte, también se realizó la exploración de los conformeros de mínima energía y de las propiedades electrónicas empleando cálculos teóricos, específicamente teoría de funcionales de la densidad (DFT). Estos indicaron que los derivados de nitrofurano neutros tendían a adoptar una conformación plana estabilizada, mientras que los radicalarios lo hacían a través del plegado de su cadena lateral respecto del anillo.

La familia de nitroindazoles también mostró que las conformaciones más estables dependían de la influencia de los sustituyentes. La correlación de las propiedades electrónicas con el potencial de pico catódico fue posible empleando el funcional híbrido B3LYP/6-31G*+(d,p).

Finalmente, los ensayos biológicos mostraron que los derivados de nitrofurano resultan ser activos contra *T. cruzi* cepa Dm28C, frente a sus formas morfológicas epimastigotes y tripomastigote, encontrando valores de IC₅₀ comparables y mejores a los reportados para las drogas parentales.

ABSTRACT

The present investigation show a chemical and biological study about two families of nitro compounds: Nitrofurane and Nitroindazole derivatives, whith the target to obtain the main characteristic about tripanocide action mechanism of its new potential drugs, able to overcome the limitation the current treatment of Chagas disease.

Nifirtimox, benznidazol and other drugs used against Chagas disease and some of the other types of cáncer disease are able to produce free radicals in which the presence of the oxygen, create through the redox cicle a reactive oxygen species (ROS) they are highly reactive substances. The excess of the free radical can produce a celular damage (oxidative stress) this damage occurs only if the action of these free radicals is not avoided by the action of antioxidant mechanism present in the organism.

In the same order we used the Electronic Spin Resonance to get direct information about the free radicals.

Besides the technique use of Spin Trapping allowed to show the ractive oxygen species of in a biological enviroment, during the methabolism of the testing compound.

We used a very important tool called Cyclic Voltametry in order to valued the reduction mechanism of these compund. It was posible to identify an autoprotection mechanism, besides CV was used to obtain parameters of biological significance. like potential E17 and K_{O_2} constant ($O_2/O_2^{\cdot-}$). In the other hand we also realized a conformational study and the electronic properties using theorical calculations, specifically Density Functional Theory (DFT).

This study indicates that the neutral nitrofurane derivatives adopt one plane stabilized conformation, meanwhile the nitro radical structures adopted the stabilised conformation through the plication of the lateral chains respect to the nitrofurane ring.

The Nitroindazoles family showed that stabilised conformation depends on the influence of the substituents. The correlation of the electronic properties with the cathodic peak potential was possible using the Hybrid functional B3LYP/6-31G⁺(d,p).

Finally the biological essays showed that the nitrofuranes derivatives are actives against *T. cruzi strain Dm28C*, obtained values of IC₅₀, better and comparables with the parental drugs

Capítulo I: INTRODUCCION

Introducción

En 1909 Carlos Chagas, un científico Brasileño, descubre un parásito flagelado que nombró *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual es el agente causante de la Tripanosomiasis Americana, que ahora conocemos como “enfermedad de Chagas” ó “mal de Chagas”. La enfermedad de Chagas afecta a 24 millones de personas, desde el Sur de California hasta la Patagonia de Argentina y Chile (1, 2). Esta enfermedad ha estado presente en el continente Americano por más de 9000 años, encontrándose en fragmentos de ADN del cinetoplasto presencia de *T. cruzi* en momias disecadas naturalmente que se ubicaron en la costa y valle de la zona norte de Chile y sur del Perú (3).

El más importante modo de transmisión de la enfermedad se asocia a las heces de variadas especies de triatominos que son estrictamente hematófagos. La transfusión de sangre también juega un rol en la transmisión de ésta patología, ya que las pruebas serológicas en bancos de sangre de las zonas donde la enfermedad es endémica entregan entre 10-50% de casos positivos, y de ese porcentaje alrededor del 10% de la sangre contiene parásitos infecciosos.

1.1 El ciclo de vida de *T. cruzi*

El complejo ciclo de vida del parásito se ilustra en la Figura 1. En ella se observa que necesariamente involucra a un hospedero mamífero y a un insecto vector (triatominos hematófagos). La transmisión a mamíferos, incluido el hombre, ocurre cuando las heces del triatomino que contiene la forma infectiva del parasito tienen contacto con la picadura, mucosa o conjuntiva del mamífero.

Luego de una multiplicación intracelular local del parásito, nuevas formas infectantes son liberadas desde la célula hospedera, la cual muere. Ahora estos parásitos son capaces de infectar otras células del organismo en lugares distantes de la primera infección. El ciclo se completa cuando un triatomino hematófago se alimenta de sangre que contiene formas infectantes del parásito.

Existen diversos modos de transmisión del parásito, entre las cuales destacan las: transfusiones de sangre, de la madre al feto (Chagas congénita), oral y la transmisión accidental de la infección que puede ocurrir en laboratorios de investigación, con una incidencia prácticamente nula (4).

Lo descrito anteriormente implica cambios morfológicos y fisiológicos en el parásito para poder adaptarse a las diferentes condiciones de los hospederos, ya sea en la célula, en la sangre del mamífero o el intestino del triatomino (5).

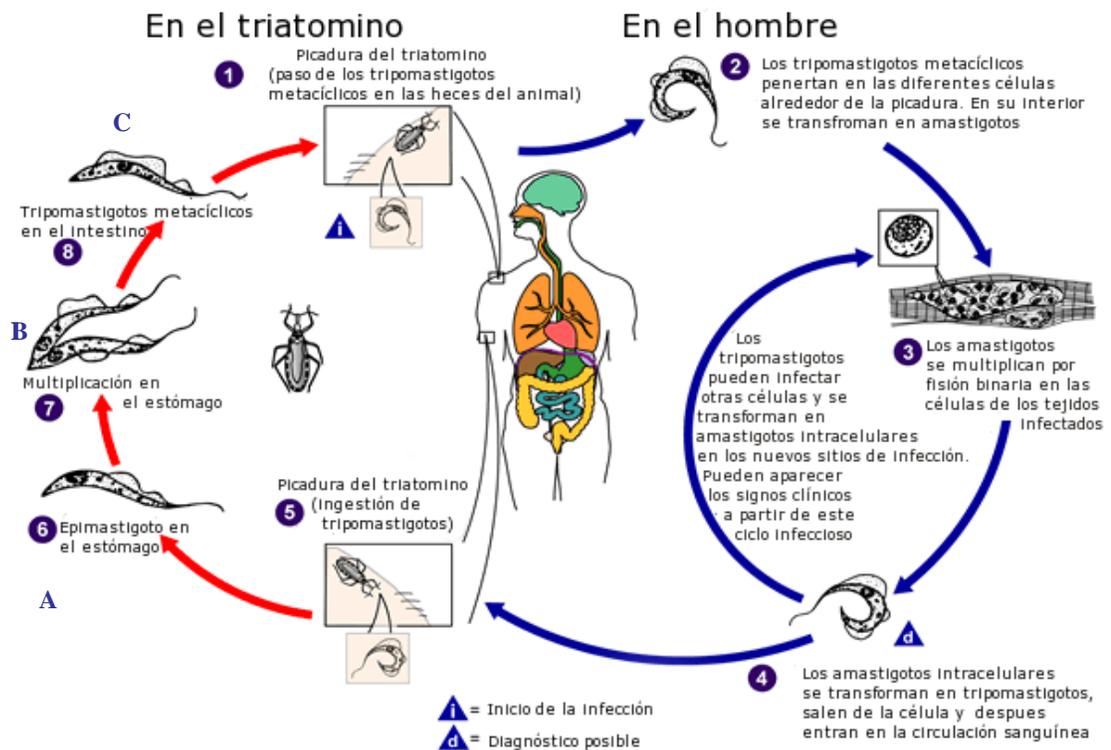
El ciclo biológico del parásito incluye tres formas fundamentales caracterizadas por la posición relativa del flagelo, cinetoplasto, y el núcleo (6):

1.1.1 Tripomastigotes: Mide 20 μ m de largo, fusiforme, cinetoplasto subterminal, que constituye la forma infectiva y se encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de los insectos triatominos. Esta forma no posee la capacidad de multiplicarse. En mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea (7).

1.1.2 Epimastigotes: También mide $20\mu\text{m}$ de largo, cinetoplasto anterior al núcleo, fusiforme. Estos representan la forma multiplicativa del parásito en el intestino del triatomino, y son la forma predominante en medio de cultivo. Por ésta razón es que son la forma más comúnmente usada en estudios bioquímicos (6).

1.1.3 Amastigotes: Mide aproximadamente $2\mu\text{m}$ de diámetro, redondeado, sin un flagelo emergente. Se multiplican a través de fisión binaria al interior de células nucleadas del hospedero mamífero, produciendo la ruptura de ésta y la posterior liberación de tripomastigotes dentro del torrente sanguíneo, que pueden volver a invadir cualquier célula nucleada. Estos pueden crecer en cultivos de células musculares, fibroblastos, macrófagos, entre otras (8, 9).

Figura 1: Ciclo biológico de *Trypanosoma Cruzi*



1.- El insecto vector portador de *T. cruzi*, luego de alimentarse de la sangre del mamífero, deyeecta liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces, los que atraviesan la dermis por el sitio de la picadura o por las mucosas. 2.- En el mamífero los tripomastigote invaden las células nucleadas, para luego diferenciarse en amastigotes. 3.- Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el interior de las células nucleadas hasta repletarla y salir de ella bajo la forma tripomastigota. 4.- Los tripomastigotes salen a la circulación sanguínea e infectan otros tejidos. 5.- El ciclo termina cuando un nuevo vector se alimenta de sangre que contiene tripomastigotes. **A**.- En el intestino del triatomino el tripomastigote se diferencia a epimastigote. **B**.- El epimastigote se multiplica por fisión binaria en el intestino medio del insecto vector. **C**.- En el intestino posterior del triatomino los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclico, los cuales son eliminados con las deyecciones de vector, al alimentarse con la sangre de un nuevo hospedero mamífero.

1.2 Epidemiología

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud pública en América Latina. Este ocupa el segundo lugar después de la malaria en prevalencia y mortalidad por vector asociado a enfermedad. Se considera que al menos 25 millones de personas se encuentran en riesgo de exposición a la infección, con un total estimado de 8 millones de casos infectados, donde Chile contribuye a éste número con 150.000 casos presumiblemente infectados (2). Además, según informes de la organización mundial de la salud, la tasa de mortalidad varía desde un 8% a un 12%, dependiendo del país estudiado, la edad, las condiciones de salud del paciente, y el tratamiento recibido. Este informe también señala que estudios recientes han demostrado aproximadamente 200.000 nuevos casos por año y 21.000 muertes al año asociadas a la enfermedad de Chagas (2).

En el presente, la enfermedad de Chagas, es controlada a través de la eliminación del insecto vector mediante el uso de insecticidas, una mejor vivienda y campañas de educación. El desarrollo de vacunas ha sido hasta ahora infructuoso. La quimioterapia de la enfermedad de Chagas es inadecuada, ya que el tratamiento de pacientes con las drogas más usadas, Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bnz), presenta serios efectos secundarios que van de leves a graves. Existen dudas acerca de estas drogas, respecto de su capacidad de lograr la cura parasitológica.

Cientos de “cepas” han sido aisladas desde diferentes países y zonas geográficas. Diferencias importantes en cuanto a resistencia y susceptibilidad a las drogas en uso, sobre cepas del parásito, se han encontrado en diversos estudios experimentales y clínicos. Esta

situación hace que el desarrollo de nuevas drogas antichagásicas sea un atractivo, pero difícil objetivo de estudio (10). Actualmente, la mayoría de las drogas antiparasitarias son consideradas como drogas huérfanas (orphan drugs: drogas diseñadas para el tratamiento o la prevención de enfermedades huérfanas/orphan disease: enfermedad que no ha sido adoptada por la industria farmacológica, ya que ésta proporciona bajos incentivos financieros al sector privado), con excepción de las drogas antimalaria. Consideraciones económicas de la industria farmacéutica, superan todo lo anterior, pues la rentabilidad es muy baja respecto de los costos de desarrollo.

Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas más económicas para abordar la enfermedad de Chagas, como el incremento en la actividad de las drogas antichagásicas actualmente usadas o por modificación de la respuesta inmunitaria del huésped, que haría que las terapias actuales sean más eficaces.

1.3 Tratamientos para la enfermedad de Chagas

1.3.1 Acercamientos clínicos

La droga actualmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Chagas es Nifurtimox (4[(5-nitrofurfurilidino) amino]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido), derivado de nitrofurano y Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida), un derivado nitroimidazólico (Figura 2).

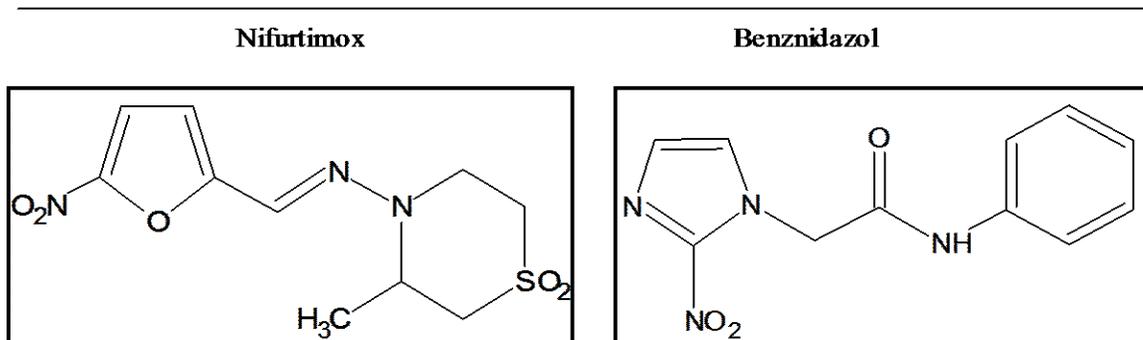
Nifurtimox ha sido el derivado 5-nitrofurfurilideno más activo experimentalmente ensayado (11). Benznidazol demostró una alta actividad tripanocida tanto en ensayos *in*

vitro, como en ensayos *in vivo* (12). La dosis recomendada de Nifurtimox en la fase aguda es de 8-10mg/Kg/día por 120 días en adultos y de 15mg/Kg/día en niños (13).

La duración media del tratamiento es de alrededor de 60 días, pero en casos de la reactivación de la enfermedad, como en pacientes inmunocomprometidos, la duración puede prolongarse hasta 5 meses o más. Sólo en el caso de infección accidental y presumible, a través de un vector, transfusión de sangre, o contaminación en laboratorio, la duración del tratamiento tiene un límite de 10-15 días. Nifurtimox y Benznidazol son tripanocidas sobre todas las formas del parásito (14). Sin embargo, ellos pueden causar toxicidad sistemática y efectos adversos que incluyen, anorexia, náusea, vómitos, dolor de cabeza, depresión del sistema nervioso central o síntomas maníacos, convulsiones, vértigo, polineuropatías, parestesia periférica y dermatitis (15). Además, hay reportes de mutagénesis y daño al ADN (16, 17). Sin embargo, una larga lista de pacientes tratados con estas drogas no han presentado los problemas descritos anteriormente (18), por lo tanto el riesgo es más bien teórico que clínico.

Un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad, y una causa del fracaso del tratamiento, es la diferencia de susceptibilidad entre cepas del parásito frente a estos medicamentos (19). Por otro lado, se ha reportado que el efecto terapéutico de estos dos fármacos varía en pacientes provenientes de distintas zonas geográficas. Situación que estaría dada probablemente a infecciones con distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* que presentan respuesta diferencial a estos fármacos (20).

Figura 2: Fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol



1.3.2 Mecanismos de acción

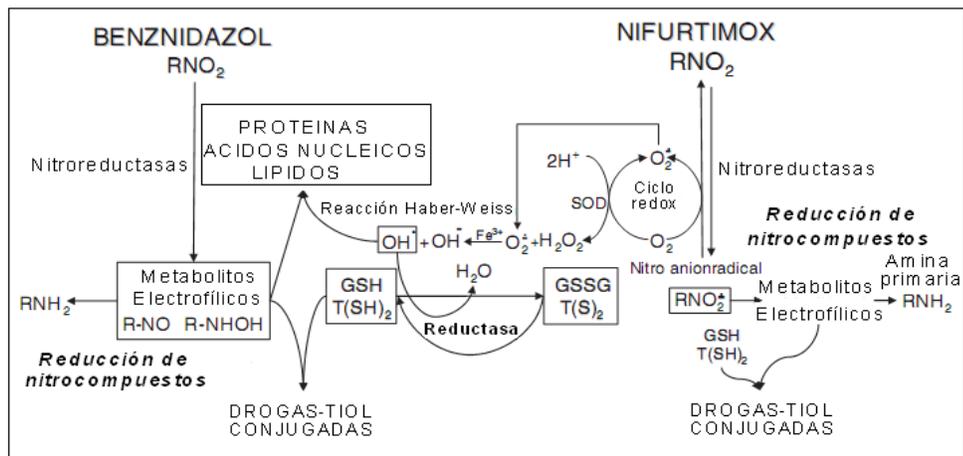
Nifurtimox

Nifurtimox es un profármaco que se ha utilizado por más de 40 años para tratar la enfermedad de Chagas y forma parte de una recientemente aprobada terapia combinada que dirige sus esfuerzos hacia el tratamiento de la tipanosomiasis del África Occidental. A pesar, de su amplia utilización su modo de acción no es comprendido totalmente. La detección de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno en extractos tratados con Nifurtimox conduce a la propuesta de que esta droga induce estrés oxidativo a nivel celular (21).

El mecanismo de acción más aceptado para Nifutimox y Benznidazol es que actúan a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos (Figura 3). El grupo nitro de ambas drogas es reducido a grupo amino mediante la acción de nitroreductasas, con la formación de numerosos radicales libres intermediarios y metabolitos electrofílicos.

Este proceso comienza con una reducción catalizada por NADPH-citocromo P-450 reductasa, que ataca al grupo nitro, moléculas de la forma R-NO₂, produciendo un intermediario nitro anión radical (RNO₂^{-•}) (21). Este radical se mezcla con oxígeno molecular, mediante un ciclo redox, donde la nitro radical se produce y se regenera la especie neutra. Como muestra la figura 3, el anión superóxido (O₂^{-•}) es catalizado mediante la superóxido dismutasa (SOD), a oxígeno molecular (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El anión superóxido y el peróxido de hidrogeno, en presencia de Fe⁺³, generan radical hidroxilo (OH[•]) (Reacción de Haber- Weiss). Estos radicales libres, especialmente OH[•], se unen a lípidos, proteínas, causando dañando al ADN (22).

Figura 3: Reducción de Nitrocompuestos y mecanismo de tioles



Cuando Nifurtimox es adicionado a células infectadas con *T. cruzi*, un espectro característico de Resonancia de Espín Electrónico correspondiente al nitro anión radical se observa (23, 24). Por otra parte, la concentración de Nifurtimox con la cual se inhibe el crecimiento del cultivo de epimastigotes es similar a lo requerido para la producción máxima de anión superóxido (10-20 μM), y para eliminar el peróxido de hidrógeno de la célula desde el comienzo (24, 25). Este y otros experimentos sugieren que la reacción intracelular de Nifurtimox, genera una especie nitro anión radical, seguido de un ciclo redox con O_2 , que produce O_2^- y H_2O_2 , como el mecanismo de acción de derivados de Nifurtimox sobre *T.cruzi*.

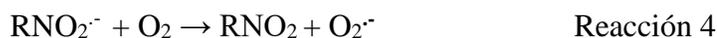
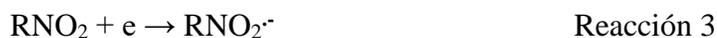
Al igual que la mayoría de los nitroheterociclos, para que Nifurtimox sea eficaz como profármaco debe someterse a la activación por nitro-reducción. Dos clases de enzimas pueden catalizar este proceso, nitroreductasas del tipo I y del tipo II (26). Las nitrorreductasas tipo I dependientes de NADPH son una proteína de unión comúnmente encontrada en bacterias (Flavina mononucleótido FMN), pero rara vez en eucariotas. Ellas median la reducción del grupo nitro a través de la transferencia de dos electrones para generar un intermediario nitroso (Reacción 1) que sufre rápidamente la reducción a su correspondiente derivado hidroxilamina (Reacción 2):



Por otra parte, tanto el compuesto nitrofurano como la hidroxilamina pueden reaccionar para generar la consecuente amina secundaria, que se cree que es inerte, o cationes nitronio, que se han reportado como iones que promueven la ruptura del ADN (27-29).

Alternativamente, la fragmentación del anillo nitrofurano también puede ocurrir, produciendo nitrilos de cadena abierta (26, 30, 31).

Debido a que la reducción de nitroreductasas tipo I no implica al oxígeno, y por tanto no da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno, se dice que esta actividad es “insensible al oxígeno”. En contraste a los descrito anteriormente las nitroreductasas tipo II contienen como cofactor nucleótidos de la flavina (FMN/FAD), y su actividad es “sensible al oxígeno”. Ellos catalizan la reducción monoelectrónica del sustrato, formando nitro anión radical (Reacción 3) (32). En la presencia de oxígeno, este radical entra ciclo redox, dando como resultado la producción de anión superóxido y la regeneración del nitro compuesto de partida (Reacción 4) (33).



El tratamiento con Nifurtimox puede tomar hasta cuatro meses y se asocian frecuentemente efectos secundarios desagradables. A pesar de estos problemas, el Nifurtimox, es parte de una terapia combinada de Nifurtimox-Eflonitina ahora recomendada en la etapa crónica o fase tardía de la enfermedad del sueño (34, 35) y también está sometido a evaluación como tratamiento de neuroblastoma infantil (36, 37).

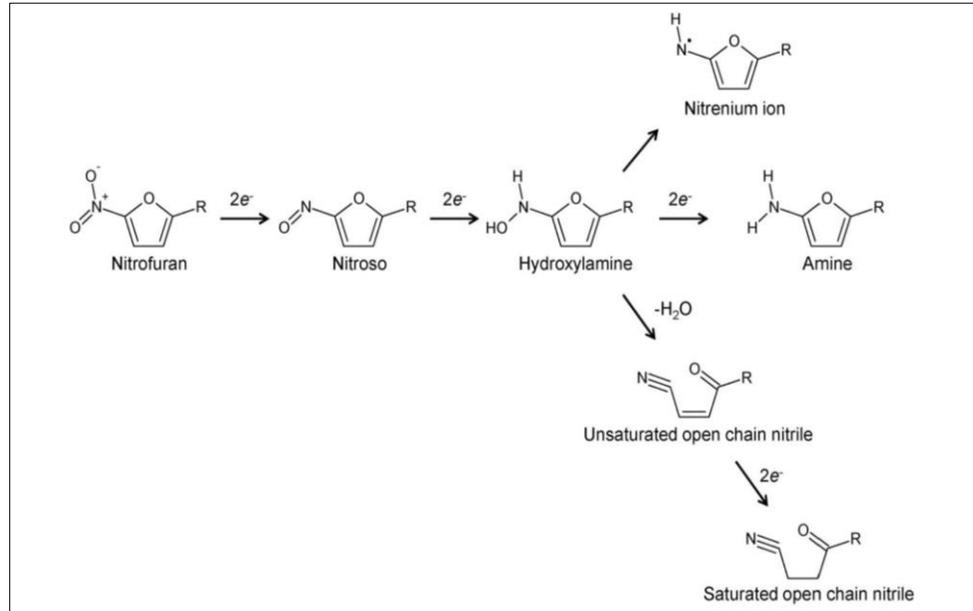
Recientemente un mecanismo de acción alternativo ha sido propuesto. Tras la identificación de dos enzimas tripanosomales capaces de catalizar la reducción de Nifurtimox mediante la transferencia de dos electrones (38-40).

Una de ellas es la prostaglandina F₂ alfa sintetasa, capaz de reducir a Nifurtimox *in vitro*. Enzimas nitrorreductas tipo I tripanosomal (NTR)², también fueron exhibidas en varios tipos de bacterias homólogas.

En ambos casos la actividad es insensible o independiente del oxígeno, pues como se mencionó la enzima contiene como cofactor FMN capaz de metabolizar una amplia gama de nitro compuestos y quinonas.

Belinada Hall y colaboradores (41) realizaron un estudio donde plantean como objetivo determinar el papel que juegan las NTRs tipo I en la actividad de Nifurtimox. Para ello utilizaron líneas celulares de *T. cruzi* y *T. brucei* con niveles alterados de nitrorreductasa tipo I, donde se observa una clara relación entre la actividad de la nitrorreductasa y la activación de Nifurtimox (38). Adicionalmente evaluaron la resistencia de *T. cruzi* al tratamiento con Nifurtimox. Allí se encontró que se había perdido una copia del cromosoma que contiene al gen TcNTR. Además informan que es posible detectar consumo de oxígeno durante la reducción de Nifurtimox. Así los autores proponen que las NTRs tipo I, enzimas independiente o insensible al oxígeno, pueden catalizar la reducción del nitrofurano a través de la transferencia de cuatro electrones, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Figura 4). Esta vía produce un nitrilo insaturado de cadena abierta que muestra citotoxicidad equivalente tanto en células parasitarias como mamíferas.

Figura 4: Reducción de nitrofuranos a través de nitroreductasas tipo I



Finalmente los autores plantean que los hallazgos encontrados demuestran que la toxicidad selectiva de Nifurtimox puede ser atribuible a la expresión de la nitrorreductasa tipo I en los tripanosomas, e indica que la actividad anti-parasitaria de este profármaco esta mediada por un mecanismo distinto al de inducción de estrés oxidativo. Así proponen que la actividad de nitrofuranos puede ocurrir por dos rutas. Una de ellas la reducción del compuesto a través de dos electrones, reacciones mediadas por nitrorreductasas tipo I, o bien una vía de un electrón, catalizada por nitrorreductasas tipo II.

Benznidazol

Se ha descrito que el efecto tripanocida de Benznidazol no sigue el mismo mecanismo de Nifurtimox. La generación de O_2^- y H_2O_2 a concentraciones que inhiben el crecimiento de epimastigotes no fue observada para estos derivados. Además, espectros REE registrados sobre *T. cruzi* muestran una señal débil correspondiente a nitro anión radical (24).

Estos resultados indicarían que el efecto tripanocida de Benznidazol no dependería de radicales del oxígeno como ocurre, por una parte, con Nifurtimox (21).

Parece probable que los metabolitos reducidos del Benznidazol, mediante unión covalente con macromoléculas están involucrados en sus efectos tóxicos y tripanocidas de este fármaco (22, 25, 42-44).

Esta hipótesis es apoyada por la observación de que la generación de radicales nitro provenientes del Benznidazol tiene un efecto importante sobre el proceso infectivo de los tripanosomas, mejorando la fagocitosis y aumentando la muerte del parásito (20, 45). Por otro lado se ha reportado que Benznidazol inhibe la NADH-fumarato reductasa en *T. cruzi* produciendo alteraciones en la cadena respiratoria del parásito (46).

Diversos análogos a imidazol y nitrofuranos han sido probados sobre *T. cruzi*, mostrando similar actividad sobre las formas epimastigotes y tripomastigotes. Megazol, un 5-nitroimidazol derivado, ha sido utilizado en la terapia de la infección de *T. brucei* (47), también exhiben actividad sobre *T. cruzi* (48), sin embargo, el uso de este derivado es bajo, pues reportes han mostrado que genera alteraciones en los cromosomas y daño al ADN con su uso (49,50).

1.3.3 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

En el apartado anterior hemos descrito la presencia de los radicales libres de oxígeno en numerosos procesos metabólicos relevantes. Estas especies se observan como las principales responsables de la toxicidad del oxígeno en los seres vivos, participando en distintas enfermedades infecciosas y en numerosas situaciones de estrés.

Se conoce como radicales libres a las entidades moleculares (átomos, moléculas o iones) que poseen un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química, que contraria a la normal tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas es desapareado. Esto los hace, muy inestables, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (51). Dependiendo de en qué orbital se encuentra más estable el electrón desapareado, es que se describe a los radicales como centrados en oxígeno, nitrógeno, carbono, etc.

Comúnmente, conocemos la forma más estable del oxígeno (O_2), con los electrones formando un enlace pi antienlazante (π^*) con el mismo espín, es decir, es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo, característica que impide que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones en que interviene. El oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalente aceptando los electrones de uno en uno.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, según la reacción global siguiente:



La mayoría de los organismos anaeróbicos, como los mamíferos por ejemplo, sobreviven a la acción de las especies reactivas generadas a partir del oxígeno gracias a que poseen un sistema de protección compuesto principalmente por antioxidantes y enzimas que metabolizan estas especies reactivas, apagándolas y generando a su vez otras especies más estables.

A pesar de que el oxígeno se encuentre en estado triplete y posea una baja reactividad y velocidad de reacción a temperatura y pH fisiológico, éste puede producir una serie de especies químicas prooxidantes denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales pueden ser generadas a través de reacciones puramente químicas, enzimáticas o aquellas que involucren radiaciones ionizantes.

1.4 Estrés oxidativo

En el sistema biológico, los radicales libres y otras ERO, son elaborados continuamente como producto del metabolismo normal de cada célula. La generación de éstos constituye un evento fisiológico, mediante el cual desempeñan funciones biológicas fundamentales.

Sin embargo, cuando la producción excesiva de radicales libres es mayor a la velocidad en que estos son removidos nos encontramos en condiciones de estrés oxidativo, el cual puede conducir a diversas formas de daño celular, al reaccionar con diversas macromoléculas biológicas como proteínas, membranas lipídicas o ADN.

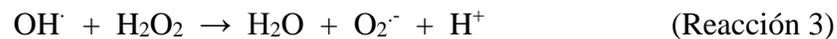
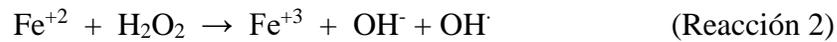
Lo mencionado anteriormente describe, que si bien el oxígeno es fundamental en el metabolismo celular de organismos aeróbicos, puede generar, en ciertas condiciones, efectos tóxicos (52).

Es conocido que del 100% del O_2 que consumen los organismos aeróbicos el 95% del O_2 es utilizado en la cadena respiratoria mitocondrial, mecanismo que realiza el transporte de electrones desde un sustrato orgánico hasta un aceptor de electrones, en este caso el O_2 , el cual se reduce como producto final a agua (H_2O).

El 5% restante sigue una serie de reducciones monoelectrónicas que conducen a la formación de ERO, constituidas por especies intermediarias radicalarias y neutras.

Como se describió en el mecanismo de Nifurtimox y Beznidazol, al aceptar un electrón, proveniente de un agente reductor, el oxígeno molecular genera como producto primario un radical libre con carga negativa, llamado anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esta molécula al adicionar otro electrón forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula que no corresponde a un radical libre, a pesar de esto es considerablemente reactiva, pues se descompone fácilmente y al ganar otro electrón genera el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), una de los radicales libres más reactivos que existen. Su formación a partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 sucede a través de las reacciones de Fenton (Reacción 2) y Haber Wais (Reacción 3 y 4), las cuales emplean como catalizador trazas de metales de transición como el hierro.

Sin embargo, otros metales también pueden participar en estas reacciones de transferencia electrónica, regenerándose al igual que un catalizador. Finalmente la incorporación de un cuarto electrón genera la molécula de agua.



Otra especie reactiva de oxígeno es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Esta estructura, a diferencia del O_2 molecular, posee sus dos electrones desapareados, con espines opuestos, condición que incrementa su energía alrededor de 1eV, característica que le confiere la capacidad de oxidar diversas moléculas biológicas (53).

Antecedentes indican que las ERO están implicadas en el desarrollo de diversas patologías clínicas, como arteriosclerosis, cáncer, cataratas y cuadros inflamatorios (54-56), además de intervenir como mediadores en una serie de eventos de naturaleza fisiológica.

Si bien, diversos factores se inmiscuyen en los daños que pueden causar las ERO, el más determinante en que las ERO tengan o no un carácter deletéreo está dado por el balance entre la velocidad a la cual estas especies son generadas y aquellas a las cuales son removidas por los diversos mecanismos antioxidantes.

De no ser adecuadamente neutralizados los radicales libres pueden causar daño celular a través de tres diferentes mecanismos:

- 1.4.1 Peroxidación Lipídica: Los enlaces dobles de la membrana poliinsaturada son vulnerables al ataque de radicales centrados en oxígeno generando una cadena radicalaria que conduce a una disminución de la fluidez de la membrana.
- 1.4.2 Fragmentación de ADN: Los radicales libres reaccionan con el ADN, oxidando la fracción azúcar-fosfato y en las bases nitrogenadas, produciendo así ruptura en las hebras, intercambio de cromátidas hermanas y entrecruzamiento de ADN y proteínas.
- 1.4.3 Enlaces entrecruzados en proteínas: Los radicales libres promueven el cruce de enlaces en proteínas con grupos tiol, traduciéndose en un aumento de la degradación de la proteína o en la pérdida de su actividad.

1.5 Mecanismo de tiores y defensa contra radicales libres

Las células de mamíferos poseen mecanismos de defensa anti-radicalarios enzimáticos y no enzimáticos (57). Entre los mecanismos enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa, la Glutatión peroxidasa y la Glutatión-S-transferasa. Los mecanismos no enzimáticos incluyen el uso de compuestos reductores como el α -tocoferol, ascorbato, β -caroteno y Glutatión reducido (GSH).

Por el contrario, en el parásito los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo son defectuosos (58, 59). No se ha detectado actividad catalasa o glutatión peroxidada en *T. cruzi* (59, 60), y la actividad superóxido dismutasa es mucho menor (59).

Además no se ha publicado evidencia de la existencia de β -caroteno o α -tocoferol en el parásito.

Cabe señalar además, que se ha descrito la presencia de actividad de las enzimas ascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa en epimastigotes y tripomastigotes, lo cual sugiere la presencia de un ciclo redox del ácido ascórbico, semejante al de las células de mamíferos (61, 62).

Dado que los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) del *T. cruzi* son deficientes respecto a las células del mamífero, sus principales mecanismos de defensa contra radicales libres serían el Glutati6n reducido y un conjugado de Glutati6n y espermidina denominado Tripanoti6n.

Este compuesto es característico de todos los tripanosomátidos e indispensable para la reducci6n del glutati6n (63, 59).

El Glutati6n (γ L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina (GSH)) (Figura 5) es el tiol, de bajo peso molecular, mäs abundante en las células mamíferas. Se le ha encontrado en casi todos los seres vivos (64) en concentraciones que bordean los 0,5 y 10 mM, dependiendo de la especie, 6rgano u organelo estudiado.

El Glutati6n tiene como funci6n, entre otras, la protecci6n de los efectos t6xicos producidos por ciertos compuestos altamente electrofílicos como son ciertos xenobi6tico, metabolitos de xenobi6ticos y contra los radicales libres (64).

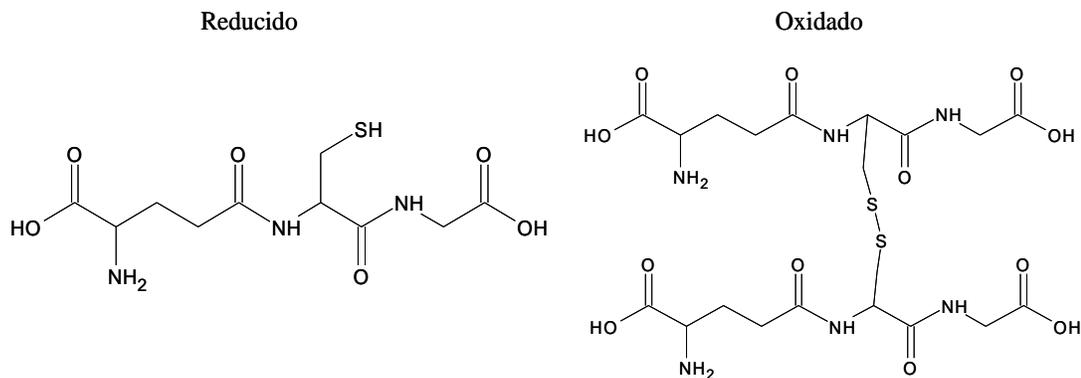
Este tripéptido (ver figura 5) juega un rol fundamental en la destoxificaci6n de metales pesados, herbicidas e insecticidas (65, 66).

Actúa también como sustrato para reacciones catalizadas por Glutati6n-S-transferasa, enzimas que conjugan Glutati6n con una variedad de xenobi6tico de carácter lipofílico-electrofílico (67, 68).

Además, este juega un rol importante en la protección del ADN (69), y en la protección de la membrana lipídica contra el daño producido por radicales libres (70, 71).

En mamíferos, Glutación oxidado (GSSG) es reducido mediante Glutación reductasa, la enzima responsable por el mantenimiento de una alta relación GSH:GSSG. En efecto, esta enzima puede catalizar la reducción de bisulfitos mixtos entre Glutación y otros compuestos, como por ejemplo, Glutación y γ -glutamil cisteína o entre Glutación y coenzima A (72, 73).

Figura 5: Glutación



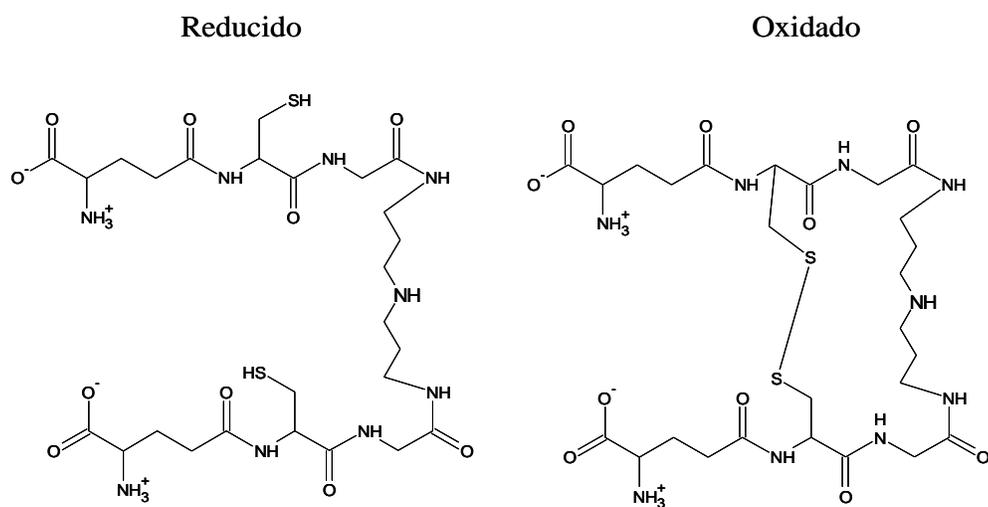
A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en *T. cruzi* la reducción de Glutación oxidado se efectúa por intermedio de Tripanotión. Además no se ha encontrado la enzima Glutación reductasa (74).

El Tripanotión (N1, N8-bis(glutationil) espermidina, $(T(SH)_2)$, (Figura 6) es un tiol de bajo peso molecular sintetizado mediante la conjugación de dos moléculas de Glutación reducido y espermidina, en una reacción característica de los tripanosomátidos, dependiente de ATP. Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la Glutationil-espermidina sintetaza y la Tripanotión sintetaza (74-76).

Tripanotión requiere dos electrones para ser reducido y a pH fisiológico posee carga +1. Su potencial redox ($T(SH)_2/T(S)_2$) es de $-0,24V$, siendo un poco más electronegativo que Glutación ($-0,23 V$), característica que le entrega un gran poder reductor (75).

Tripanotión reducido ($T(SH)_2$) es la molécula que en tripanosomátidos reduce Glutación oxidado, y también cumple un rol equivalente a la del Glutación en los mamíferos, esto permite decir que actúa como un protector intracelular frente a agentes oxidantes endógenos y exógenos (77). Otras funciones de Tripanotión incluyen la mantención de la homeostasis de ascorbato (78), la reducción de hidroperóxidos (79, 61), la síntesis de desoxirribonucleótidos (80), y conjugación de drogas con metales (42). Actuando como agente reductor de la misma forma que el Glutación.

Figura 6: Tripanotión

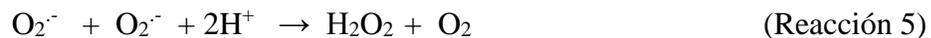


En resumen, el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo en *T. cruzi* es deficiente comparado con el de los mamíferos. *T. cruzi* presenta sólo una baja actividad de superóxido dismutasa, falta de Glutatión peroxidasa y catalasa, y ausencia de α -tocoferol y β -caroteno (81), por lo tanto la defensa contra el estrés oxidativo esta medida por Glutatión y Tripanotión, siendo éste último compuesto exclusivo de tripanosomátidos.

1.6 Mecanismos antioxidantes

La mayoría de los organismos aeróbicos tienen la capacidad de neutralizar a las ERO generadas y prevenir y/o contrarrestar la generación de estrés oxidativo, romper la cadena de propagación oxidativa y reparar el daño oxidativo celular. Son diversos los mecanismos por los que se pueden apagar o neutralizar los diferentes radicales libres, entre ellos destacan:

1.6.1) Decaimiento espontáneo



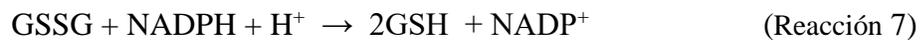
1.6.2) Acción de la enzima Superóxido dismutasa

SOD



1.6.3) Acción de Glutación mediada Glutación reductasa-Glutación peroxidasa

GR



GPx



1.6.4) Acción de enzima Catalasa

Cat



1.6.5) Antioxidantes endógenos y exógenos

Vitamina A, C, E, β -caroteno entre otros.

1.7 Mecanismo Redox de Nitrocompuestos

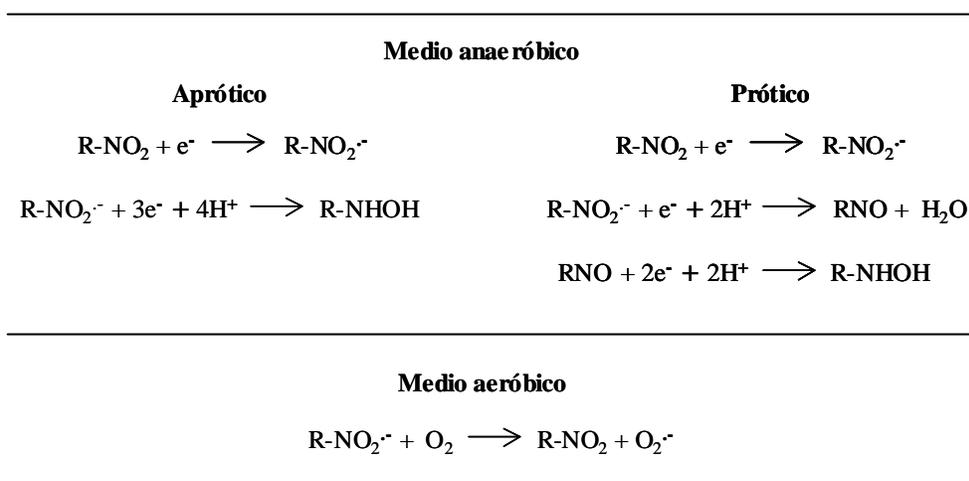
Los nitrocompuestos son moléculas provistas del grupo nitro en su estructura, el cual tiene la capacidad de reducirse y generar una variedad de intermediarios, dependiendo del medio en el que ocurre la reducción y si está o no presente el oxígeno (esquema 1).

En medio aprótico y en ausencia de oxígeno, el comportamiento electroquímico de estos derivados exhibe una sola cupla reversible, donde el pico catódico corresponde a la reducción del nitro compuesto a nitro anión radical ($\text{R-NO}_2/\text{RNO}_2^{\cdot-}$), y su contraparte anódica a la oxidación del nitro anión radical a hidroxilamina ($\text{RNO}_2^{\cdot-}/\text{RNHOH}$) (82).

En medio prótico el comportamiento electroquímico de estos derivados es diferente al descrito previamente. Aquí se genera, por una parte la hidroxilamina (RNHOH) a través de la formación del radical nitro anión ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$), en dos etapas en lugar de una, además de la incorporación de otro paso que lleva a la formación de la amina (RNH_2) desde la hidroxilamina (RNHOH).

En condiciones aeróbicas, el nitro anión radical ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) formado puede ser re-oxidado formando, de esta manera, el compuesto nitro original, y la producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), por medio del ciclo generador de ERO mencionado previamente (83). La generación del radical aniónico $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ siguiendo el mecanismo aeróbico representado en el esquema 1, se observa cuando Nifurtimox es agregado a microsomas de *T. cruzi*. Obteniéndose una señal caracterizada por espectroscopía de Resonancia Espín Electrónico (REE) así como su interacción con oxígeno generadora de ERO (84, 85).

Esquema 1: Mecanismo general de reducción de nitrocompuestos



En definitiva, la reducción del grupo nitro juega un rol crucial en el mecanismo de acción biológico de los nitro compuestos y consecuentemente el conocimiento de su comportamiento REDOX es de trascendental importancia debido a que su química radicalaria es determinante para su uso en medicina.

Las propiedades prototópicas y los tiempos de vida media de los aniones radicales nitro han sido estudiados principalmente usando técnicas como la resonancia de Spin Electrónico y la Radiólisis de Pulso (86, 87, 88), sin embargo, técnicas electroquímicas como la Voltamperometría Cíclica han demostrado jugar un rol ventajoso en el estudio de estos radicales (89, 90, 91). La versatilidad de la técnica de Voltamperometría Cíclica permite estudiar la factibilidad de formación del anión radical nitro (89) así como su comportamiento prototrópico (92), sus tiempos de vida media naturales (93, 94) y su reactividad con otras moléculas (95, 96).

1.8 Radicales libres contra enfermedades parasitarias

Las enfermedades parasitarias en áreas tropicales y subtropicales constituyen un problema sanitario y económico, relacionándolas directamente con un nivel socioeconómico bajo. En las últimas décadas numerosas investigaciones acerca de radicales libres útiles para combatir enfermedades parasitarias han sido desarrolladas, permitiendo una mayor comprensión de cómo actúan ciertas drogas en diversos sistemas biológicos. Se conoce que las drogas usadas en el tratamiento de estas enfermedades actúan mediante una variedad de mecanismos, sin embargo, las familias más estudiadas y las que han entregado una mejor actividad antiparasitaria son aquellas que involucran la generación de radicales libres en su mecanismo de acción (97, 24).

Existe una gran variedad de compuestos con la capacidad para generar radicales libres. Estos deben contar en su estructura moléculas con un grupo electroquímicamente activo, que pueda reducirse u oxidarse a través de un mecanismo monoelectrónico, además deben

ser fácilmente generables, es decir su potencial de reducción u oxidación debe ser menores o del orden de los potenciales de enzimas reductoras. A éstas se les adjudica la labor de generar los radicales libres (84).

Numerosos compuestos pertenecientes a familias de nitroderivados y N-óxidos, entre otros, cumplen con las características mencionadas recientemente siendo capaces de generar radicales libres y promover estrés oxidativo a nivel celular, a través de la formación de ERO, ya sea en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (98).

1.9 Nitrocompuestos y *T.cruzi*

Los Nitrocompuestos constituyen un grupo de fármacos con la más amplia aplicación clínica. Siendo empleados en el tratamiento de infecciones anaeróbicas, algunos tipos de cáncer y también utilizados como radio sensibilizadores (99).

Los Nitroimidazoles y los Nitrofuranos son dos grupos de quimioterápicos de origen sintético que tienen efecto antibacteriano y/o antiparasitario por degradación del ADN. Ambos grupos tienen cierta similitud estructural y en ambos la reducción del grupo nitro (-NO₂) parece ser necesaria para que se produzca el efecto bactericida o parasiticida. Las drogas de ambos grupos pueden clasificarse tomando en cuenta simultáneamente su estructura química y el grupo terapéutico al que pertenecen (ver Tabla 1):

Tabla 1: Grupo terapéutico según estructura química

Nitroimidazoles		Nitrofuranos	
Antibacterianos,	Metronidazol	Antibacterianos	Nitrofurantoina
Amebicidas, Giardicidas y Triconomicodas.	Omidazol, Trnidazol y otros		Nitrofurazona
			Furazolidona
Antichagásicos	Benznidazol	Antichagásicos	Nifurtimox

Tanto Nifurtimox como Benznidazol son drogas clasificadas como nitrocompuestos, el primero derivado de nitrofurano mientras que Benznidazol un nitroimidazol derivado.

Como se describió previamente en el punto 1.3.2, tanto Benznidazol como Nifurtimox son ampliamente utilizados en la quimioterapia para el tratamiento del Mal de Chagas, sin embargo han mostrado resultados insatisfactorios.

Así, se han desarrollado numerosas nuevas drogas eficientes y activas contra *T. cruzi* y otras enfermedades parasitarias, las cuales poseen diversos modos de acción, que dependen estrechamente de su estructura química y del blanco terapéutico que se desee estudiar o abordar.

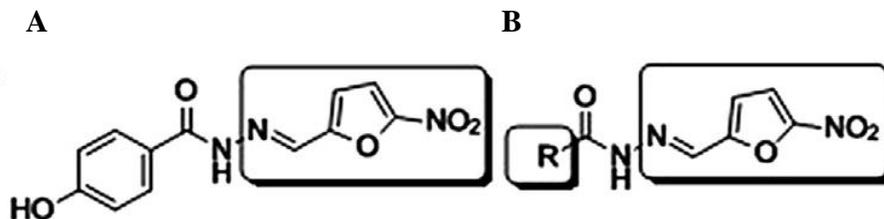
A continuación se exhibe una amplia revisión bibliográfica de algunos estudios existentes acerca de derivados análogos a nitrofuranos y nitroindazoles como potenciales agentes antiparasitarios.

Nitrofuranos

F. Palance-Bert y colaboradores (2015) realizaron la síntesis racional siguiendo las reglas de Lipinski de un conjunto de veintiún compuestos derivados de Nifuroxazida (NF) (ver figura 7), un fármaco análogo a Nifurtimox. Los autores evaluaron la actividad de un conjunto de N'-[(5-nitrofurano-2-il) metileno] hidrazida sustituidas (Figura 7) contra tres diferentes cepas de *T. cruzi*, que representaban unidades discretas de tipificación más prevalentes en pacientes humanos: Y (TCII), Silvio X10 CL1 (TCI), y Bug 2149 CL10 (TCV). El objetivo planteado en este estudio se centró en encontrar un profármaco capaz de mejorar la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*. El estudio de actividad mostró que todos los derivados estudiados, excepto uno, mostraron actividad tripanocida mejorada contra las tres cepas en comparación a Benznidazol, mientras que para la cepa Y, el 62% de los compuestos mostró ser más activo que Nifurtimox. El compuesto más activo fue el N'-((5-nitrofurano-2-il) metileno) bifenil-4-carbohidrazida (C20), el cual mostró valores de IC₅₀ de 1.17 ± 0.12 mM; 3.17 ± 0.32 mM; y 1,81 ± 0.18 mM para las cepas Y, Silvio X10 CL1 y Bug 2149 CL10, respectivamente (100). En adición a los estudios de actividad tripanocida los autores realizaron los ensayos de citotoxicidad en células de fibroblastos humanos, donde se observaron altos índices de selectividad (SI=IC₅₀ línea celular/IC₅₀ *T. cruzi*) para varios compuestos tales como C12, C15, C19, C20 entre otros.

Finalmente los autores informaron, desde un estudio exploratorio, que el análisis topológico estérico/geométrico y las propiedades electrónicas contribuyen como parámetros a considerar en el diseño, y, posterior síntesis de nuevos fármacos prometedores contra la enfermedad de Chagas.

Figura 7: Nifuroxazida (A) y Estructura base de los 21 derivados estudiados



Ch. Bot y colaboradores (2013) estudiaron cuatro familias de 5-nitrofuranos (un total de 15 compuestos), los cuales al combinarse con eflornitina (conocido antiparasitario), pudiesen provocar efectos positivos sobre el tratamiento de *trypanosoma brucei*, agente causante de la tripanosomiasis africana humana. El estudio se basó en el modo de acción que pudiesen presentar estos profármacos (derivados 5-nitrofuranos), en el cual estaría implicada una reacción de activación inicial catalizada por una nitroreductasa tipo I (NTR), enzima que se encuentra predominantemente en procariontas, la cual conduce a la formación de un metabolito citotóxico, un nitrilo insaturado de cadena abierta.

Como un paso preliminar en la identificación de compuestos nitroaromáticos que pudiesen asociarse con eflornitina aumentando su actividad se procedió a evaluar la actividad enzimática. Esta actividad se midió a través de un barrido bioquímico sobre la enzima purificada, siguiendo los cambios en la absorbancia a 400 nm (longitud de onda correspondiente a la reducción de nitrofuranos). El estudio reveló que todos los 5-nitrofuranos eran sustratos eficaces sobre la enzima nitroreductasa presente en *T. brucei* (TbNTR).

Los valores de K_{cat}/K_m obtenidos a partir del estudio de cinética de catálisis enzimática, mostraron magnitudes elevadas, para algunos de los 5-nitrofuranos, de hasta 50 veces mayor al encontrado para Nifurtimox.

En la mayoría de los derivados de 5-nitrofurano, la reducción *in vitro* producida por nitroreductasas generó productos que fueron caracterizados por espectroscopía de masas. Dentro de los productos obtenidos se pudieron identificar tanto nitrilos saturados como insaturados de cadena abierta.

Los autores también evaluaron la actividad tripanocida de los derivados 5-nitrofurano contra *T. brucei* forma sanguínea (estado morfológico en que vive y se reproduce el parásito). El estudio informó que la mayoría de los derivados presentan propiedades significativas de inhibición del crecimiento, donde los compuestos más potentes muestran concentraciones inhibitorias del 50% de crecimiento (IC_{50}) cercanas a 200 nM (101).

De los resultados obtenidos los autores también informaron que la actividad antiparasitaria de los agentes más potentes demostró ser dependiente de NTR, donde parásitos con bajos niveles de la enzima muestran resistencia a los compuestos, mientras que los parásitos que sobre expresan la TbNTR mostraron hipersensibilidad a dichos derivados. Finalmente concluyen que otros compuestos de la clase 5-nitrofurano (nitroheterociclos) tienen el potencial para tratar la tripanosomiasis africana humana, tal vez como un profármaco socio alternativo a Nifurtimox, o bien, como compuestos que en un futuro pudiese ser usados como terapia combinada con eflornitina.

R. Arancibia y colaboradores (2013) propusieron una nueva serie de compuestos imino ferrocenos y ciretrens derivados de 5-nitrofurano y 5-nitrotiofeno, denominados por los autores, como los primeros híbridos orgánicos-organometálicos que contienen al grupo 5-nitro heterociclo como una herramienta terapéutica para el tratamiento de la tripanosomiasis americana. El objetivo de los autores fue reunir conocimientos sobre estos nuevos complejos órgano-metálicos que contienen grupos anti-parasitarios, reportando la síntesis, caracterización (incluyendo la cristalografía de rayos X) y evaluación biológica de estos nuevos híbridos órgano-metálicos basados en fragmento de 5-nitrotiofeno y 5-nitrofurano. También realizaron un completo estudio de Voltamperometría Cíclica (VC) y Resonancia de Espín Electrónico (REE) de estos nuevos derivados.

En un trabajo previo los autores reportaron la síntesis de la familia de nitro derivados los cuales son caracterizados en el presente estudio (102).

Todos los nitro compuestos fueron racionalmente diseñados usando como columna vertebral la estructura de Nifurtimox. Esta estructura base permitió diferentes sustituciones en el resto imino de los heterociclos 5-nitrofuranos (NF) y 5-nitrotiofeno (NT), tales como fragmentos organometálicos provistos de grupos dadores y aceptores de electrones.

En solución, los compuestos sintetizados pueden adoptar dos diferentes formas (E- o Z), sin embargo los espectros de ^1H y ^{13}C NMR fueron consistentes con la presencia de un solo isómero de la forma (E- ó anti). Este hecho fue confirmado por cristalografía de rayos x.

El estudio de VC realizado a los nitro derivados mostró un comportamiento electroquímico similar para todos los compuestos. Los voltamogramas exhibieron dos señales bien definidas. De acuerdo a los criterios de reversibilidad estándar, la primera una cupla (anódica/catódica), correspondió a un proceso de transferencia monoelectrónico reversible controlado por difusión, asignable a reducción de Ar-NO₂ a Ar-NO₂⁻. El segundo, un pico catódico irreversible, se atribuyó a la producción del derivado hidroxilamina.

Además los autores correlacionaron los valores de potencial de onda media ($E_{1/2}$), con las características electrotrónicas de los sustituyentes, donde se observó que mientras más electro-aceptor es el grupo sustituyente menor es $E_{1/2}$. También fue posible establecer que el $E_{1/2}$ de los compuestos con ferroceno ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)$) fueron mayores a los registrados para los derivados con ciretreno ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{Re}(\text{CO})_3$), con ciertas excepciones atribuibles a su estructura.

El estudio de REE mostró dos patrones hiperfinos para todos los derivados, los cuales eran independientes del sustituyente en el grupo imino. Sin embargo, la naturaleza del heteroátomo en el anillo afectó los patrones de acoplamiento hiperfino.

Finalmente los autores reportaron el estudio de actividad tripanocida en epimastigotes y tripomastigotes, donde observaron que los compuestos que tienen unido al nitrógeno del grupo del grupo imino un ciretreno (NT2 y NF2) son compuestos más activos que sus homólogos enlazados a ferroceno (NT1 y NF1), con valores comparables a Nifurtimox.

Los resultados del estudio antiparasitario *in vitro* frente a las cepas de *T. cruzi* confirmaron que existe una relación entre los efectos electrónicos de los sustituyentes y la actividad tripanocida (103).

A. Merlino y colaboradores (2011) realizaron una caracterización comparativa de dieciséis complejos de Platino (II) y Paladio (II) (M=Pt/Pd) contenidos en 5-nitrofuriltiosemicarbazonas, compuestos de fórmula general $[MCl_2L]$ (L=5-nitrofuriltiosemicarbazona), empleando teoría de funcionales de la densidad y análisis de componentes principales (DFT/ACP). En este estudio se utilizaron múltiples técnicas para clasificar y buscar los patrones más acertados para relacionar la actividad biológica con ciertos descriptores fisicoquímicos calculados. Los resultados interpretados desde los datos permitieron proponer que estos compuestos pueden actuar a través de dos e incluso múltiples mecanismos de acción con caminos preferentes que dependen de la naturaleza del metal y del ligando.

Además, estos autores sugieren que estos complejos no reaccionan *in vivo* directamente con ADN, pues son previamente biotransformados para luego acceder al ADN nuclear en la célula (104).

A. Denicola y colaboradores (2010) investigaron acerca del modo de acción de Nifurtimox y N-óxidos contenidos en heterociclos contra *T. cruzi*. Ellos plantean la interrogante sobre si el estrés oxidativo está o no involucrado en su modo de acción. Este reporte estudia la habilidad de Nifurtimox y de cinco N-óxidos para inducir estrés oxidativo en *T. cruzi*. Los autores plantean que los N-óxidos son un grupo prometedor como nuevos agentes tripanocidas, a los cuales resulta dificultoso elucidar su modo de acción.

Sin embargo, aquellos N-óxidos, como los derivados de benzofuroxano mostraron ser potentes inhibidores de la actividad deshidrogenasa en el parásito, afectando potencialmente la membrana mitocondrial, mecanismo que podría corresponder a unos de los modos de acción de estos derivados.

Los resultados aquí obtenidos también entregan argumentos contra la hipótesis de estrés oxidativo casi para todos los compuestos estudiados, incluido Nifurtimox. Una reducción significativa en la concentración de tioles de bajo peso molecular en el parásito fue observado después del tratamiento con Nifurtimox; sin embargo, esta baja no fue relacionada a la producción de especies oxidantes reactivas. El ciclo redox en Nifurtimox fue observado sólo a altas concentraciones (>400 mM), dos órdenes de magnitud mayor que la concentración requerida para presentar actividad sobre la forma proliferativa (5 mM). Estos resultados indican que un incremento en el estrés oxidativo no es el mecanismo principal de acción de Nifurtimox.

En último lugar mencionar que el derivado N-óxido contenido en el anillo indazol aumenta la producción de especies oxidantes intracelulares, pero es la menos efectiva contra *T. cruzi* (105).

H. Cerecetto y colaboradores (2009) estudiaron dos familias de nitrocompuestos, 5-nitrofurano y 5-nitrotiofeno. Ciertos derivados de 5-nitrofurano mostraron poseer actividad contra *T. cruzi* a través de estrés oxidativo e inhibición de la biosíntesis de ergosterol.

En este estudio se identificaron nuevos 5-nitrofuranos y análogos tio, con excelente efecto en la viabilidad de *T. cruzi* y adecuado índice de selectividad parásito/mamífero.

El análisis de esteroides libres desde el parásito, incubado durante 120 h, con los nitrocompuestos muestran que algunos de estos acumulan escualeno sugiriendo la inhibición de la actividad escualeno epoxidasa en el parásito.

Nifurtimox también mostró la capacidad de acumular escualeno sólo a bajos tiempos de incubación. Debido a este hecho algunos derivados fueron también probados como agentes antihongos. Además se realizó un estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad.

Este exhibió relevantes características para el diseño de nuevos derivados. Los autores plantean que los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a un mayor efecto general de 5-nitrofuranos y 5-nitrotiofenos en tripanosomátidos, abriendo posibilidades terapéuticas potenciales para ellos contra estas enfermedades infecciosas (106, 107).

C. Olea-Azar y colaboradores (2009) investigaron acerca del efecto de la complejación de Rutenio (M=Ru) con 5-nitrofuriltiosemicarbazonas en la actividad tripanocida. Los autores informan la síntesis y caracterización de tres series de nuevos complejos de rutenio de fórmula $[\text{RuCl}_2(\text{HL})_2]$, $[\text{RuCl}_3(\text{dmsO})(\text{HL})]$ y $[\text{RuCl}(\text{PPh}_3)(\text{L})_2]$ con 5-nitrofuriltiosemicarbazonas como ligandos (HL neutro y L monoaniónico).

Se evaluó la actividad de inhibición del crecimiento *in vitro* contra *T. cruzi* y el efecto de los coligandos en las propiedades fisicoquímicas relacionadas, es decir, el potencial redox de las especies nitro, la lipofilicidad y la capacidad de atrapar radicales libres.

Los resultados muestran que aunque una pérdida de la actividad fue observada como una consecuencia de la complejación con rutenio, la lipofilidad y la capacidad de atrapar radicales libres de los complejos obtenidos pueden ser correlacionadas con el efecto tripanocida que presentaron (108).

R. Di Maio y colaboradores (2009) realizaron estudios preliminares *in vivo* de diez derivados de 5-nitro-2-furil con buena y excelente capacidad anti *T. cruzi*. Estos, incluido Nifurtimox, fueron testeados oral e intraperitonealmente en animales sanos y en modelos murinos con aguda toxicidad. El presente estudio mostró una clara dependencia entre la estructura química y la actividad anti-Chagásica *in vivo* observada. Por una parte, cuatros de los derivados 5-nitrofurfurilidenos resultaron ser más tóxicos, en las condiciones ensayadas, que tres de los análogos 5-nitro-2-furilpropenos. Por otra parte, el derivado carbamato mostró ser un agente anti-tripomastigote inferior que los derivados semicarbazona (tres) y amida (uno).

Además, en este estudio *in vivo*, se confirmó que los activos *in vitro*, derivados 5-nitro-2-furil, especialmente los derivados (5-nitro-2-furil)propeno-semicarbazona, pueden ser empleados como alternativa terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Basados en la actividad tripanocida *in vivo* del compuesto 4-Hexil-1-[3-(5-nitro-2-furil)-2-propenilideno] semicarbazona se puede decir que éste posee un excelente perfil para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y un mejor perfil de toxicidad aguda que Nifurtimox, hecho que inspira futuros estudios relativos a efectos mutagénicos y genotóxicos (109).

Nitroindazoles

Otros potentes candidatos para el diseño de nuevas drogas son los derivados de indazol. Sus propiedades fisicoquímicas han sido ampliamente estudiadas y correlacionadas con sus propiedades farmacológicas. Presentan, entre otras características, propiedades antiinflamatorias, actividad agonista y antagonista de receptores de serotoninas, actividad anticancerígena y actividad antiparasitaria.

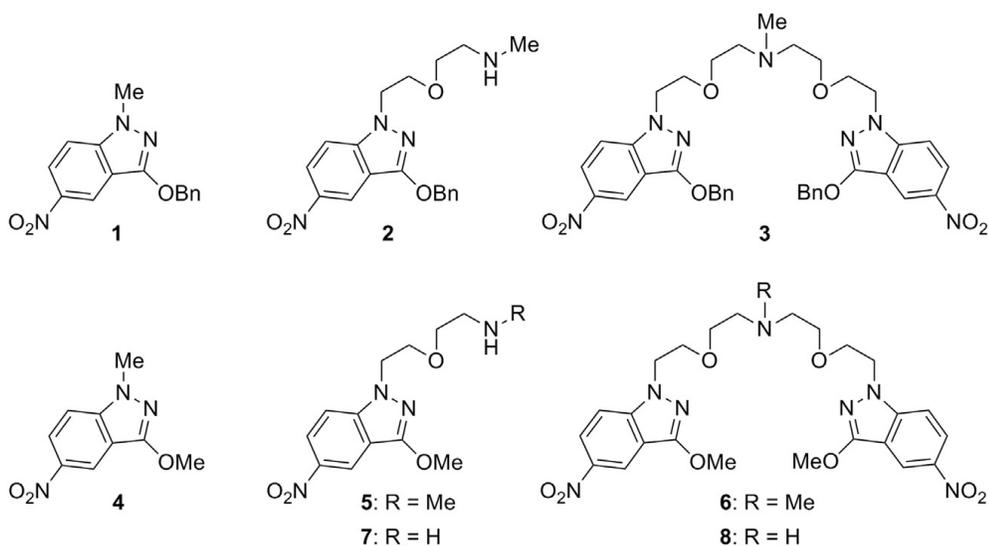
Sin embargo, estos derivados no han sido extensamente estudiados respecto de sus propiedades tripanocidas, más bien han centrado el estudio de estas moléculas en la inhibición de un conjunto de isoenzimas homólogas que catalizan la formación de óxido nítrico (NO), molécula con una gran implicancia biológica.

B. Muro y colaboradores (2014) reportaron la síntesis y la actividad antiprotozoal de dos familias derivadas de 5-nitroindazol: 3-alcoxi-1-alquil-(1,4)-5-nitroindazol y 3-alcoxi-1-(ω -aminoalquil)-(2, 3, 5-8)- 5-nitroindazoles, contra diferentes formas morfológicas de *T. cruzi*.

En los últimos años los autores han reportado la síntesis y las propiedades antichagásicas de numerosos derivados de 5-nitroindazol (110-113).

El estudio describió las propiedades antichagásicas y la síntesis química de una nueva familia de 5-nitroindazol derivados de aminas primarias, secundarias y terciarias (Figura 8). Además se propuso mejorar la solubilidad de estos compuestos en solución acuosa incorporando un sustituyente lipofílico, una cadena oxo-alquilica.

Figura 8: Derivados de 5-Nitroindazol (1-8)



Los compuestos 1 y 4 fueron sintetizados por alquilación de 1-metil-5-nitroindazol-3-ol. Los compuestos 2, 3, 5-8 se prepararon de acuerdo a diversas vías que involucran intermedios claves, tales como, estructuras cargadas como las betaínas, las cuales son fácilmente disponibles por ciclación de 2-halogeno-benzohidrazidas. Otros intermediarios fueron obtenidos por acilación, alquilación, intercambio (Reacción de Finkelstein) y otros mecanismos, los cuales dan origen a las correspondientes indazolinonas 1,2-disustituídos, las cuales fueron tratadas por un exceso de metil amina en etanol para dar las aminas secundarias 2 y 5. Este último, se trató con un equivalente adicional de haluro, produciendo las aminas terciarias 3 y 6. Finalmente, el tratamiento de otro intermediario con yoduro y exceso de amoníaco en etanol produce la amina primaria 7 como el producto de reacción principal, con una pequeña cantidad de amina secundaria 8.

Ambos compuestos fueron separados por cromatografía. La estructura de todos los compuestos se ha establecido en la base de datos analíticos y espectrales.

Los autores también realizaron una evaluación *in vitro* de la actividad anti-*T. cruzi* de los derivados 5-nitroindazol (1-8), sobre las formas parasitarias epimastigote, amastigote y tripomastigote. Además se evaluó la citotoxicidad en células Vero, y se informan los correspondientes índices de selectividad (SI) encontrados para estos derivados.

Los compuestos del 1-8 y el medicamento Benznidazol fueron ensayados a concentraciones de 1-100 mM, obteniendo los valores de IC₅₀ para cada estado morfológico del parásito.

Todos los derivados muestran una mayor actividad que Benznidazol contra las tres formas parasitarias, donde los derivados 3-benciloxi resultaron ser más activos que sus correspondientes análogos 3-metoxi.

A pesar de los resultados expuestos los autores precisan que no pueden establecer una correlación entre la estructura y la actividad antiparasitaria.

Con el objetivo de obtener información más precisa acerca de los compuestos que muestran altos valores de actividad y de SI (1 y 2) se evaluó la propagación del parásito en células Vero, a través de la medición de las tasas de infección y del número promedio de amastigotes y tripomastigotes presentes durante un tratamiento de 10 días. Se infectaron células Vero con formas metacíclicos de *T. cruzi* y la conversión gradual de esta última en amastigotes se observó en las células invadidas.

Durante el período mencionado la tasa de infección de las células huésped gradualmente aumentó alcanzando al final del experimento 99% de invasión.

La prueba se repitió en presencia del fármaco de referencia y de los compuestos 1 y 2 a concentraciones equivalentes a IC₂₅. Se encontró que la tasa de infección disminuyó en todos los casos en relación con el control, mostrando los compuestos 1 y 2 reducciones en la tasa de infección de 82% y 78%, respectivamente, una eficiencia mucho más alta que Benznidazol (19% de disminución) (114).

En cuanto al número promedio de amastigotes por célula Vero, los resultados fueron consistentes con los mencionados anteriormente de las tasas de infección.

Después del tratamiento, los compuestos 1 y 2 reducen de manera significativa el número de amastigotes por célula en 76% y 63%, respectivamente, mientras que Benznidazol mostró sólo una disminución del 37% (114).

Los resultados obtenidos en los ensayos de propagación son concordantes con los encontrados en el estudio de la actividad tripanocida, tanto para las formas intracelulares como extra celulares de *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, los autores proceden a evaluar la actividad *in vivo* de los compuestos 1 y 2 en ratas hembras infectadas con *T. cruzi*, cepa BALB/c. Se emplearon modelos murinos en ambas fases, utilizando Benznidazol como fármaco de referencia. En los experimentos los primeros 30 días, se consideran en la fase aguda de la enfermedad. Después de ese tiempo, la infección se considera crónica. Las ratas se inocularon con formas metacíclicos de *T. cruzi* y tratamiento con compuestos de ensayo (1 mg/kg dosis/ día).

Durante el estudio de la actividad en la fase aguda, se determinó el nivel de parasitemia cada día, donde se observa en la muestra el número de tripomastigotes circulantes/ml de sangre vs día transcurrido desde la infección. En el día de carga máxima de parásito (ca. 14 días después de la infección), el número de tripomastigotes disminuyó significativamente.

En el día 30, al final del período de observación de la fase aguda los compuestos 1 y 2 redujeron el nivel de parasitemia a un 33% y 39%, respectivamente, valores significativamente mayores que los encontrados para el fármaco de referencia (23%).

En relación con la actividad en la fase crónica de la enfermedad, el estudio mostró diferentes niveles de actividad anti-*T. cruzi* entre 30 y 120 días después de la infección, seguido del tratamiento mencionado. Se observó que el compuesto 2, era mucho más eficaz que Benznidazol, reduciendo significativamente los niveles de anticuerpos con respecto al control.

Finalmente los autores analizan la excreción de metabolitos y las alteraciones ultra-estructurales, y proponen que los derivados de indazol 1 y 2 causan cambios metabólicos que pueden interferir con algunas enzimas glicosomales o mitocondriales implicadas en el catabolismo de *T. cruzi*.

M.C. Vega y colaboradores (2012) desarrollaron un estudio a través de la técnica de Análisis Discriminante Lineal basado en la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) con el objeto de clasificar y predecir la actividad anti-*T. cruzi*.

Vega y colaboradores deciden preparar y probar algunos análogos de los compuestos más activos de la base de datos del grupo. Así, sintetizaron racionalmente y evaluaron *in vitro* un total de treinta y ocho compuestos, incluidos Nifurtimox y Benznidazol, donde los derivados 21-38 y 58-59 pertenecen a la familia de 1,2-disustituidas indazolinonas (Serie A), los derivados 39-52 y 54 pertenecientes a la familia de 2-sustituido 3-alcoxiindazol (Serie B) y los derivados 60-62 correspondientes a la familia 1-sustituido 3-alcoxiindazol (Serie C). Con fines comparativos, la síntesis y el estudio de los derivados 37 y 38, se plantearon sin grupo NO₂ en la posición 5 del anillo de indazol.

También se llevó a cabo la exploración de la relación estructura actividad utilizando una superficie molecular en donde se describieron los diferentes índices a comparar con el QSAR (“landscape activity”) con el software SARANEA. Por último, el grupo buscó similitudes entre 225 medicamentos con conocida actividad antiprotozoaria, siendo el compuesto 22 el más activo, mediante el uso del análisis de conglomerados.

Para confirmar que el sistema 1,2-disustituido 5-nitroindazolinona representa un novedoso y potente sistema anti-*T. cruzi* se realizaron diversos ensayos de actividad antiparasitaria. La evaluación biológica demostró que muchos de los compuestos probados exhiben actividad antichagásica adecuada y que, en general, los mejores compuestos tienen baja citotoxicidad inespecífica en células de macrófagos (110). El grupo concluyó que la estructura 1,2 disustituido 5-nitroindazolinona es necesaria si se desea tener un potente compuesto activo (Ej. compuesto 22 con un IC₅₀ = 0.93μM).

Además indicaron que la actividad depende, por un lado, de la lipofilia apropiada de las moléculas (proporcionada, por ejemplo, por grupos bencilos, o alquilo radicales simples: Me, Pr, iPr, etc.), y por el otro, con la similitud en los potenciales de reducción electroquímica de todas las indazolinonas 1,2-disustituido, los cuales están en concordancia con la susceptibilidad a las nitro reductasas de los parásitos.

Finalmente el estudio propone un nuevo y novedoso esqueleto, el sistema 1,2-disustituido-5-nitroindazolinona, como un compuesto prototipo que abre la puerta a nuevas modificación químicas de estos compuestos prometedores con el fin de aumentar su efectividad.

Folch-Cano y colaboradores (2010) plantearon estudiar dos nuevas familias de compuestos (ver figura 9). Derivados 1,2-disustituidos 5-nitroindazolin-3-ona (Serie A, compuestos 1-9) y derivados 2-sustituido 3-alcoxi-5-nitro-2H-indazol (Serie B, compuestos 10-18). Los autores evaluaron la capacidad de estas familias de producir radicales libres en sistemas biológicos tanto parasitarios como mamíferos. Ambas series de compuestos fueron caracterizadas electroquímicamente mediante el estudio de voltamperometría cíclica (VC) en medio aprótico. Las especies nitro anión radicales generadas fueron caracterizadas a través de resonancia de espín electrónico (REE). Además se analizó la interacción entre las especies radicales generadas a partir de los derivados 5-nitroindazol y glutatión (GSH) (115).

El estudio de VC en DMSO mostró que todos los derivados de 5-nitroindazol (1mM) estudiados poseen el mismo comportamiento electroquímico.

Los voltamogramas obtenidos representan un proceso de transferencia reversible monoelectrónica, con una cupla I_{pc}/I_{pa} cercana a -1,0 V, correspondiente a la generación de la especie nitro anión radical RNO_2^- , a partir de los derivados de 5-nitronzol.

Todos los derivados exhibieron valores de potenciales más negativos que Nifurtimox (-0,90 V), lo cual indicó una menor capacidad para ser reducido.

A partir del análisis de reversibilidad de sistemas los autores concluyeron que el proceso de transferencia electrónica es controlado por difusión que el mecanismo de reducción es cuasi-reversible.

En este sentido, los autores proponen que el nitro-anión radical generado electroquímicamente podría decaer mediante dos diferentes caminos, desproporción o dimerización. Así procedieron a calcular la constante de velocidad de segundo orden (k_2), para una reacción química acoplada a un proceso electroquímico, encontrando valores bajos para todos los derivados que van desde 217 a 226 $M^{-1}*s^{-1}$. Este hecho indicó que las especies nitro anión radical generadas a partir de ambas familias son estables en medio aprótico.

El estudio de reactividad de GSH con el radical nitro anión de los derivados de nitroindazol fue realizado mediante VC. Este mostró que el radical nitro anión electroquímicamente obtenido es inmediatamente re-oxidado al compuesto original por la acción de GSH, proceso que pudiere explicar, en parte, la actividad biológica observada para numerosos derivados de 5-nitroindazol contra *T. cruzi*.

Los autores también realizaron un estudio de REE y de simulación a los derivados nitroindazol de la serie A y B, donde fue posible obtener los espectros de REE por electroreducción de los compuestos in situ, al potencial de VC.

La simulación de los espectros para serie A se realizó en base a tres tripletes asignados a los núcleos de nitrógeno del grupo nitro R-NO₂, N-1 y N-2, además de tres dobletes asignados a los núcleos de hidrógeno H-4, H-6 y H-7. La serie B mostró en su patrón hiperfino diferente a los derivados de la serie A. Los espectros fueron simulados en base a dos tripletes asignados a los núcleos de nitrógeno del grupo nitro R-NO₂ y de N-1, además de tres dobletes asignados a los núcleos de hidrógeno H-4, H-6 y H-7.

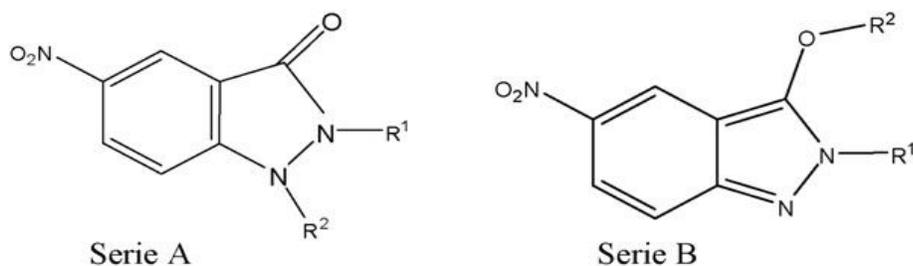
La diferencia en los patrones hiperfinos de las serie A y B fue atribuida a una menor interacción entre el electrón desapareado y el N-2.

Con el objeto de estudiar la capacidad productora de radicales libres de los derivados de nitroindazol en presencia de *T. cruzi* microsomal, fueron evaluados los compuestos más activos de la serie A (compuestos 1 y 8), empleando técnicas de REE y herramientas de spin-trapping. Los espectros de REE registrados para los compuestos 1 y 8 mostraron un patrón hiperfino consistente con el atrapamiento de nitro anión radical con DMPO. Adicionalmente se registró una señal que fue atribuida a la descomposición por oxidación de DMPO en presencia de oxígeno, especie denominada DMPO-X. Este hecho puede confirmar que los compuestos estudiados son capaces de producir estrés oxidativo en el parásito.

Finalmente los autores relacionan la capacidad productora de radicales libres con la estructura química de los derivados estudiados, a través de las intensidad de los espectros registrados, donde las moléculas con sustituyentes alifáticos en la posición N-1 exhibieron espectros más intensos en presencia de T. cruzi que los registrados para el derivado nitroindazolinona con sustituyente aromático en la misma posición.

También mencionan un decrecimiento en la intensidad de los espectros registrados en presencia de microsoma de rata, lo que indica una menor producción de radicales libres en presencia de este sistema biológico.

Figura 9: Derivados 5-Nitroindazolinona (Serie A) y 5-Nitroindazol (Serie B)



Derivatives	Serie	R ¹	R ²	Derivatives	Serie	R ¹	R ²
1	A	Bn	Me	10	B	Bn	Me
2	A	Bn	Pr	11	B	Bn	i-Pr
3	A	Ph	Me	12	B	Bu	Bu
4	A	Ph	i-Pr	13	B	Bn	Bn
5	A	Me	Me	14	B	Me	Bn
6	A	Me	Pr	15	B	Ph	i-Pr
7	A	Me	i-Pr	16	B	Bn	Pen
8	A	Me	Bn	17	B	Bn	Pr
9	B	Me	Me	18	B	Me	Pr

Otros derivados de indazol han sido desarrollados para el conocimiento sobre los requerimientos estructurales y una adecuada actividad anti- *T. cruzi*. Los nitro derivados mostraron una directa relación entre la estructura y la actividad antiparasitaria de estas moléculas, en relación a las posiciones 1 y 3 del anillo indazol.

El estudio electroquímico mostró que los derivados 5-nitroindazol generaban un nitro anión radical vía la transferencia de un electrón a pH fisiológico.

Espectros de resonancia de espín electrónico (REE) en microsoma de *T. cruzi*, mostraron que los derivados de 5-nitroindazol sufren una bio-reducción sin generación de especies reactivas de oxígeno (116).

También se han estudiado derivados de 3-alcoxi y 3-hidroxi indazoles, los cuales han sido caracterizados empleando técnicas electroquímicas y espectroscópicas, proponiendo que el mecanismo de reducción para este tipo de compuestos involucra la especie nitro anión radical a través de un proceso de autoprotonación (117).

Mediante la técnica de REE se confirmó la presencia de un intermediario paramagnético estable producto de la reducción electroquímica del grupo nitro.

Distintos estudios han propuesto derivados N-óxidos de indazol como agentes parasitarios, cuyos mecanismos de reducción indicaron la formación de especies radicalarias y la generación de especies reactivas de oxígeno en células de *T. cruzi* (118).

Un nuevo tipo de nitroheterociclo, estudiado respecto de su actividad atiprotzoal, son los derivados de Nitazoxanida (NIT, Alinia). Este, en humanos, es rápidamente metabolizado a Tizoxanida (TIZ), compuesto igualmente efectivo que su droga familiar.

G. Navarrete-Vázquez y colaboradores (2011) sintetizaron dos benzanálogos de Nitazoxanida (NIT) y Tizoxanida (TIZ), utilizando una corta ruta sintética.

Ambos compuestos fueron testeados *in vitro* contra seis protozoos (*Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium berghei*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*). El compuesto 1 (benzanálogo de NIT) mostró un amplio efecto antiprozoal contra todos los parásitos testeados exhibiendo valores de IC_{50} 's $< 5 \mu M$.

Este compuesto fue cinco veces más activos que NIT, dieciocho veces más potente que metronidazol contra *G. Intestinales*, diez veces más activo que pentadimina contra *L. Mexicana*, y siete veces más potente que Benznidazol versus *T. cruzi* (119).

B. Bourdin Tunz y colaboradores (2011) realizaron un estudio sobre una serie compuestos derivados 1-aril-4nitro-1H-imidazoles. En el reportaron, la síntesis, actividad anti-*trypanosoma* y la relación estructura actividad, de estos derivados, con énfasis en selectas moléculas activas *in vivo*.

Dos de los compuestos evaluados, 4-nitro-1-{4-(trifluorometoxi)fenil}-1H-imidazol y 1-(3,4-diclorofenil)-4-nitro-1H-imidazol muestran curar, en ratones, la Tripanosomiasis Africana. Estos actúan, tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad, al suministrar en forma oral una dosis de 25 a 50 mg/Kg, por cuatro días para la infección aguda, mientras que para el modelo crónico se suministró una dosis de 50 a 100 mg/Kg, por cinco días. Los derivados estudiados presentaron mutagénesis en diversas líneas celulares al ser evaluadas frente a compuestos que contienen el grupo nitroaromático.

Esta actividad mutagénica se pierde en bacterias clásicas carentes de nitro-reductasas específicas, para tres de cuatro compuestos evaluados. Así, las nitroreductasas mamíferas no reducirían a los compuestos nitroaromáticos con bajos potenciales redox con la misma avidez que su contraparte bacterial. Además confirmaron que estos compuestos no presentan riesgo genotóxico para el ser humano.

Los autores exponen desde el estudio de relación estructura actividad que la familia de 1-aril-4-nitro-1-H-imidazol provista de diferentes sustituyentes en el grupo fenil ($-\text{SO}_2\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{R}$) o con distinto grupo aril (quinolina, piridina, indol) o con diferente posición del grupo nitro en el anillo imidazol (2-metil-5-nitroimidazol) podrían conducir a nuevos, interesantes y activos antiparasitarios sin actividad genotóxica. Además mostraron una interesante actividad en *T. cruzi* (120).

C. Olea-Azar y colaboradores (2011) realizaron una evaluación electroquímica, espectroscópica y biológica de dos series de 7-nitroquinoxolina-2-ona (4-sustituidas y 1,4-disustituidas), como potenciales agentes anti-*T. cruzi*.

El objetivo del estudio fue caracterizar el mecanismo de reducción de los derivados recientemente mencionados utilizando la técnica de voltamperometría cíclica en medio aprótico. El comportamiento electroquímico se observó dependiente del sustituyente del anillo no aromático ($\text{R}=\text{CH}_3$ o $\text{R}=\text{H}$). Aquí se encontraron dos señales de reducción, para los derivados $\text{R}=\text{H}$ sustituidos, donde la primera es característica de un proceso de autoprotónación y la segunda representa un proceso puramente electroquímico del compuesto deprotonado (ECE). Aquellos derivados $\text{R}=\text{CH}_3$ sustituido exhibieron un mecanismo puramente electroquímico.

El mecanismo propuesto fue confirmado empleando espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE), permitiendo así proponer un patrón de acoplamiento hiperfino para estos nitroradicales. Espectros REE biológicos mostraron que estos derivados no siguen un mecanismo análogo a Nifurtimox o Benznidazol.

Todos los compuestos fueron ensayados como inhibidores del crecimiento contra *T. cruzi*, primero en la forma no proliferativa (e infectiva) del parásito (etapa tripomastigote) y luego, los que mostraron actividad, fueron ensayados en la forma no infectiva (etapa epimastigote).

Estos estudios mostraron que no existe relación entre el potencial de reducción y la actividad biológica. Finalmente, el mecanismo de inhibición de Tripanotión Reductasa (TR) fue explorado mediante modelación molecular. Estas sugieren la inhibición de la TR como uno de los mecanismos involucrados en la acción tripanocida (121).

En último lugar es importante mencionar algunos nitrocompuestos que también han mostrado ser eficaces contra *T. cruzi*, y no pertenecen a las categorías recientemente mencionadas, como Megazol [1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol)-5-nitroimidazol]. Este derivado nitro heterocíclico ha demostrado bajo ciertas condiciones experimentales generar altas concentraciones especies reactivas de oxígeno (ERO) capaces de inhibir la síntesis de proteínas; no obstante produce mutagénesis en el ADN, razón por la cual no es posible su utilización como tripanomicida. Sin embargo se han realizado estudios modificando su estructura base. Compuesto derivados de 2-4 y 5-nitromegazol han sido sintetizados y estudiados con el propósito de desarrollar nuevos agentes antichagásicos con similar actividad y menos citotóxicos que Megazol (48).

Estudios han propuesto la utilización de derivados de 1,3,4-tiadiazol-2-arylhidrazona como agentes antitripanosomas, puesto que se identificó un compuesto que arrojó un $IC_{50}=5.3 \mu M$, dos veces más eficiente que Megazol ($IC_{50}=9.9 \mu M$), denominado Brazilizon (122).

Además otras drogas como Nitrofurazonas (NF, 5-nitro-2-furaldehído-semicarbazona), derivadas de ácido furoico, han sido sintetizadas y analizadas como posibles tripanocidas mostrando una alta actividad debido a la inhibición de la enzima tripanotión reductasa presente en el parásito (123).

En último lugar deseamos mencionar el estudio realizado por T. P. Barbosa y colaboradores. Este se basó en el diseño, síntesis y actividad anti-malaria *in vitro* de una nueva serie de compuestos tipo Chalcona, similares a otros previamente estudiados. Estas siete nuevas Chalconas fueron sintetizadas eficientemente a través de la reacción de Morita-Baylis-Hillman, diseñadas usando la estrategia de hibridación molecular y completamente caracterizadas y bioevaluadas frente a lishmania. Los resultados muestran que la actividad *in vitro* de las nuevas Chalconas es menor si se compara con el compuesto utilizado comúnmente para lishmania, Amfotericina B.

Toda esta nueva serie original de compuestos resultaron activos contra forma promastigote de *L. amazonensis* y *L. chagasi* y mucho más activas que otras Chalconas previamente bioevaluadas (124).

Los antecedentes descritos previamente muestran que los nitroheterociclos son un grupo de compuestos con amplias aplicaciones biológicas, los cuales cuentan con los requerimientos estructurales para actuar mediante diversos mecanismos.

Así, resulta interesante centrar una investigación en dos nuevas familias de compuestos, derivados de nitrofurano y de nitroindazol como potenciales agentes antichagásicos. A través de un estudio experimental y teórico en el cual la relación estructura actividad es clave.

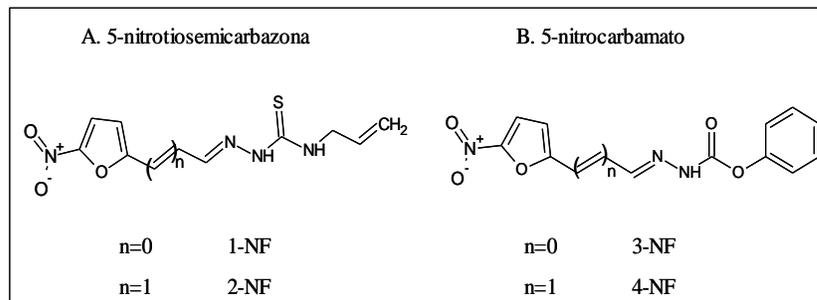
1.10 Hipótesis

La hipótesis propuesta en este estudio se basa principalmente en las diferencias estructurales presentes en dos nuevas familias de compuestos, Nitrofuranos y Nitroindazole (Figura 10). Ambas familias poseen grupos electroactivos (nitro) que podrían impulsar un mecanismo que involucre la especie nitroradical.

Por otra parte, las familias propuestas en este estudio (Nitrofuranos y Nitroindazoles) poseen grupos heterocíclicos distintos, miméticos a Nifurtimox y Benznidazol respectivamente, lo cual podría inducir un mecanismo de acción distinto para cada grupo de compuestos, donde la relación estructura/actividad podría ser una buen referente para evaluar el mecanismo de acción tripanocida de estos dos grupos de compuestos.

Finalmente, las propiedades fisicoquímicas experimentales y teóricas obtenidas, permitirán razonar la actividad biológica de estas familias.

Figura 10: Derivados 5-Nitrofurano (Superior) y Derivados 5-Nitroindazol (Inferior)



A		B	
Compuestos	Estructura	R1	R2
1NI	A	CH ₃	H
2NI	A	(CH ₂) ₅ OCH ₂ CH ₂ OH	H
3NI	A	(CH ₂) ₅ OH	H
4NI	A	(CH ₂) ₆ Cl	H
5NI	A	C ₆ H ₅	H
6NI	B	H	CH ₃
7NI	B	H	CH ₂ (C ₅ H ₄ N)
8NI	B	CH ₃	CH ₃
9NI	B	H	C ₆ H ₅
10NI	A	CH ₃	CH ₃

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad tripanocida de dos familias de nitrocompuestos (nitrofuranos y nitroindazoles) a través de un análisis multi-enfoque que permita dilucidar y esbozar posibles mecanismos de acción para estos fármacos.

1.11.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar el mecanismo de reducción electroquímico de estas dos familias de compuestos utilizando Voltamperometría Cíclica (VC) en diferentes medios.
- 2) Registrar y caracterizar las especies radicalarias generadas electroquímicamente mediante Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE).
- 3) Determinar las constantes de acoplamiento hiperfinas por medio de simulación empleado el software WINEPR Simfonia.
- 4) Detectar y caracterizar los radicales libres generados en medio biológico (microsoma de *T. cruzi* y de mamífero), utilizando técnicas de Spin trapping.
- 5) Correlacionar las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas por simulación con las obtenidas desde el cálculo teórico (DFT).
- 6) Determinar la reactividad de los grupos electro-activos presentes en ambas familias a través de la obtención de la función de Fukui nucleofílica.
- 7) Evaluar el crecimiento y/o la inhibición de *Trypanosoma cruzi* estado morfológicos epimastigote y seguido mediante Nefelometría.

- 8) Determinar la citotoxicidad de los nitroderivados mediante el Ensayo MTT (Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il])-2,5-difeniltetrazolin) en células mamíferas y tripomastigotes.
- 9) Evaluar *in vitro* el consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* e identificar la posible generación de estrés oxidativo de estos compuestos.

Capítulo II: MATERIALES Y METODOS

2. Materiales y Métodos

2.1 Descripción de las técnicas empleadas

2.1.1 Voltamperometría cíclica (VC)

Si bien, las propiedades prototrópicas y los tiempos de vida media de los aniones radicales nitro han sido estudiados principalmente usando técnicas como la Resonancia de Espín Electrónico y la Radiólisis de Pulso (86-88), las técnicas electroquímicas como la Voltamperometría Cíclica han demostrado jugar un rol ventajoso en el estudio de estos radicales (89-96). Bajo condiciones adecuadas del medio, la reducción monoelectrónica de nitro a anión radical nitro produce Voltamperogramas cíclicos muy bien resueltos debidos al par redox $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$. Además ofrece la determinación rápida de los potenciales redox de especies electroactivas y la evaluación del efecto del medio sobre los procesos redox. En consecuencia, usando apropiadamente la versatilidad de la técnica de Voltamperometría Cíclica es posible estudiar la factibilidad de formación del anión radical nitro (89) así como su comportamiento prototrópico (93), sus tiempos de vida media naturales (93,94) y su reactividad con otras moléculas (95,96). Estas características hacen de esta técnica la más usada para obtener información cualitativa acerca de sistemas que involucran reacciones electroquímicas. Su importancia radica en su capacidad de proveer información sobre la termodinámica de procesos redox, la cinética de reacciones de transferencia electrónica heterogéneas, posibles reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción.

La Voltamperometría Cíclica consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección hasta alcanzar un potencial determinado, seguido del posterior barrido en la dirección contraria, en una solución sin agitación. Este ciclo puede realizarse varias veces si es requerido. Durante el barrido del potencial, el potencióstato del equipo mide la corriente resultante al potencial aplicado. Es decir, este método electroanalítico se basa en mediciones de la intensidad de corriente (i_p) en función del potencial (V) aplicado.

Los principales parámetros que se pueden obtener de un voltamperograma cíclico son los potenciales de peak E_{pc} y E_{pa} , la diferencia entre los potenciales ΔE y el cociente entre las corrientes anódica y catódica (i_{pa}/i_{pc}). Estos últimos son índices de la reversibilidad de la transferencia electroquímica.

R. S. Nicholson estableció en 1966 una manera de calcular el cociente i_{pa}/i_{pc} refiriendo las corrientes al eje de valor cero, haciéndolas independientes de la línea base (125).

Ello se logra introduciendo las corrientes de pico características del proceso, obtenidas desde el voltamperograma cíclico, en la ecuación (E1).

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + \frac{0,485(ip\lambda)}{(i_{pc})_0} + 0,086 \quad (i)$$

2.1.2 Resonancia de Espín Electrónico (REE)

La espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico es una técnica que permite la detección y cuantificación de especies paramagnéticas, o sea, compuestos con electrones desapareados, entre los que se encuentran los radicales libres.

Esta técnica puede ser usada para investigar concentraciones de radical muy bajas, mientras éstas sean lo suficientemente estables para que su presencia sea detectada. La espectroscopia REE involucra el desdoblamiento inducido magnéticamente de estados de espín electrónicos. En esta espectroscopía la muestra es inmersa en un fuerte campo magnético y es expuesta a una radiación de frecuencia en el orden de las microondas (9,8GHz, banda X).

La muestra absorbe la energía irradiada cuando la frecuencia de radiación coincide con la diferencia de energía entre los dos estados energéticos desdoblados por el campo magnético aplicado, siempre y cuando esta transición satisfaga las reglas de selección correspondientes. El desdoblamiento ocurre solamente cuando el electrón se encuentra en un estado con momento angular total diferente de cero. Esto significa que los electrones en átomos con estructura de capa cerrada al no mostrar este comportamiento no pueden ser detectados por REE (116). Para electrones libres los momentos de espín angular pueden tener dos orientaciones posibles y éstas dan lugar a dos estados de espín con polaridades opuestas. En la ausencia de un campo magnético externo estos dos estados son degenerados.

Sin embargo, en presencia un campo magnético externo la degeneración se pierde, resultando en dos estados de diferente energía. Este desdoblamiento es conocido como efecto Zeeman. Un peak en la absorción ocurre cuando el campo magnético se encuentra en resonancia con los dos estados de espín, de tal manera que la diferencia en energía coincide con la energía de irradiación.

El conocimiento de los valores g (característicos de cada radical) y del detalle de las interacciones hiperfinas (valores a_N) permiten identificar las especies radicalarias, además de contener información sobre la distribución del electrón en la molécula.

La estructura hiperfina provee una información que permite identificar los tipos de radicales presentes en una muestra, además de la magnitud de los acoplamientos dependiendo de la distribución del electrón desapareado en las cercanías de los núcleos magnéticos presentes.

Los radicales aparecen a menudo como intermediarios durante una reacción, por consecuencia su identificación entrega valiosa información acerca del mecanismo de reacción, y la medición de la variación de su concentración en el tiempo permite hacer estudios cinéticos.

En sistemas biológicos la detección directa de radicales libres resulta compleja debido a su alta reactividad y cortos tiempos de vida media que radican en una naturaleza transitoria. Para superar éste tipo de dificultades se emplea la técnica de Spin Trapping (117,118), la cual ha sido utilizada con éxito para determinar e identificar intermediarios radicalarios en sistemas biológicos.

Esta técnica fue desarrollada para facilitar la detección de radicales de corta vida por REE. Consiste en el atrapamiento del radical ($R\cdot$) con una molécula denominada atrapador para producir otro radical mucho más estable, el cual puede ser registrado por el equipo.

En general, en la reacción de atrapamiento se forma un producto de adición a un doble enlace del tipo exhibido en la siguiente reacción):



$R\cdot$ representa al radical que se desea identificar, y $X=Y$ representa el atrapador, compuesto diamagnético sobre el que se produce la reacción de adición, llamado spin trap. Mientras que el producto de la reacción de adición, representado por $R-X-Y\cdot$, se denomina espín aducto y es un compuesto paramagnético, el cual posee idealmente un tiempo de vida media mayor al del radical ($R\cdot$).

Para que esta reacción ocurra y el atrapador permita registrar la señal de un radical inestable la velocidad de la reacción del radical con el atrapador tiene que ser superior a cualquiera de las reacciones que puedan tener lugar en el medio, de manera que éstas no entren en competencia con el atrapamiento. Además el aducto de spin formado tiene que ser lo suficientemente estable como para permitir su detección por REE.

Hoy en día existen nuevos atrapadores y bases de datos con numerosos de ellos, por ejemplo la base de datos del National Institute of Environmental Health Services*. Los compuestos más utilizados como atrapadores son aquellos que poseen los enlaces: $C=C$, $C=N$, $N=N$, $C=O$ ó $N=O$. Sin embargo, debido a lo importante que es el proporcionar de forma directa o indirecta información acerca de la naturaleza del radical atrapado, $R\cdot$, la gran mayoría de atrapadores se basan en dos estructuras que proporcionan mayor información: nitroso compuestos y nitronas. Ambos tipos de atrapadores tienen como característica común que la reacción de adición con un radical conduce a la formación de un radical nitróxido (126, 127). * <http://tools.niehs.nih.gov/stdb>

Dentro de la familia de nitrocompuestos, los más usados como Spin Traps son el 2-metil-2-nitrosopropano (MNP) y ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzosulfónico (DBNBS). En la familia de las nitronas las más usadas como spin traps son 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) y α -fenil tert-butil nitrona (PBN), 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina N-óxido (DEPMPO), y α -(4-Piridil-1-óxido)-N-terbutilnitrona (POBN). Las nitronas forman a menudo aductos radicalarios de larga vida con una gama amplia de especies radicalarias, centradas en átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno u azufre.

La desventaja que poseen estos atrapadores que se enlazan al radical mediante el átomo de carbono adyacente al grupo nitróxido, dejándolo por lo tanto más distante del orbital molecular que contiene el electrón desapareado. Como resultado, no es siempre posible resolver los acoplamientos hiperfinos del radical atrapado en sí, haciendo la asignación de las líneas espectrales observadas de una especie en particular mucho más complicada. Sin embargo, el desarrollo de programas de simulación computacional de las representaciones gráficas de REE ha logrado superar la desventaja recientemente mencionada.

2.1.3 Cálculos Teóricos

La química computacional es todo aquel aspecto de la química el cual es explicado mediante el uso de un ordenador y un software. Principalmente, se puede decir que es la evolución de la química teórica ya que su principal uso se centra en la aplicación de los métodos de cálculo para resolver ecuaciones y calcular propiedades a nivel molecular.

Dado que la química computacional es útil en la comprensión de sistemas químicos, es empleada como herramienta de aprendizaje y de respaldo en investigaciones experimentales.

La optimización de la geometría es el punto de partida del análisis computacional. A partir de ella es que se obtiene toda la información requerida de una molécula (distancias y ángulos de enlace, energía, potenciales de ionización, afinidades electrónicas, etc), o de un sistema (constantes de equilibrio, propiedades termodinámicas como entalpías o energías libres, potenciales de reducción, estados de transición, etc).

La aproximación de Hatree-Fock (HF) es uno de los métodos más usados y precisos para obtener información de una molécula o sistema a través de un análisis computacional, que considera N efectivos problemas de un electrón, donde la repulsión electrónica es tratada como un campo promedio (128). Sin embargo, esta no incluye efectos de correlación electrónica.

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) es un método que demuestra ser muy eficiente para describir la correlación electrónica, pero no es un método ab-initio, ya que la correlación y el intercambio se representan mediante funcionales empíricos que no fueron derivados de una teoría exacta.

DFT se basa en la función de probabilidad de la densidad electrónica o función de densidad electrónica. Por simplificación de términos se suele llamar densidad electrónica o densidad de carga, la cual es designada por $\rho(x, y, z)$.

La densidad electrónica no solo es la base de la DFT sino también de una serie de métodos que permiten el estudio de átomos y moléculas (129) y a diferencia de la función de onda usada en métodos como Hartree-Fock (HF) y Post-Hartree-Fock puede ser medida por técnicas como la difracción de rayos X o la difracción de electrones. Además posee una ventaja considerable con respecto a los métodos basados en la función de onda, es una función que depende de la posición solamente, es decir depende solo de tres variables (x, y, z), mientras que la función de onda de una molécula de n -electrones es una función de $4n$ variables, tres coordenadas espaciales y una coordenada de espín para cada electrón constituyente de la molécula. No importa cuál sea el tamaño de la molécula, la densidad electrónica siempre será una función de tres variables, mientras que la complejidad de la función de onda se incrementa con el número de electrones presentes en la molécula. Como resultado en DFT se resuelve el mismo problema monoelectrónico que en HF, reemplazando el operador de Fock por una funcional de la densidad (130, 131). De esta manera los métodos DFT son capaces de generar predicciones muy razonables respecto de las propiedades espectroscópicas, especialmente en la determinación de las constantes de acoplamiento hiperfino (132). Las contribuciones de intercambio y correlación pueden ser combinaciones de diferentes funcionales de intercambio (por ejemplo el de Becke (B), el de Perdew, Burke y Ernserhof (PBE)) con el funcional de correlación de Lee, Yuong y Parr (LYP), y de Perdew (P86). Buenos resultados, en la determinación de las constantes de acoplamiento hiperfinos, se han obtenido con la funcional de intercambio de tres parámetros de Becke (133) con correlación electrónica no local de Lee-Yang-Parr (134) (B3LYP).

2.1.3.1 Cálculo de las propiedades electrónicas

Constantes de Acoplamiento Hiperfino

Para la asignación de las constantes experimentales a los diferentes núcleos de un radical, existen distintos métodos teóricos de muy diferentes grados de dificultad y costo computacional. Previamente, es importante aclarar el concepto de densidad de espín. La densidad de electrones es la suma de las densidades para los electrones α y β . La densidad de espín refleja la probabilidad de encontrar un exceso de electrones α respecto a los β en un sistema de capa abierta.

En un sistema donde la densidad de electrones α es igual a la de electrones β , la densidad de espín es cero. Es una propiedad importante en moléculas que tienen electrones desapareados.

$$\rho_s(r) = \rho_s^\alpha(r) - \rho_s^\beta(r) \quad (ii)$$

Sin embargo, la propiedad que permite conocer los acoplamientos existentes entre el electrón desapareado y los núcleos magnéticos presentes en la molécula se obtiene a partir de un espectro REE es la constante de acoplamiento hiperfino. La ecuación de McConnell (135) es utilizada para calcular las constantes de acoplamiento hiperfino a partir de las densidades de espín según:

$$a(r) = Q\rho_s(r) \quad (iii)$$

Donde Q es una constante que depende del átomo donde está centrado el radical.

Afinidad Electrónica

La afinidad electrónica (AE), según su definición IUPAC, es la energía requerida para separar un electrón de un ión con una única carga negativa (energía del proceso $X^- \leftrightarrow X + e^-$). Una definición equivalente y más común es la cantidad de energía que se libera cuando un átomo neutro gaseoso en su estado energético más bajo (estado fundamental) capta un electrón y se transforma en un ión negativo en estado gaseoso. Así tenemos que:

$$AE = E_{\text{inicial}} - E_{\text{final}} \quad (iv)$$

Por ende, para un radical generado a partir de la reducción de su forma neutra, la AE se calcularía mediante la diferencia de energías entre la forma neutra y la forma radicalaria de la molécula.

Por lo que esta puede ser calculada fácilmente como la diferencia de energías obtenidas al optimizar la molécula con N y con N+1 electrones.

$$AE = E_N - E_{N+1} \quad (v)$$

Existe otra manera de calcular la AE. Aplicando el Teorema de Koopmans que establece que dada una función de onda de N electrones Ψ_N , la AE requerida para producir una función Ψ_{N+1} con idénticos orbitales, obtenida al agregar un electrón en el orbital χ_c , es simplemente $-\varepsilon_c$ (136).

Si consideramos que el orbital que acepta el electrón nuevo es el orbital desocupado de menor energía (LUMO) entonces:

$$AE = -\varepsilon_{LUMO} \quad (vi)$$

Lo mismo se aplica al Potencial de Ionización (PI) obteniendo como relación:

$$PI = -\varepsilon_{HOMO} \quad (vii)$$

Electrofilia

El concepto de electrofilia corresponde a un índice de reactividad. Este concepto fue reformulado usando una expansión de segundo orden de la energía electrónica con respecto a la transferencia de carga ΔN a una geometría fija.

Debido a que los electrófilos son especies que se estabilizan al recibir una cantidad adicional de carga electrónica del medio, existe un mínimo de energía para un valor crítico ΔN^* . Utilizando esta idea y un cálculo variacional se establece la definición de la electrofilia global expresada según:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{(PI+EA)^2}{8(PI-EA)} \cong \frac{(-\varepsilon_{HOMO} - \varepsilon_{LUMO})^2}{8(-\varepsilon_{HOMO} - \varepsilon_{LUMO})} \quad (viii)$$

Donde ω corresponde a la electrofilia, μ es el potencial químico del sistema y η es la dureza global (136).

** LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital
HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

Funciones de Fukui

La función de Fukui ($f(r)$) fue introducida por Parr y Yang como una generalización del concepto de Orbitales Moleculares de Fukui (137), que centra la noción de reactividad en la interacción entre los orbitales frontera HOMO y LUMO**. La función $f(r)$ está definida como el cambio de densidad electrónica en un punto del espacio cuando varía el número de electrones del sistema N, manteniendo el potencial externo, y/o la o geometría constante. Considerando la adición o remoción al sistema de un electrón, las funciones de Fukui vendrían definidas por las ecuaciones siguientes.

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \quad (ix)$$

$$f^+(r) = \rho_N(r) - \rho_{N+1}(r) \quad (x)$$

Donde $\rho(r)$ es la densidad electrónica.

Considerando la aproximación de Yang and Mortier (AIM "átomos en moléculas") se obtienen las siguientes funciones de Fukui condensadas (138):

Para el ataque de un electrófilo $f_k^- = q_k^{N-1} - q_k^N \quad (xi)$

Para el ataque de un nucleófilo $f_k^+ = q_k^N - q_k^{N+1} \quad (xii)$

Donde q_k representa la carga atómica de Mulliken sobre el átomo k.

Estas ecuaciones permiten a través de un cálculo sencillo de cargas atómicas calcular las funciones de Fukui condensadas en átomos para un ataque electrofílico, y para un ataque nucleofílico, lo cual permite determinar los sectores y específicamente los átomos susceptibles a sufrir el ataque ya sea a un electrófilo o a un nucleófilo.

2.2 Reactivos

Los reactivos 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), perclorato de tetrabutylamonio (PTBA), y dimetilsulfóxido (grado espectroscópico, DMSO) fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich. La dimetilformamida (DMF) y el cloruro de potasio (KCl) fueron provistos por Merck.

Los nitrofuranos derivados fueron sintetizados en el laboratorio Dr. Hugo Cerecetto, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, mientras que la familia de nitroindazoles fue provista por el Dr. Vicente J. Arán, Instituto de Química Médica, CESIC, Madrid, España.

Tanto las distintas cepas de parásito de *T. cruzi*, como la línea celular RAW 264.7 se obtuvieron del laboratorio de Farmacología y Bioquímica de Parásitos de los Drs. Antonio Morello y Juan Diego Maya, de la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El Nifurtimox se obtuvo de laboratorios Bayer y Benznidazol se obtuvo de laboratorios Roche.

2.3 Voltamperometría cíclica (VC)

2.3.1 Medio Aprótico:

El estudio electroquímico fue realizado en un equipo Metrohm 693 VA el cual consta de una celda de vidrio de fondo cónico de 20 mL de capacidad, provista de una tapa hermética con 5 cavidades, una ocupada por el burbujeo de gas nitrógeno y otras tres ocupadas por los electrodos de *referencia*, *trabajo* y *auxiliar*.

El electrodo de referencia corresponde a un electrodo de calomelano (SCE). El electrodo de trabajo es un electrodo de gota colgante o suspendida de mercurio (HDME). El electrodo auxiliar empleado es de carbono vítreo (GC).

La medición electroquímica VC se realizó en dimetilsulfóxido (DMSO) y Dimetilformamida (DMF), bajo una atmósfera de nitrógeno y utilizando tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito soporte. Se trabajó con concentraciones de muestra de 10^{-3} mol/L y de 0.1 mol/L de electrolito soporte. Los barridos de potencial se efectuaron a velocidades entre 0,1 y 2 Vs^{-1} en todo el rango de potencial que permite el estudio de estos nitroderivados (entre 0 y -2 V).

2.3.2 Medio Mixto:

El estudio electroquímico se llevó a cabo con el equipamiento descrito anteriormente.

La medición electroquímica VC fue realizada en una mezcla DMF:Buffer citrato, relación 30:70, ajustadas a pH 2, 7 y 9; bajo una atmósfera de nitrógeno y utilizando cloruro de potasio (KCl) como electrolito soporte. Se trabajó con concentraciones de muestra de 10^{-3} mol/L y de 0.1 mol/L de electrolito de soporte aproximadamente. Los barridos se efectuaron a velocidades entre 0,1 y 2 Vs^{-1} .

2.4 Espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE)

Todos los espectros de REE fueron registrados en banda X (9.85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con cavidad rectangular y 50 kHz de modulación de campo.

2.4.1 Generación de Radicales Libres

Las especies radicalarias fueron generadas mediante una reducción electroquímica *in situ* a los potenciales obtenidos en VC. Las condiciones experimentales fueron: temperatura ambiente, concentración de compuesto de 10^{-3} mol/L y 0.1 mol/L de PTBA usando como solvente DMSO en un sistema saturado de nitrógeno.

2.4.2 Generación Microsomal de Radicales libres – Técnica de Spin Trapping

Las muestras de parásitos empleada de *T. Cruzi* corresponden a la cepa Y cosechada mediante centrifugación a 3500 rpm, el quinto día después de la siembra. La concentración empleada de parásito fue de 6 a 8 mg de proteína*ml⁻¹.

Las mediciones fueron efectuadas a temperatura ambiente el día de cosecha, utilizando como atrapador el spin trap 5,5-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido (DMPO ca. 100 mM), 2 mM de nitrocompuesto en DMSO y β -NADPH (β -nicotinamidadifosfato ca. 1 mM).

Células de adenocarcinoma mamario de ratón de la línea TA3 también fueron evaluadas con esta técnica, empleando la misma concentración de proteína*ml⁻¹ que para *T. cruzi*. La diferencia radica en los atrapadores usados. Para la prueba descrita se emplearon los atrapadores WPQ52 y MN0804 sintetizados y caracterizados en la tesis doctoral del Dr. Germán Barriga.

El ensayo en sí pretende detectar especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante el atrapamiento de radicales con los atrapadores descritos (DMPO, WPQ52 y MN0804), formando un espín aducto detectable y medible en REE.

2.5 Simulación

Las constantes de acoplamiento se obtuvieron mediante comparación y simulación de espectros usando el programa informático WINEPR Simfonia Versión 1.25 estimadas con una precisión de ± 0.05 G.

2.6 Estudio Teórico/Computacional

2.6.1 Búsqueda conformacional, optimización de la geometría y cálculo de las propiedades electrónicas

En el estudio teórico se ejecutó una búsqueda conformacional, empleando mecánica molecular del paquete computacional de *Spartan '02*, con el fin de obtener el conformero de mínima energía.

Luego, se realizó una pre-optimización de geometría empleando un método semi-empírico PM3 y finalmente un cálculo de las propiedades electrónicas y de la reactividad del sistema empleando *DFT* (Teoría de funcionales de la densidad). La base empleada fue *(U)B3LYP/6-31G*+* (137), con el paquete computacional de Gaussian`03.

2.7 Estudio Biológico

2.7.1 Citotoxicidad en macrófagos

El estudio de citotoxicidad en macrófagos se realizó a través de la medición de las células viables luego de la incubación de nitrocompuestos. Este ensayo consiste en la reducción mitocondrial de sales de tetrazolio o MTT (Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il])-2,5-difeniltetrazolin) a formazán, que tiene un color púrpura y cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Cultivo Celular

Se cultivaron células RAW 264.7 a 37 °C en ambiente humidificado y CO₂ al 5 %, a una densidad de 100.000 células/cm², en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22 %, estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 µg/mL y suero fetal bovino al 5 %.

Viabilidad celular

En placas de cultivo de 96 pocillos, se incorporaron 100 µL de células equivalentes a 500.000 células/mL de medio. 24 horas más tarde se incuban los compuestos en un rango de concentración de 6,25 a 100 µM en triplicado.

Al día siguiente, en medio RPMI sin rojo fenol y sin suplemento se adicionó 10 µL de MTT concentración 5 mg/mL en presencia de 0,22 mg/mL de fenazina metosulfato (como transportador de electrones), se incubaron durante 4 horas a 37 °C, y el precipitado de cristales de formazán fue disuelto en 100 µL de SDS al 10% en HCl 0,01 mol/L incubándolo a 37 °C durante toda la noche.

La intensidad del color se midió por absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas Labsystems Multiskan MS, Finlandia.

2.7.2 Actividad sobre *Trypanosoma cruzi*

2.7.2.1 Actividad en epimastigotes de *T. cruzi*

La medición de la actividad en *T. cruzi* se evaluó empleando el ensayo MTT descrito previamente. En placas de cultivo de 96 pocillos, se incorporaron 100 μ L de epimastigotes equivalentes a 3×10^6 parásitos/mL de medio. 24 horas más tarde se incuban los compuestos en triplicado a una concentración de compuesto igual a 100 μ M en triplicado y se procede como se describió en el punto 2.7.1.

2.7.2.2 Actividad en tripomastigotes de *T. cruzi*

Modelo in vitro de infección por T.cruzi

Las células cultivadas según la metodología descrita fueron infectadas 24 horas después del cultivo. Se infectaron con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, clon Dm28c, a razón de tres tripomastigotes por macrófago.

Viabilidad en Tripomastigotes

La medición de la actividad en tripomastigotes de *T.cruzi* se evaluó a través de los tripomastigotes viables luego de la incubación de nitrocompuestos. Del mismo modo detallado previamente, en placas de 96 pocillos, se incorporaron 100 μ L de tripomastigotes equivalentes a 50×10^6 de tripomastigotes/ml de medio.

Más tarde se incuban los compuestos en un rango de concentración de 2 a 20 μM en cuadruplicado, además de Nifurtimox y Benznidazol al una concentración de 20 μM . Al igual que en los casos descritos previamente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm la cual corresponde al número de tripomastigotes vivos en el cultivo.

Nota: en todos los casos donde los nitro derivados disueltos en DMSO son incubados en sistemas *in vitro*, ya sea con células eucariontes o procariontes, se considera una concentración final de DMSO no superior al 1%.

2.7.3 Toxicidad en células tumorales mamarias línea TA3

Se evaluó la toxicidad en células TA3 mediante el ensayo de captación del rojo neutro. Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. Esta metodología está basada en el hecho de considerar que un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción, si interfiere en el proceso de división y multiplicación celular. Ello conlleva a una reducción de la velocidad de crecimiento celular reflejándose en el número de células presentes en el cultivo. El grado de inhibición del crecimiento relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa es un índice de toxicidad (139). El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierde viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior.

Seguidamente se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y calculada la concentración que produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular. Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C), al usarlas deben ser sembradas en frascos de 75 cm² y recuperadas de la exposición a la tripsina. En todo el procedimiento por lo general se realiza la lectura en la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 540 nm.

Para este ensayo se emplearon dos tipos de controles, un control de medio y un control de solvente. Bajo condiciones controladas debe asumirse que no hay salida de rojo neutro.

La densidad óptica (D.O) obtenida se toma como índice de la cantidad original de rojo neutro presente en el cultivo. El cálculo del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento celular se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - ((\text{D.O (t)}/\text{D.O (c)}) \times 100)$$

Dónde:

- D.O (t) es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de la sustancia que se evalúa.
- D.O (c) es la densidad óptica del cultivo control, en el cual no debe haber salida de rojo neutro.

2.7.4 Inhibición del crecimiento parasitario

Se realizaron los cultivos parasitarios en matraces de Erlenmeyer de brazo lateral. La concentración de parasito empleada fue de 3×10^6 parásitos/mL fase epimastigote cepa Dm28c. Se inocularan los distintos nitrocompuestos usando DMSO como vehículo a una concentración final no superior al 1%. Todo el sistema se trabaja en triplicado.

El crecimiento fue seguido mediante Nefelometría usando un Turbidímetro DRT-100D de HF Instruments, cada 24 horas, por 7 días después de incubadas las drogas. Se efectuaran las mismas mediciones para controles, blancos y parásitos tratados a diferentes concentraciones de nitrocompuesto de ente $1\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$.

Conversiones utilizadas: 80×10^6 de parásitos epimastigotes corresponden a 1 mg de proteína o a 12 mg de peso fresco.

2.7.5 Efecto del consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno se cuantificó polarográficamente en una cámara hermética termo regulada a 28°C , con agitación constante, equipada con un electrodo de oxígeno tipo Clark (model 5331) conectado a un monitor de oxígeno modelo 5300 (Yellow Springs Instruments Co.).

La respuesta del electrodo fue registrada con un convertidor analógico/digital DI-U148 y procesado con el software Windaq versión 2.6. Para la calibración, se asumió que el medio saturado de aire contenía $435 \text{ nmolO}_2/\text{mL}$. Se utilizó una concentración de 1 mg de proteína equivalente a $8,0 \times 10^7$ epimastigotes en cámara, con buffer de PBS a pH 7,4.

La respuesta en el consumo de oxígeno fue expresado mediante el porcentaje de la velocidad de consumo con respecto a la velocidad del control. Los compuestos estudiados se evaluaron a seis diferentes concentraciones, adicionado en la cámara 10 μL de las soluciones stock preparadas en DMSO. Las concentraciones empleadas en la cámara fueron de 0.05 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM y 1.35 mM.

Estudio Electroquímico

3.1 Nitrofuranos

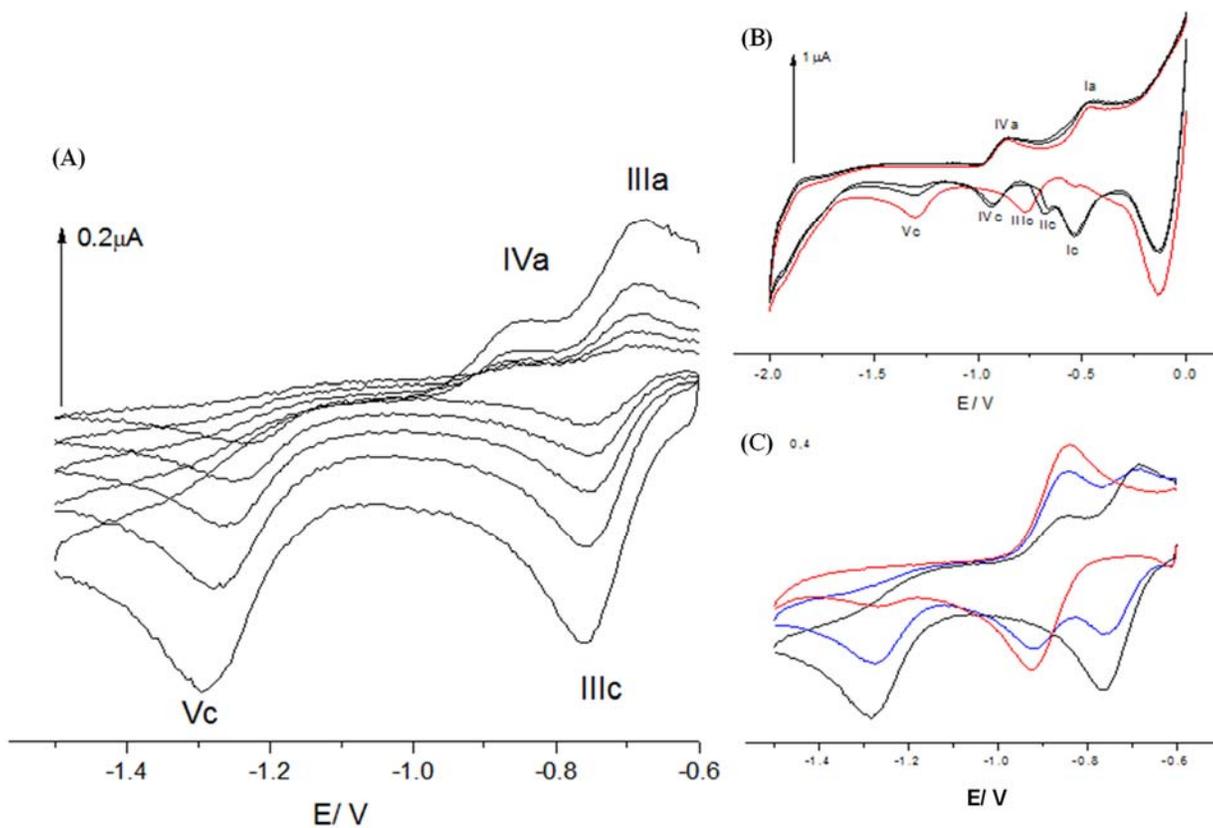
3.1.1 Medio Aprótico

Se realizó un estudio electroquímico de los compuestos para determinar sus potenciales de reducción y los intermediarios que se generan por transferencias de carga sucesivas (140).

Primeramente se procede al estudio del comportamiento de los 5-nitrofuranos en medio no acuoso, para ello se ha utilizado DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida) como disolventes y 0.1 mol/L PTBA (perclorato de tetrabutilamonio) como electrolito soporte. Bajo estas condiciones, todos los compuestos presentaron un comportamiento electroquímico similar. La Figura 11 (A, B y C) muestra el voltamograma cíclico para el derivado 1-NF, como ejemplo de los voltamogramas obtenidos para todos los nitrofuranos derivados. En ellos fue posible registrar una cupla (IIIc/IIIa), aparentemente reversible a un potencial de pico, E_{pc} , de -0.75 V y dos picos irreversibles con potenciales de pico anódico y catódico de $E_{pa}/ -0.84$ V (IVa) y $E_{pc}/ -1.29$ V (Vc) respectivamente.

Para estudiar el comportamiento de las respuestas voltamperométricas a diferentes escalas de tiempo del experimento, se realizaron medidas en las cuales se modificó la velocidad de barrido de potencial (Figura 11 (A)).

Figura 11: Voltamogramas Cíclicos (A, B y C) registrados para el derivado 1-NF (1 mM), TBAP (100 mM) en DMSO



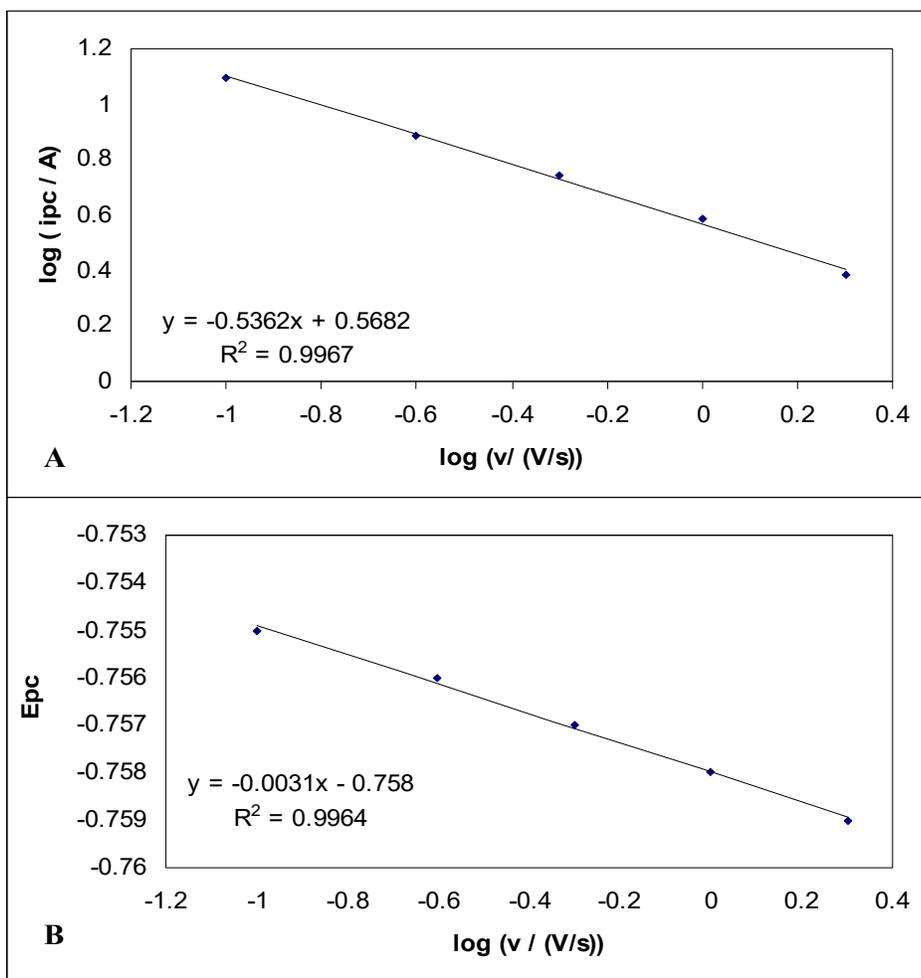
(A) Voltamograma cíclico usando un rango de potencial entre -1.4 y -0.4 V a diferentes velocidad de barrido entre 0.1 y 2.0 V/s. (B) Voltamograma de barrido sucesivos usando un rango de potencial de entre -2.0 y 0 V y una velocidad de barrido de 2.0 V/s: (i) la línea roja, representa el primer ciclo y (ii) las líneas negras, segundo y tercer ciclo respectivamente. (C) Voltamograma cíclico usando una velocidad de 2.0 V/s: (i) la línea negra, muestra al derivado 1-NF; (ii) la línea roja, muestra al derivado 1-NF en presencia de NaOH 0.5 mM; y (iii) la línea azul, muestra en derivado 1-NF en presencia de NaOH 1.0 mM.

En todas las medidas, los voltamperogramas obtenidos muestran las mismas señales, cambiando, como es esperado, la intensidad de corriente de los diferentes picos. Los voltamogramas registrados muestran que la diferencia de los potenciales de pico catódico y anódico, ΔE_p , para la onda que se observa como reversible difiere del valor teórico de 60 mV para un proceso monoelectrónico, diferencia que se incrementa con la velocidad de barrido pasando de un valor de aproximadamente 30 mV a la velocidad más lenta (0,1 V/s) hasta 80 mV a la velocidad más rápida (2 V/s). Este resultado nos hace descartar la aparente reversibilidad de dicha onda ya que en realidad la transferencia electrónica involucrada obedecería a un proceso cuasi-reversible. Utilizando los datos de potencial y corriente de pico catódico (E_{pc} e I_{pc}) obtenidos desde el voltamograma cíclico a distinta velocidad de barrido de potencial se realizaron las siguientes representaciones gráficas que se muestran en la figura 12 para el derivado 1-NF.

En la Figura 12 (A), se observa una dependencia lineal del logaritmo de la intensidad de pico catódico con el logaritmo de la velocidad de barrido de potencial, obteniéndose un valor absoluto para la pendiente de 0.5362 V. Este valor, nos indica que el proceso está regido por difusión; ya que se encuentra próximo al valor teórico de 0.5.

Por otra parte, en la Figura 12 (B), se muestra una dependencia lineal entre el potencial del pico y el logaritmo de la velocidad de barrido, siendo en este caso el valor absoluto de la pendiente de 0.0031 V.

Figura 12: Relación de corriente ($\log(i_{pc} / (A))$) y potencial (E_{pc}) en función de la velocidad de barrido ($\log(v / (V/s))$) para el derivado 1-NF



A. Log i_{pc} vs Log v de la onda de reducción IIIc para el derivado 1-NF (c.a. 1×10^{-3} mol/L) en DMSO con 0,1 mol/L de PTBA. **B.** E_{pc} vs. Log v de la onda de reducción IIIc para el derivado 1-NF (c.a. 1×10^{-3} mol/L) en DMSO con 0,1 mol/L de PTBA.

Desde ambas representaciones podemos suponer que la señal IIIc obedecería a un proceso controlado por difusión en el que una reacción de transferencia monoelectrónica lenta es seguida por una reacción química rápida. Estos antecedentes nos permiten atribuir a la cupla IIIc/IIIa a la reducción electroquímica del grupo nitro con la consecuente formación del radical nitro anión ($\text{HRNO}_2/\text{HRNO}_2^-$) a través de una transferencia monoelectrónica, mientras que la señal irreversible (Vc) correspondería a la reducción del nitro anión radical a hidroxilamina ($\text{HRNO}_2^-/\text{RNHOH}$) vía una transferencia de tres electrones (92, 141). Por otra parte, los voltamogramas obtenidos para todos los compuestos exhiben un pico anódico asignado como Ia a un $E_{pa}/ -0,46$ V, el cual es asociado a la oxidación de la hidroxilamina, obtenida desde el nitro anión radical (Vc), a nitroso derivado. Un segundo y tercer barrido consecutivos (ver figura 11 (B)) muestran un par de señales de menor intensidad designadas como Ic y IIc en el voltamograma, donde atribuimos que la señal Ic a $E_{pc}/ -0.54$ V corresponde a la generación de hidroxilamina desde el nitroso derivado generado previamente, proceso óxido-reducción reversible de nitroso compuesto a hidroxilamina (cupla Ic/Ia), a través de la ganancia de dos electrones (RNO/RNHOH). La señal IIc, observada previa a la formación del radical nitro y posterior a la reducción de nitroso compuesto, es atribuible también a la reducción de nitroso derivado, pero desde un derivado aniónico lo cual se traduce en un incremento del potencial de pico catódico (142).

Cuando se realiza un barrido de potencial acotado (Figura 11 (A)), aparece un pico anódico cercano a $E_{pa}/ -0.84$ V (IVa).

Esta señal se observa en todos los derivados estudiados bajo esa condición, y estaría relacionada con la reacción química acoplada a la reducción electroquímica del grupo nitro.

Una de las reacciones químicas más conocidas que se suscitan en nitrocompuestos con fracciones ácidas en su estructura (82, 83, 121, 142), es la reacción de tipo padre-hijo conocida como mecanismo de autoprotonación. Este proceso corresponde a un equilibrio ácido-base en medio aprótico, y es un comportamiento típico del decaimiento de nitro radicales.

Este mecanismo se pretende conformar a través del estudio de la evolución de los voltamperogramas con la adición de una base como hidróxido de sodio (NaOH).

Los 5-nitrofuranos derivados poseen tanto en su anillo heterocíclico como en su cadena lateral átomos de nitrógeno (N), de los cuales uno (N3/cadena lateral) está enlazado a un átomo de hidrógeno el que puede actuar como dador de protones. El N del grupo nitro (N1/anillo) puede actuar como aceptor de protones. En consecuencia la molécula puede actuar como un ácido y una base de tal manera que este tipo de equilibrios pueden afectar fuertemente su mecanismo de reducción.

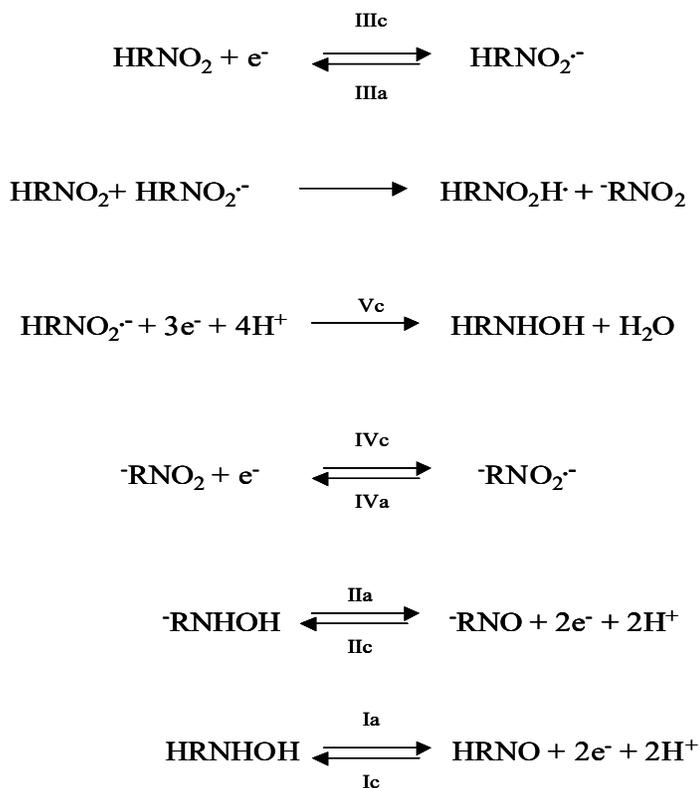
Específicamente, con el objeto de considerar este tipo de influencias ácido-base y su incidencia en el mecanismo, se realizaron una serie de experiencias, las primeras de ellas consistieron en adicionar sucesivas cantidades de NaOH 0,1 mol/L y estudiar su efecto en los voltamperogramas (ver Figura 11 (C)).

La evolución de estos voltamperogramas indica que al adicionar la base (NaOH) la señal correspondiente a la cupla IIIc/IIIc decrece. Esto significa que la concentración del reactivo inicial disminuye; es decir va desapareciendo la especie que se reduce en la primera señal. Este resultado nos muestra la existencia de un proceso ácido-base y que probablemente el hidrógeno unido al N3 manifiesta un comportamiento ácido. La figura 11 (C) muestra el voltamograma cíclico del derivado 1-NF en ausencia de NaOH y en presencia de la misma a una velocidad de barrido de potencial constante de 2 V/s. A concentración 0,5 mM de NaOH (línea azul) se observan dos cuplas bien definidas (IIIc/IIIa y IVc/IVa) y una señal irreversible (Vc). La cupla IVc/IVa, cercana a Epc/ -0,92 V corresponde a la reducción de la molécula aniónica, generada mediante la adición de NaOH, a radical nitro anión deprotonado ($^-\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$). La cupla IIIc/IIIa y el pico catódico Vc desaparecen gradualmente, conforme aumenta la concentración de NaOH, mientras que la cupla IVc/IVa se observa reversible. Importante es destacar que dicha señal se observa cuando el derivado es tratado con un barrido de potencial acotado y cuando el barrido de potencial es sucesivo.

La evolución del voltamograma cíclico frente a la adición de cantidades de NaOH permite confirmar el mecanismo propuesto de autoprotónación, posibilitado dadas las características estructurales de los nitro derivados estudiados, donde todos aquellos que contaban con hidrógenos lábiles en su cadena lateral presentaron un comportamiento similar.

En suma, el mecanismo de reducción propuesto para los derivados de 5-nitrofurano implica una reducción electroquímica monoelectrónica acompañada de una reacción química rápida, proceso asociado a un equilibrio acido-base en medio aprótico conocido como mecanismo de autoprotónación. El mecanismo de reducción propuesto implica por una parte la formación del radical nitro anión protonado (HRNO_2^-) y por otra la generación del radical nitro anión deprotonado ($-\text{RNO}_2^-$) observado en los voltamogramas cíclicos obtenidos de barridos de potencial sucesivo y en los cuales se emplea una base fuerte. La figura 13 indica el mecanismo de reducción propuesto para la familia de nitrofuranos estudiados.

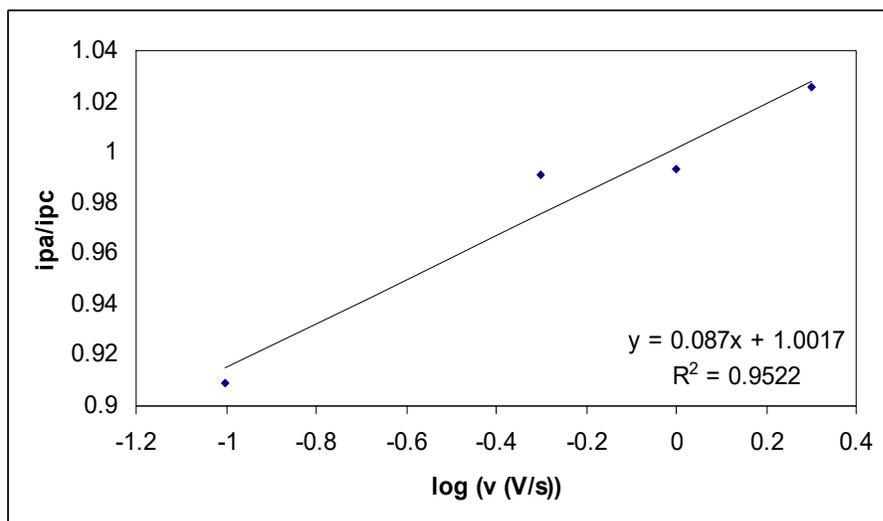
Figura 13: Mecanismo de reducción propuesto para 5-nitrofuranos



Como se observó anteriormente, un efecto muy importante es la influencia que tiene sobre el voltamograma la velocidad de barrido de potencial. A partir de estos voltamperogramas es posible calcular las razones de las corrientes de pico los cuales se han calculado de acuerdo a la expresión propuesta por Nicholson (125, 144).

En la siguiente Figura 14 se muestra la dependencia de la razón de corrientes, i_{pa}/i_{pc} , con la velocidad de barrido de potencial para el derivado 2-NF. Se observa que este cociente aumenta conforme aumenta la velocidad de barrido de potencial, alcanzando valores cercanos a 1 a velocidades suficientemente altas.

Figura 14: Dependencia de las razones de corriente de los Voltamperogramas Cíclicos para la formación de nitro anión radical 2-NF (1mM) en DMSO.



El resultado encontrado implica que la reducción monoelectrónica del derivado 2-NF, no corresponde a un proceso reversible ya que no se obtiene una razón de corriente igual a 1, a todas las velocidades analizadas. Por el contrario, los resultados encontrados implican que el anión radical nitro producido en el barrido catódico de ida no se oxida en un 100% en el barrido anódico de vuelta, generando valores de razones de corriente diferentes de 1. La explicación se debe a que el anión radical nitro lleva a cabo una reacción química que consume al radical, impidiendo que éste se oxide en forma cuantitativa en el barrido de vuelta. En este sentido, la especie nitro-anión radical generada electroquímicamente podría permitir dos tipos de reacciones diferentes de decaimiento, desproporción o dimerización (115).

En el caso de aniones radicales nitro generados en medio aprótico se ha descrito que esta reacción química corresponde a un proceso de dimerización (145), mientras que para medio acuoso y mixto, se ha referido que la reacción química corresponde a un proceso de desproporción (146).

Considerando que la reacción de dimerización es la vía de descomposición del radical en medio aprótico, se procedió a evaluar la estabilidad de las especies nitro anión radical empleando el procedimiento descrito por Olmstead y Nicholson (147). Este desarrolló una teoría, la cual, permite a partir de los voltamperogramas cíclicos obtener la constante cinética de segundo orden, denominado constante de dimerización (k_d).

Esta k_d da cuenta de que tan rápido decaerá el radical, en medio aprótico, a través de un mecanismo de dimerización.

A partir de los valores de razones de corrientes medidos experimentalmente desde los voltamperogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido, es posible interpolar el valor del $\log \omega$ desde las curvas teóricas descritas por Olmstead y Nicholson (146), ya que estas curvas relacionan las razones de corriente con el $\log \omega$. Este parámetro ω , se conoce como el parámetro cinético, se define para el caso de la dimerización como:

$$\omega = k_d C^0 \tau \quad (xiii)$$

Donde k_d es la constante cinética para la reacción de dimerización, C^0 es la concentración del nitrofurano derivado en el seno de la disolución y τ es la constante de tiempo definida como:

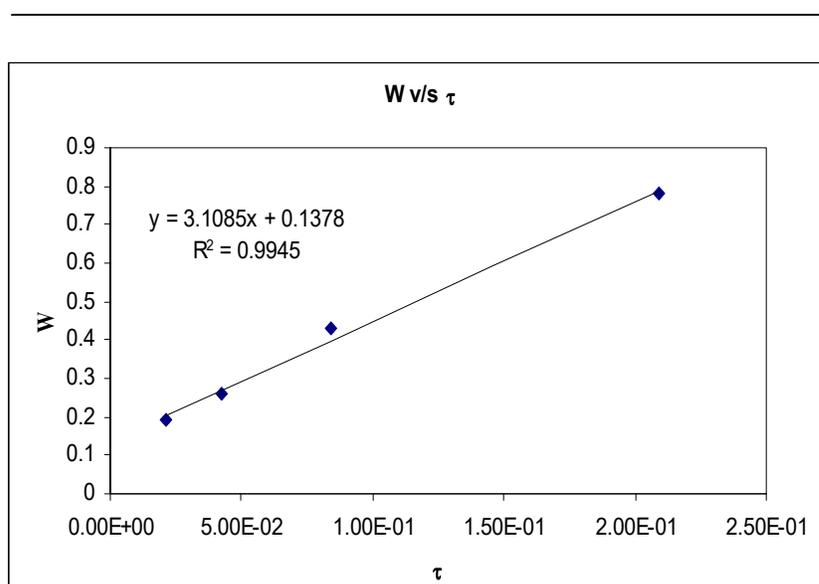
$$\tau = |E_{ps} - E_{1/2}| / \nu \quad (xiv)$$

Donde ν es la velocidad de barrido de potencial, E_{ps} representa el potencial de cambio (Potencial de Switching) y $E_{1/2}$ el potencial de media onda ($E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$).

De acuerdo a la ecuación (xiii) existiría una relación lineal entre el parámetro cinético ω , obtenido interpolando en las curvas teóricas los valores experimentales de i_{pa}/i_{pc} , y la constante de tiempo τ , parámetro conocido de las condiciones experimentales aplicadas.

En efecto, de acuerdo a lo que se aprecia en la figura 15, la relación o dependencia de ω versus τ , para la reacción de dimerización del derivado 2-NF, es lineal. Esta relación lineal entre ω y τ , es indicativa de que, efectivamente, la reacción química se ajusta bien al proceso propuesto inicialmente, quedando confirmada que dicha reacción de decaimiento corresponde a una dimerización del radical.

Figura 15: Dependencia de ω versus τ para la dimerización de 2-NF, $C^0=1\text{mM}$, Medio DMSO.



Desde el valor de la pendiente de la recta exhibida en la figura 15 se obtiene el valor de la constante k_d , donde para el derivado 2-NF y considerando una concentración de 1mM la constante corresponde a $k_d = 3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en medio aprótico.

El análisis de la cinética de segundo orden permite calcular el tiempo de vida media, $t_{1/2}$, del anión radical nitro a través de la siguiente relación:

$$t_{1/2} = 1/(k_d C^0) \quad (xv)$$

Donde, para el derivado 2-NF, el tiempo de vida media corresponde a $t_{1/2} = 0.32 \text{ s}$.

Siguiendo la metodología descrita previamente se procedió al cálculo del valor de k_d para los cuatro nitrofuranos estudiados incluido Nifutimox (ver tabla 2).

En la tabla 2 se resumen los valores obtenidos para la reducción de los nitrofuranos así como los parámetros que dan cuenta de la estabilidad del anión radical nitro generado.

Tabla 2: Parámetros voltamperométricos correspondientes a la reducción del grupo nitro para la cupla IIIc/IIIa vs. SCE en DMSO

Compuesto	E_{IIIc} (V)	E_{IIIa} (V)	ΔE (V)	$E_{1/2}$ (V)	i_{pa}/i_{pc}	k_d ($M^{-1} s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (s)	E_7^1 (V)	K_{O_2} ($M^{-1} s^{-1}$)
1 - NF	-0.75	-0.69	0.06	-0.72	0.61	$1.49 \cdot 10^5$	0.07	-0.149	7.94
2 - NF	-0.77	-0.69	0.08	-0.73	1.02	$3.11 \cdot 10^3$	0.32	-0.166	2.36
3 - NF	-0.56	-0.52	0.04	-0.54	1.00	$8.94 \cdot 10^2$	1.12	-0.001	$5.97 \cdot 10^{-3}$
4 - NF	-0.60	-0.57	0.03	-0.59	1.10	$1.41 \cdot 10^3$	0.71	-0.020	$5.17 \cdot 10^{-3}$
NFX	-0.91	-0.85	0.06	-0.88	1.01	$7.23 \cdot 10^4$	0.01	-0.287	$1.30 \cdot 10^{-2}$

*Compuestos de concentración 10^{-3} mol/L en DMSO usando exceso de PTBA. ** Cociente de Nicholson a 2 V/s

Si se comparan los valores de E_{pc} se puede concluir que la presencia de una cadena lateral de carbamato en la molécula produce compuestos más fácilmente reducibles, y por tanto, con una mejor capacidad para generar especies radicalarias. Este efecto puede ser explicado por el carácter electro-atractor de electrones de la cadena de carbamato, lo que provoca una disminución de la densidad electrónica en el anillo facilitando la reducción del grupo 5-nitro. También se observa que estos derivados se reducen a potenciales de onda media, $E_{1/2}$, menores que los obtenidos para la primera cupla de reducción de Nifurtimox (-0,91 V), por lo cual necesitan menor energía para reducirse.

Este hecho podría modificar positivamente su actividad biológica, si el mecanismo de acción que presentan estos derivados es asociado a un reciclaje redox. Además el $t_{1/2}$ calculado para todos los nitrofuranos estudiados es mayor que el calculado para Nifurtimox.

Las k_d obtenidas tienen un valor comparable con la obtenida para Nifurtimox; sin embargo los compuestos 2-NF y 3-NF se muestran como la especies nitro anión radicales más

estables ya que presenta el menor valor de k_d , mientras que el compuesto 1-NF, decaerá más rápido siguiendo un mecanismo de dimerización pues posee el mayor valor de k_d .

Destacar, que la adición de una cadena de carbamato al anillo 5-nitrofurano le confiere mayor estabilidad al radical y facilita la reducción del grupo nitro al tener un carácter electro-atractor de electrones.

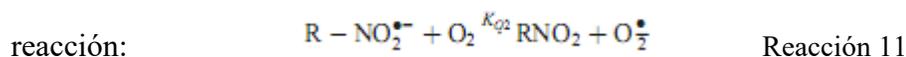
Empleando la técnica de voltamperometría cíclica en DMF, se evaluó la capacidad antiparasitaria que presentan estos nitrofuranos derivados a través de la relación con la capacidad que tengan éstos para reducirse en sistema biológico (*in vivo*) (87).

Los potenciales de reducción obtenidos del estudio VC empleando DMSO y DMF como solventes permiten tener una visión de cómo estos *viabiles fármacos* se comportan en medio hidrofóbico (símil membrana celular), incluso entregan información más precisa y significativa a través de la obtención de parámetros de importancia biológica, tales como E^{1_7} y K_{O_2} . El potencial E^{1_7} representa la energía necesaria para transferir el primer electrón de un grupo electroactivo y formar el radical aniónico correspondiente en medio acuoso a pH 7. En definitiva es un indicador de la energía que necesita una determinada especie electroactiva, en nuestro caso el grupo nitro, para reducirse y formar la especie radical nitro anión *in vivo*.

En el mismo orden de ideas, se ha reportado la relación lineal que existe entre el potencial catódico (E_{pc}), obtenido en DMF, con el potencial E^{1_7} , evaluado mediante radiólisis de pulso, a través de la siguiente función lineal.

$$E_{pc} = -576.623 + 1.163 * E^{17} \quad (xvi)$$

Los potenciales E^{17} se obtuvieron por medio de la medida del E_{pc} que representan la reducción $R-NO_2/R-NO_2^-$ en DMF. Esta medida electroquímica nos entrega información sobre la factibilidad de generar la especie nitro anión radical, así como también la reactividad que posee esta especie para reaccionar con oxígeno molecular y generar un ciclo redox en condiciones aeróbicas con la consecuente formación de superóxido (O_2^-), a través de la obtención de la constante de equilibrio (K_{O_2}) implicada en la siguiente



La constante de equilibrio de la reacción 11 puede ser obtenida empleando la ecuación Nerst.

$$\Delta E = RT/nF \ln K \quad (xvii)$$

$$0.059 \log K_{O_2} = \{-0.155 - [E_{(RNO_2/RNO_2^{\bullet-})}]\}$$

Donde -0.155V corresponde al potencial en condiciones no estándar, concentración 1mM para la semi-reacción O_2/O_2^- y el potencial de la semi-reacción $E(R-NO_2/R-NO_2^-)$ corresponde al potencial E^{17} (148). La tabla 2 lista los valores calculados para E^{17} y K_{O_2} , en ella se puede apreciar que todos los derivados de nitrofurano estudiados presentan potenciales, E^{17} , menores que el calculado para Nifurtimox, indicando que estos derivados serían más fácilmente reducibles por la acción de una enzima reductasa. Esta propiedad favorecería su actividad tripanocida, si el mecanismo de acción antiparasitario de estos compuestos siguiera una vía análoga a Nifurtimox.

La constante de formación de superóxido, k_{O_2} , calculada mediante el procedimiento descrito previamente muestra para los derivados 1-NF y 2-NF valores bajos respecto de Nifurtimox, este fenómeno se comprende como una menor capacidad para promover estrés oxidativo con la consecuente formación de superóxido. Sin embargo, los derivados 3-NF y 4-NF muestran valores de k_{O_2} del orden de Nifurtimox, pudiendo presentar similar capacidad a Nifurtimox para generar estrés oxidativo a nivel celular.

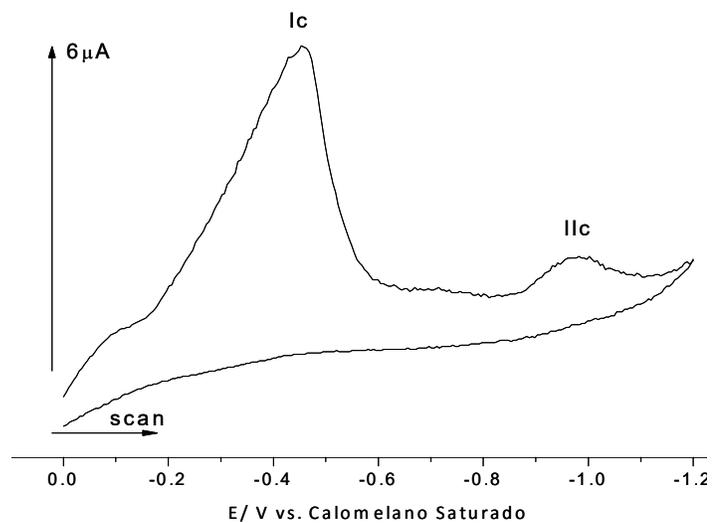
También es importante mencionar que otros antecedentes han reportado que la producción de superóxido mediada por el ciclo redox de diversos xenobióticos en medio biológico, es dependiente de su potencial de reducción, donde los compuestos que presentaran potenciales $E^{17} < -400$ mV no presentarían una generación significativa de superóxido (149).

Por lo tanto, si comparamos los resultados de nuestro estudio con los citados anteriormente, podemos concluir que los nitrofuranos estudiados en esta tesis, podrían ser capaces de producir superóxido mediante un ciclo redox bajo condiciones similares a las del estudio mencionado, ya que los valores de potenciales E^{17} obtenidos se encuentran por sobre de los -400 mV ($-1,00$ y -166 mV).

3.1.2 Medio Mixto

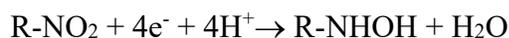
El estudio del comportamiento electroquímico de la familia derivada de nitrofurano en medio mixto se llevó a cabo en una mezcla DMF:Buffer citrato (KCl 0,1 M), relación 30:70, ajustadas a pH 2, 7 y 9; empleando una concentración de nitrofurano de 1×10^{-3} M y 0,1 M de PTBA. La figura 16 muestra el voltamograma cíclico obtenido para el derivado 2-NF a pH 2.

Figura 16: Voltamogramas obtenidos para el derivado 2-NF.
Velocidad de barrido de potencial 2V/s, en DMSO, 0.1M PTBA



Aquí es posible observar claramente dos cuplas de reducción irreversibles. La primera señal I_c alrededor de -0.4 V vs. SCE, podría corresponder a la reducción electroquímica del grupo nitro ($R-NO_2$) con la consecuente formación de la hidroxilamina derivada ($R-NHOH$), vía la transferencia de 4 electrones.

Dicha especie se encuentra favorecida a pH ácido ya que cuenta con los protones necesarios para generar la protonación del grupo nitro a potenciales menos negativos que los observados en medio aprótico. La cupla IIc observada en la figura 16 a potenciales más negativos cercano a -1.0 V vs. SCE, podría asignarse a la formación de la amina derivada ($R-NH_2$) a través de la reducción de la hidroxilamina protonada ($R-NHOH_2^+$) y la transferencia de 2 electrones según lo muestra el esquema de reducción propuesto (Esquema 2).



Esquema 2: Mecanismo de reducción propuesto para nitrofuranos derivados en medio mixto a pH 2.

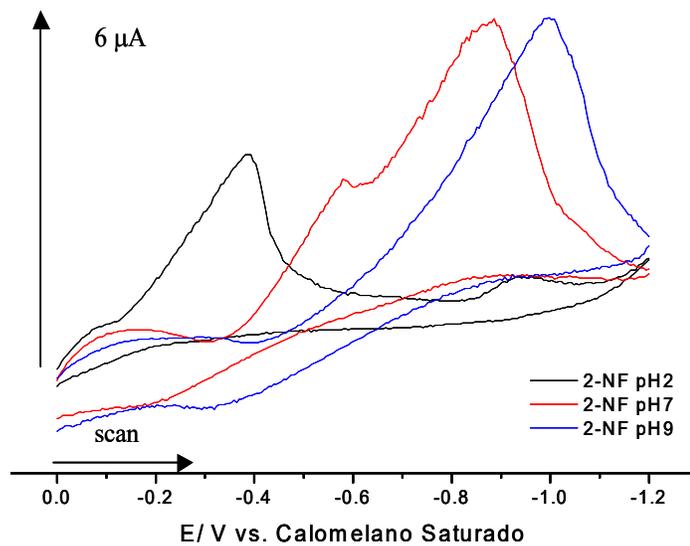
La figura 17 muestra un ejemplo de los voltamogramas obtenidos en un amplio rango de pH. A pH 7 (línea roja) se observa para estos nitro derivados que la cupla IIc desaparece y que la cupla Ic se desplaza hacia potenciales más negativos.

La respuesta voltométrica indicaría que la formación de la especie hidroxilada es más difícil a pH 7 que a pH 2 debido a la menor disponibilidad de protones en la disolución, por este motivo el potencial de reducción obtenido para estos derivados se eleva hasta a alrededor de -0.87 V vs. SCE.

Además la ausencia de la señal IIc estaría directamente relacionada con la falta de protones disponibles para generar el intermediario $R-NHOH_2^+$ precursor de la amina derivada.

El comportamiento descrito anteriormente también es observado en las mediciones electroquímicas a pH 9, donde la cupla I_c de reducción del grupo nitro a la derivada hidroxilamina se desplaza a potenciales más negativos (-0.99 V vs. SCE).

Figura 17: Voltamograma cíclico para el derivado 2-NF. Velocidad de barrido de potencial 2V/s, en medio mixto a pH 2,7 y 9; 0.1M PTBA.



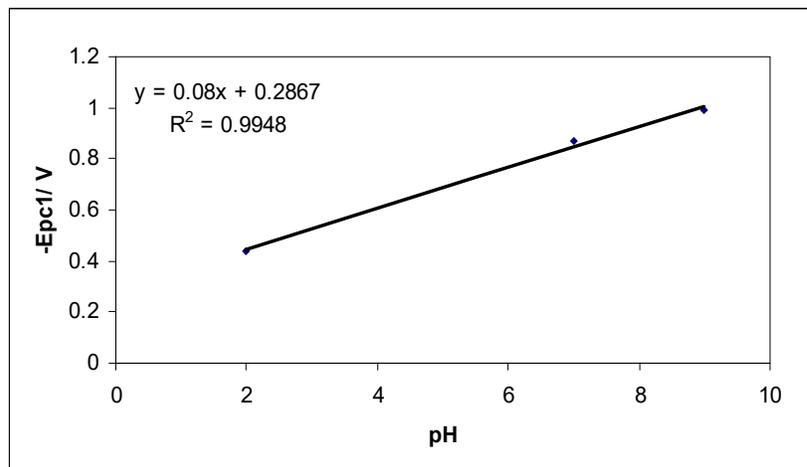
En la figura 17 también se observa que la variación del potencial de reducción en la cupla I_c es mayor entre las medidas a pH 2 y pH 7 que en las medidas realizadas entre pH 7 y pH 9.

Esta variación en el potencial de reducción indica que la formación de una determinada especie reducida está directamente relacionada con el medio en el cual se realice la nitro reducción.

La figura 18 muestra la dependencia del potencial del primer pico (E_{pc1}) con el pH. Aquí se aprecia una relación lineal entre el valor de pH y el potencial de pico, con una pendiente de 80 mV.

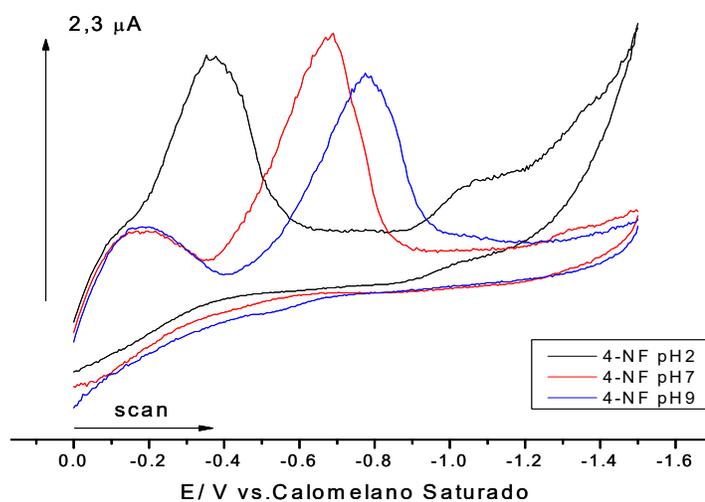
En el mismo orden de ideas, es importante mencionar que los cuatro nitrofuranos estudiados en medio mixto presentaron dos cuplas de reducción a pH 2 con potenciales comparables; sin embargo en los derivados 3-NF y 4-NF no se observó una desplazamiento significativo en el potencial de reducción en cada medida de pH (en comparación a los derivados 1-NF y 2-NF).

Figura 18: Variación del Potencial de Pico (E_{pc1}) para el primer pico en medio ácido. $C^{\circ}=1\text{mM}$, $v = 2\text{V/s}$.



La figura 19 muestra la evolución del voltamograma cíclico para los derivados mencionados, en ella es posible observar que la cupla I_{lc} desaparece al incrementar el pH del medio, al igual que en el caso anterior. Sin embargo, el potencial catódico de la cupla I_{lc} varía de manera menos abrupta (I_{lc}/-0.37 V-pH 2, -0.66 V-pH 7 y -0.77 V-pH 9 vs. SCE), manteniendo una relación de dependencia lineal entre la acidez y el potencial de reducción. El comportamiento electroquímico observado señala que la conformación estructural contribuye de manera significativa en la reducción del grupo nitro, ya que estos derivados generan intermediarios que son más estables ante los cambios de pH, además entregan la acidez necesaria para obtener el derivado hidroxilado, con mayor facilidad, es decir a potenciales menos negativos que los observados para los nitrofuranos 1-NF y 2-NF.

Figura 19: Voltamograma cíclico para el derivado 4-NF. Velocidad de barrido de potencial 2V/s, en medio mixto a pH 2, 7 y 9 y 0.1M PTBA.

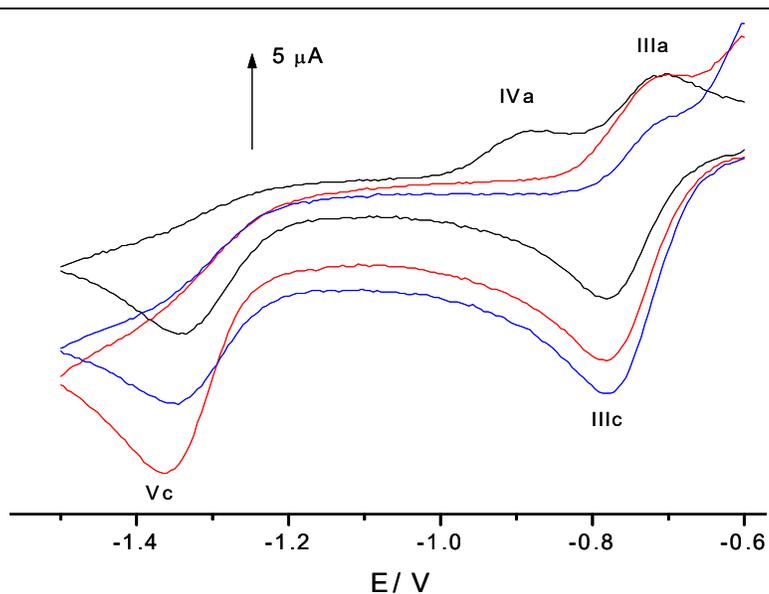


En la figura 19, además se observa una señal de reducción no asignada cercana a $-0,2$ V vs. SCE, esta señal corresponde a la reducción del electrolito soporte empleado en medio mixto (KCl 0.1 M).

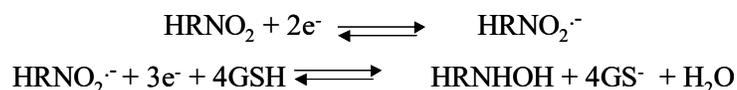
3.1.3 Reactividad de los radicales nitro aniónicos generados electroquímicamente a partir de nitrofuranos, frente a Glutación (GSH)

Con el fin de evaluar la capacidad que poseen estos nitro anión radicales para reaccionar frente a un antioxidante natural como glutación (GSH), el cual se encuentra en alta concentración en sistemas *in vivo* ($\approx 1\text{mM}$). Se procedió a estudiar la reactividad del radical nitro anión frente a glutación empleando la técnica de voltamperometría cíclica

Figura 20: Voltamograma cíclico para el derivado 1-NF frente a GSH, velocidad de barrido de potencial 2V/s.



Aquí se observó cómo evolucionaban los voltamogramas a medida que se incrementaba la concentración de GSH (c.a. 0.1 M en DMSO). Todos los derivados mostraron un comportamiento similar en este experimento. La figura 20 muestra el comportamiento del derivado 1-NF en medio aprótico, en ausencia y presencia de GSH. Se observa que los dos picos catódicos (IIIc y Vc) se incrementan significativamente, mientras que el pico anódico, IVa, desaparece y el pico anódico IIIa decrece significativamente. Este comportamiento se relaciona con la acidez de GSH, e indica que éste reacciona con la especie nitro anión radical (HRNO_2^-), interviniendo en el equilibrio acido-base y evitando el proceso de autoprotónación. Esto último se concluye a raíz de la desaparición del pico anódico, IVa, cuando es usado 0.5 mM de GSH (ver figura 20). Además, el incremento en el pico catódico, Vc, en presencia de GSH podría explicarse pues este antioxidante proporciona los protones necesarios para que el nitro compuesto se reduzca y forme la hidroxilamina (Esquema 3).



Esquema 3: Reactividad de nitrofuranos frente a GSH. Velocidad de barrido de potencial 2 V/s.

La señal redox de GSH no interfiere con la detección del nitro anión radical en todo el rango de concentración usado para este experimento.

Finalmente, considerar que en un sistema biológico con altos niveles de concentración de tioles, esta reactividad del nitro anión radical con GSH podría afectar, en parte, su actividad contra *T. cruzi*.

3.2 Nitroindazoles

3.2.1 Medio aprótico

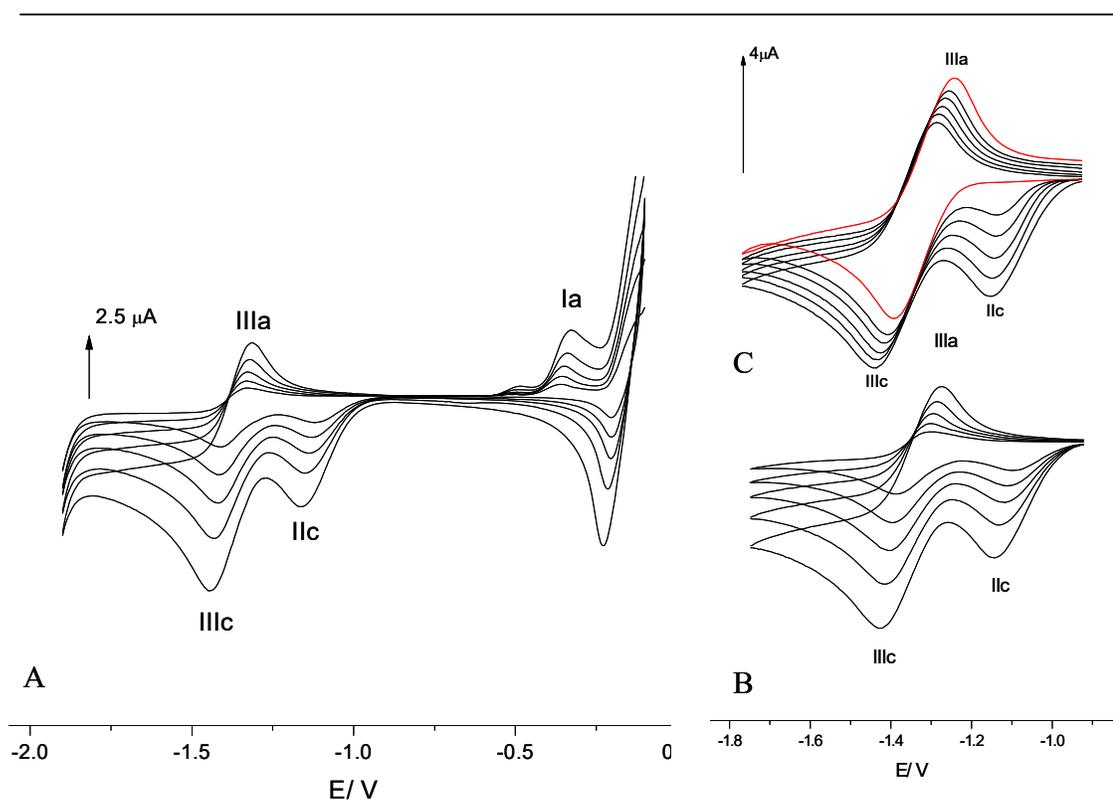
Del mismo modo descrito previamente para los nitrofuranos se procedió al estudio de los derivados 5-nitroindazólicos, empleando la técnica de voltamperometría cíclica. En este estudio se han considerado diez compuestos, donde es posible apreciar un comportamiento electroquímico comparable entre aquellas moléculas que pertenecen a una respectiva estructura base, ya sea derivados de 5-nitroindazol (estructuras tipo A) o 5-nitroindazolinonas (estructuras tipo B). La estructura base tipo A considera a los derivados 1-NI, 2-NI, 3-NI, 4-NI, 5-NI y 10-NI, mientras que la estructura base B a los derivados 6-NI, 7-NI, 8-NI y 9-NI (ver figura 10).

Se procede al estudio del comportamiento de los derivados tipo A en medio no acuoso, para ello se ha utilizado DMSO (dimetilsulfóxido) y DMF (dimetilformamida) como disolventes y 0.1 M PTBA (Perclorato de tetrabutilamonio) como electrolito soporte.

Los seis nitroindazoles mencionados han mostrado un comportamiento electroquímico comparable bajo las condiciones electroquímicas descritas anteriormente.

La figura 21 muestra el voltamograma cíclico característico para los derivados de estructura tipo A. El rango de barrido empleado fue desde 0 a -2 V en el barrido de ida y de -2 a 0 V en el barrido de vuelta (figura 21 (A)). Las velocidades de barrido empleadas van desde los 2 V/s hasta 0.1 V/s.

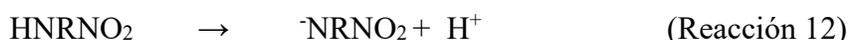
Figura 21: Voltamograma cíclico de 1-NI, en DMSO y 0.1M PTBA.



A. Voltamograma cíclico usando un rango de barrido de potencial completo entre -2 y 0 V y velocidades de barrido entre 0.1 y 2.0 V/s. **B.** Voltamograma cíclico usando un rango de potencial acotado entre -1.8 y -0.9 V y velocidades de barrido de entre 0.1 y 2.0 V/s. **C.** Voltamograma cíclico usando una velocidad de 2.0 V/s: (i) la primera línea negra, muestra al derivado 1-NI sin NaOH; (ii) la línea roja, muestra al derivado 1-NI en presencia de NaOH 30 mM.

En la figura 21, además, se observan dos señales de reducción bien definidas, un pico a potenciales menos negativos asignado como IIc y una cupla denominada IIIc/IIIa a potenciales más negativos. Además se observa una señal de oxidación aislada denominada Ia.

De los experimentos anteriores se deduce que el primer pico catódico irreversible (IIc) cercano a -1.1 V se debe a la reducción de una especie con carácter ácido la cual desaparece al alcalinizar el medio (figura 21 (C)) y que se explica de acuerdo al siguiente equilibrio:



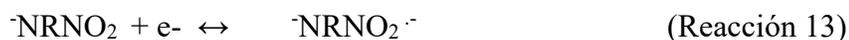
Donde la especie HNRNO_2 corresponde a los derivados de indazol que poseen un hidrógeno lábil en su estructura y la especie NRNO_2^- al nitro anión generado como resultado de la cesión del H proveniente de la especie débilmente ácido, unido al N1.

En consecuencia la especie que se reduce generando el primer pico corresponde al compuesto 1-NI en cambio la especie que se reduce generando el segundo pico corresponde a la reducción del nitro anión.

La generación de este tipo de especies estables tipo nitro anión ha sido también descrita previamente en esta tesis para la familia de nitrofuranos con hidrógenos lábiles en su estructura, además ha sido también reportada para otro tipo de heterociclos de nitrógeno como derivados dihidropiridínicos y derivados imidazólicos (64).

En este caso la reducción de la especie nitro anión del 1-NI se reduce a potenciales casi 500 mV más negativos indicando que el centro de carga negativo del nitro anión está muy cercano al sitio de entrada del electrón para la reducción, lo que explica la considerable mayor dificultad que implica la reducción del nitro anión.

De esta manera el primer pico se podría representar como causado por la anterior reacción 12 y el segundo pico (cupla IIIc/IIIa) asignado a la siguiente reducción electroquímica:



Donde el nitro anión del 1-NI se reduce al correspondiente dianión radical (-1.43 V), el cual se oxida en el barrido de vuelta en un proceso cuasi-reversible, generando la cupla IIIc/IIIa.

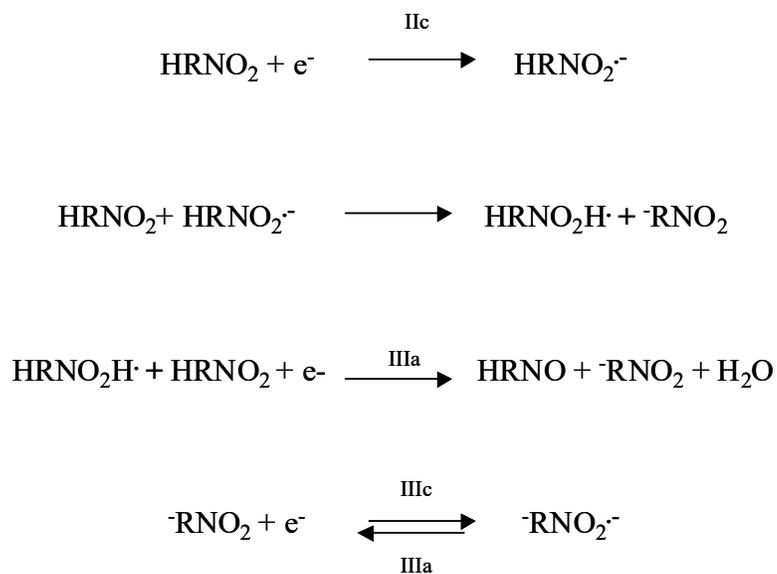
En el caso del anión radical formado en el primer pico, de acuerdo a la anterior reacción 13, éste tiene un carácter suficientemente básico como para interactuar con el 1-NI original deprotonándolo para generar el radical protonado y el correspondiente nitro anión de acuerdo a la siguiente reacción de autoprototonación:



La ocurrencia de la reacción de autoprototonación explica que no se observe un pico de vuelta en la señal IIc ya que la especie generada en vez de oxidarse reacciona más fácil con el reactivo inicial. Además, la ocurrencia de esta reacción es fácilmente probable, ya que la existencia de ella implica que la generación de la especie HNRNO_2^- lleva asociada el consumo del reactivo inicial HNRNO_2 .

No obstante lo anterior, la reacción 14 todavía no da cuenta del proceso electroquímico total, ya que considera una especie inestable como el producto de reacción ($\text{HNRNO}_2\text{H}\cdot$) y no explica la aparición del pico de oxidación que aparece en la zona de potenciales cercanos a -0.4 V (ver figura 21 (A)). De acuerdo a la evidencia anterior atinente a la reducción de derivados nitro, se puede asegurar que el dicho pico de oxidación corresponde a la oxidación de un derivado hidroxilamínico para producir el derivado nitroso (117, 145). En definitiva, el mecanismo de reducción total, debe dar cuenta de la generación de tanto el derivado hidroxilamínico como del nitro anión entre los productos de la reacción total, para lo cual se pueden considerar las siguientes etapas (figura 22):

Figura 22: Mecanismo de reducción propuesto para 5-nitroindazoles



Para confirmar el mecanismo de autoprotónación propuesto para los derivados de la forma de hidrocarburos A, se observó la evolución de los voltamogramas cíclicos al adicionar cantidades crecientes de NaOH (0.1M) desde 0 hasta 30 mM. La figura 21 (C) muestra el voltamograma obtenido para el derivado 1-NI, en presencia de diferentes cantidades de base y una velocidad de barrido de potencial constante de 2 V/s.

En ella es posible visualizar como la señal IIc decrece en intensidad de corriente hasta desaparecer a medida que aumenta la concentración de NaOH en la celda, esto podría relacionarse con la formación de la especie OH-RNO₂H, la cual al reducirse toma, además del electrón necesario, hidrógenos del compuesto original, lo cuales son consumidos por completo al adicionar la base. Como consecuencia dicha especie ya no se forma y por tanto la señal catódica desaparece.

Al estimar la razón entre las corrientes usando la ecuación de Nicholson (125, 144), se encuentra que esta relación aumenta hasta alcanzar el valor de 1, con la adición de NaOH, empleando una velocidad de barrido de potencial de 2 V/s (figura no mostrada), indicando que el sistema tiende a ser reversible.

Para evaluar la estabilidad del intermediario radicalario se efectuaron modificaciones en las condiciones electroquímicas, entre ellas la velocidad de barrido, manteniendo el resto de las condiciones inalteradas. El cociente de intensidades i_{pa}/i_{pc} fue calculado para la cupla IIIc/IIIa, el cual se incrementa, para el compuesto 1-NI al incrementar la velocidad de barrido de potencial (ver figura 23), un típico comportamiento de una transferencia de carga cuasi-reversible, el cual tiene asociado un proceso químico (125).

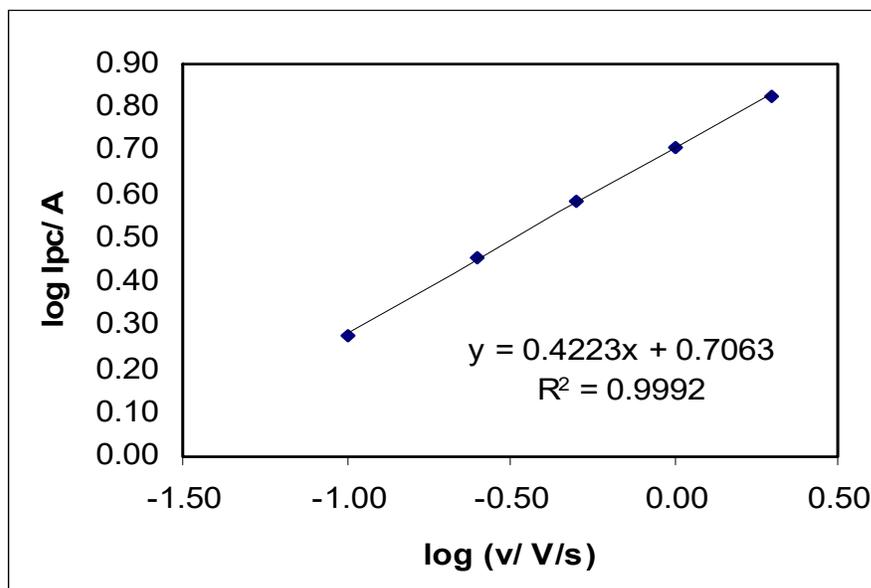
Todos los nitroindazoles pertenecientes a la forma estructural A presentaron valores de i_{pa}/i_{pc} menores a la unidad, excepto el derivado 10-NI que presenta un índice igual a 1 (Tabla 3). El resultado encontrado implica que la reducción monoelectrónica del derivado 1-NI, no corresponde a un proceso reversible ya que no se obtiene una razón de corriente igual a 1, a todas las velocidades analizadas. Por el contrario, los resultados encontrados implican que el anión radical nitro producido en el barrido catódico de ida no se oxida por completo en el barrido anódico de vuelta, generando valores de razones de corriente diferentes de 1.

Además todos los derivados muestran un ΔE que difiere de 60 mV. Este resultado nos hace descartar la aparente reversibilidad de dicha onda ya que en realidad la transferencia electrónica involucrada obedecería a un proceso cuasi-reversible.

A los nitroindazoles estudiados también se les evaluó la dependencia de la intensidad de corriente de pico catódico (I_{pc}) respecto de la velocidad de barrido de potencial, con el fin de apreciar si las señales voltométricas obtenidas eran derivadas de procesos difusionales o provenían de procesos de absorción ocurridos en la superficie del electrodo de trabajo.

La Figura 23, muestra una dependencia lineal del logaritmo de la intensidad de pico catódico con el logaritmo de la velocidad de barrido de potencial, obteniéndose un valor absoluto para la pendiente de 0,4223 V. Este valor, nos indica que el proceso está regido por difusión; ya que se encuentra próximo al valor teórico de 0,5 V.

Figura 23: Relación de corriente ($\log i_{pc}/(A)$) en función de la velocidad de barrido de potencial ($\log v/(V/s)$) para el derivado 1-NI



Los nitroindazoles que corresponden a la estructura base tipo B, derivados 6-NI, 7-NI, 8-NI y 9-NI, fueron estudiados en las mismas condiciones voltamperométricas que las usadas para los compuestos de forma A. Los cuatro derivados muestran un comportamiento electroquímico comparable entre ellas y con las moléculas de tipo A, bajo las condiciones electroquímicas descritas anteriormente, además de una respuesta diferente respecto de los sustituyentes presentes en el anillo.

Si bien todos los nitroindazoles estudiados se reducen a potenciales similares, los derivados 6-NI y 8-NI son los que poseen los menores potenciales de reducción y por tanto dentro de la familia de indazoles son los que se reducirán más fácilmente.

Los compuestos de la forma B también cuentan con hidrógenos lábiles en su estructura, sin embargo no muestran la señal anódica, asignada como Ia para los derivados de forma A. A pesar de esta diferencia los derivados concuerdan con el pico de reducción IIc y la cupla cuasi-reversible IIIc/IIIa.

La ausencia de esta señal anódica podría deberse a que los hidrógenos lábiles de los compuestos de tipo B poseen una menor acidez, ya que pueden ser más fuertemente retenidos debido a la capacidad del grupo carbonilo para actuar como electro-aceptor de electrones evitando que el intermediario (radical protonado) pierda electrones para así oxidarse. De este modo, el compuesto original no posee la suficiente basicidad para tomar el protón de la especie radical protonada generada en IIc y formar el nitroso derivado, es decir la difícil disponibilidad de protones tanto de la molécula como del medio evitan la formación del nitroso derivado y por tanto de la señal Ia.

Al igual que lo expuesto para los derivados nitrofuranos, esta familia de nitrocompuestos se reduce formando el anión radical nitro, el cual lleva a cabo una reacción química que consume al radical, impidiendo que éste se oxide en forma cuantitativa en el barrido de vuelta. En este sentido, la especie nitro anión radical generada electroquímicamente podría permitir dos tipos de reacciones diferentes de decaimiento, desproporción o dimerización (84, 115, 146).

Considerando que la reacción de dimerización es la vía de descomposición del radical en medio aprótico, se procedió a evaluar la estabilidad de las especies nitro anión radicales empleando el procedimiento descrito por Olmstead y Nicholson (146). A partir de los voltamperogramas cíclicos se obtuvo la constante cinética de segundo orden, dimerización (k_d). Esta k_d da cuenta de que tan rápido decaerá el radical, en medio aprótico, a través de un mecanismo de dimerización.

La tabla 3 muestra las k_d obtenidas para cada uno de los nitroindazoles estudiados incluido Nifurtimox. Todos los valores de k_d calculados para los nitroindazoles se aprecian comparables entre sí y menores al valor calculado para Nifurtimox, excepto para el derivado 4-NI. Entre los más estables encontramos a los derivados 3-NI, 7-NI y 10-NI, con valores numéricos de k_d de $7,21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $2,28 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $4,12 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y tiempos de vida media, $t_{1/2}$, de 0.18 s, 0.44 s y 2.43 s respectivamente.

Tabla 3: Parámetros voltamperométricos correspondientes a la reducción del grupo nitro de los nitroindazoles derivados, para la cupla IIIc/IIIa vs. electrodo de calomelano saturado en DMSO

Compuestos	E_{PCIII} (V)*	$E_{1/2}$	ΔE (V)	ipa/ipc	k_d ($M^{-1} s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (s)	E^1_7 (V)**	k_{O_2} ($M^{-1} s^{-1}$)
1-NI	-1.43	-1.35	0.16	0.65	7.21E+04	1.39E-02	-0.74	2.43E+09
2-NI	-1.42	-1.36	0.12	0.69	3.85E+04	2.60E-02	-0.73	2.05E+09
3-NI	-1.43	-1.38	0.11	0.67	5.62E+03	1.78E-01	-0.74	2.43E+09
4-NI	-1.47	-1.40	0.14	0.56	1.16E+05	8.59E-03	-0.78	4.78E+09
5-NI	-1.38	-1.29	0.19	0.59	2.40E+04	4.16E-02	-0.71	1.04E+09
6-NI	-1.13	-1.04	0.18	0.99	3.01E+03	3.32E-01	-0.48	1.50E+07
7-NI	-1.57	-1.51	0.13	0.78	2.28E+03	4.38E-01	-0.86	2.60E+10
8-NI	-1.13	-1.04	0.18	0.99	3.01E+03	3.32E-01	-0.48	1.50E+07
9-NI	-1.56	-1.49	0.14	0.62	6.87E+04	1.46E-02	-0.84	2.20E+10
10-NI	-1.13	-1.08	0.10	1.00	4.12E+02	2.43E+00	-0.48	1.50E+07
Nfx	-0.91	-0.88	0.06	1.01	7.23E+04	1.38E-02	-0.29	1.69E+02
Bnz ^a	-1.02						-0.36	3.31E+03
Metronidazol ^a	-1.16						-0.48	3.37E+05

* solvente DMSO

** solvente DMF

a (150, 87)

Si se compara los valores de E_{pc} entre los derivados de la forma A, los compuestos 5-NI y 10-NI presentan los valores más bajos, por tanto serían más fácilmente reducibles y contarían con una mejor capacidad para generar especies radicalarias, donde los sustituyentes del anillo indazol juegan un rol fundamental.

A pesar de presentar potenciales de reducción muy superiores a los encontrados para la familia de nitrofuranos, la sustitución con grupos dadores de carga como el metilo ($-CH_3$) y grupos con una alta densidad electrónica (fenilo y piridina) provocan que la densidad electrónica en el anillo disminuya, facilitando la reducción del grupo 5-nitroindazol.

La tabla 3 también muestra que estos derivados se reducen a potenciales de onda media, $E_{1/2}$, mayores que los obtenidos para la primera cupla de reducción de Nifurtimox (-0,91 V), por lo cual necesitan mayor energía para reducirse. Este hecho podría afectar su actividad biológica, si el mecanismo de acción que presentan estos derivados es asociado a un reciclaje redox.

Empleando la técnica de voltamperometría cíclica en DMF, se evaluó la capacidad antiparasitaria que presenta esta familia de nitroindazoles empleando la relación con la capacidad que tengan éstos para reducirse en sistema biológico (87). Del mismo modo descrito para los derivados nitrofuranos se procedió a calcular el valor de dos parámetros de significancia biológica E^1_7 y k_{O_2} (148).

La tabla 3 lista los valores calculados para E^1_7 y k_{O_2} , en ella se puede apreciar que todos los derivados de indazol estudiados presentan potenciales de reducción superiores a los calculados para Nifurtimox y Benznidazol, indicando que éstos serían menos favorables para reducirse por una enzima nitro reductasa.

Sin embargo, algunos de los derivados estudiados en esta tesis presentan potenciales E^1_7 similares a los calculados para Metronidazol (fármaco alternativo para el tratamiento de *T. cruzi*), el cual se ha reportado previamente como capaz de ser reducido por la enzima reductasa P-450 dependiente de NADPH. Este hecho indica, que los derivados de indazol podrían ser reducidos por una enzima de éstas características.

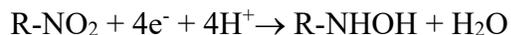
Por otra parte la constante de equilibrio calculada, k_{O_2} , indicaría que todos los compuestos evaluados son capaces de generar un ciclo redox con la correspondiente formación de superóxido. Así, los derivados de indazol estudiados al presentar una constante de formación $k_{O_2} \gg 1$ el equilibrio de la reacción 11 estaría desplazado hacia la formación de superóxido (148).

También es importante mencionar que otros antecedentes han reportado que la producción de superóxido mediada por el ciclo redox de diversos xenobióticos en medio biológico, es dependiente de su potencial de reducción, donde los compuestos que presentaran potenciales $E^{17} < -400\text{mV}$ no presentarían una generación significativa de superóxido (148). Por lo tanto, al comparar los resultados de nuestro estudio con los citados anteriormente, podemos deducir que los derivados de indazol estudiados en esta tesis, no serían capaces de producir superóxido mediante un ciclo redox bajo condiciones similares a las del estudio mencionado, ya que los valores de potenciales E^{17} obtenidos se encuentran por debajo de los -400 mV (-484 y -862 mV). Los antecedentes descritos anteriormente no revelan de manera fidedigna si estas especies son o no capaces de generar especies reactivas de oxígeno en medio biológico, puesto que ambos antecedentes se contradicen entre sí, sin embargo empleando la técnica espectroscópica de spin trapping se intentará dar respuesta concreta a la interrogante de que si estas especies derivadas de nitroindazol con potenciales de reducción tan elevados son o no factibles de ser reducidos por una enzima reductasa en condiciones biológicas normales.

3.2.2 Medio Mixto

El estudio del comportamiento electroquímico de la familia derivada de nitroindazol en medio mixto se llevó a cabo en una mezcla DMF:Buffer citrato, relación 30:70, ajustadas a pH 2, 7 y 9; empleando una concentración de nitro derivado de 1×10^{-3} M y 0.1 M de KCl como electrolito soporte. La evolución de los voltamogramas, para estos derivados, respecto del pH muestra un comportamiento análogo al encontrado en la familia de nitrofuranos. A una mayor acidez (pH 2) se observan dos picos de reducción irreversibles ($-0,36$ V/Ic y -1.04 V/IIc). Al aumenta el valor de pH la señal IIc, comienza a desaparecer, mientras que la señal Ic comienza a desplazarse hacia potenciales más negativos, registrando a pH 7 un potencial de pico catódico de -0.69 V y a pH 9 uno de -0.77 V. Así, la primera señal Ic, podría corresponder a la reducción electroquímica del grupo nitro ($R-NO_2$) con la consecuente formación de la hidroxilamina derivada ($R-NHOH$), vía la transferencia de 4 electrones. Dicha especie se encuentra favorecida a pH ácido ya que cuenta con los protones necesarios para generar la protonación del grupo nitro a potenciales menos negativos que los observados en medio aprótico.

La cupla IIc, podría asignarse a la formación de la amina derivada ($R-NH_2$) a través de la reducción de la hidroxilamina protonada ($R-NHOH_2^+$) y la transferencia de 2 electrones según lo muestra el esquema de reducción propuesto.



Esquema 4: Mecanismo de reducción propuesto para nitroindazoles derivados en medio mixto a pH 2.

Del mismo modo descrito previamente, se procedió a evaluar la dependencia del potencial del primer pico (E_{pc1}) con el valor de pH. Aquí se aprecia una relación lineal entre el valor de pH y el potencial de pico, con una pendiente de 55 mV.

3.2.3 Reactividad de los radicales nitro aniónicos generados electroquímicamente a partir de nitroindazoles, frente a Glutación (GSH)

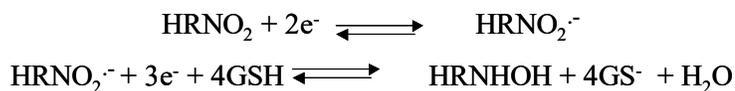
Con el fin de evaluar la capacidad que poseen estos nitro anión radicales para reaccionar frente a un antioxidante natural como glutación (GSH). Se procedió a estudiar la reactividad del radical nitro anión frente a glutación empleando la técnica de voltamperometría cíclica. Así como se describió para los nitrofuranos, los derivados de indazol fueron testeados frente al incremento en la concentración de GSH (c.a. 0.1 M en DMSO), manteniendo la velocidad de barrido de potencial constante a 2 V/s.

Todos los derivados mostraron un comportamiento similar en este experimento y análogo al encontrado para nitrofuranos (ver figura 20).

El comportamiento de estos derivados en medio aprótico y presencia de GSH muestra que los dos picos catódicos (IIc y IIIc) se incrementan significativamente, mientras que el pico anódico, IIIa decrece significativamente (figura no mostrada).

Este comportamiento se relaciona con la acidez de GSH, e indica que éste reacciona con la especie nitro anión radical (HRNO_2^-), interviniendo en el mecanismo de reducción de estos nitroderivados.

Esto último se concluye a raíz del decrecimiento del pico anódico, IIIa, cuando es usado 0.5 mM de GSH. Además, el incremento en el pico catódico, IIIc, en presencia de GSH podría explicarse pues este antioxidante proporciona los protones necesarios para que el nitro compuesto se reduzca y forme la hidroxilamina (Esquema 5).



Esquema 5: Reactividad de nitroindazoles frente a GSH. Velocidad de barrido de potencial 2 V/s.

Este comportamiento indica que GSH oxida rápidamente la especie reducida (R-NO_2^-), formando nuevamente la especie neutra (R-NO_2) sin lograr observar el proceso inverso de oxidación (ausencia cupla IIIa) de las especies en los voltamogramas, ya que el proceso mediante el cual GSH reacciona con R-NO_2^- es más rápido que la oxidación electroquímica de la misma. GSH se comporta como un agente pro-oxidante y reactivo

tanto con la especie reducida ($R\text{-NO}_2^-$) como con la especie reducida hidroxilada ($R\text{-NHOH}$) obtenida luego del proceso de autoprotónación), donde la intensidad de pico catódico IIc y IIIc se ven significativamente incrementados.

La señal redox de GSH no interfiere con la detección del nitro anión radical en todo el rango de concentración usado para este experimento. Finalmente, considerar que en un sistema biológico con altos niveles de concentración de tioles, esta reactividad del nitro anión radical con GSH podría afectar, en parte, su actividad contra *T. cruzi*.

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de Resonancia de Espín Electrónico y de Simulación

La Resonancia de Espín Electrónico es una técnica espectroscópica ampliamente utilizada para detectar y caracterizar directamente radicales libres. Este método proporciona una medida de la distribución de densidad de espín en la especie radical.

La interpretación del espectro REE suele ser compleja, debido al gran número de líneas presentes en ellos. Para solucionar esta problemática son utilizadas diversas metodologías adicionales. Una de ellas es la utilización de software que permiten la interpretación de los espectros de REE, a través de la obtención de las constantes de acoplamiento híperfinas (hfcc).

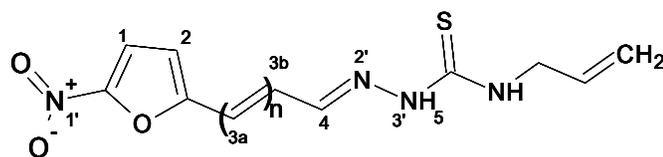
3.3 Generación electroquímica de radicales libres

3.3.1 Nitrofuranos

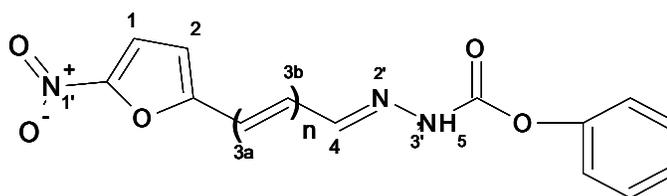
Para obtener las especies radicales y caracterizarlas mediante REE se trabajó un método de reducción electroquímica *in situ* empleando las mismas condiciones usadas para VC en DMSO. Aplicando el potencial de reducción encontrado para la señal IIIc. La interpretación de los espectros obtenidos se realizó a través de la simulación de éstos empleando el programa WINEPR Simfonia.

Los REE fueron simulados con una precisión de $\pm 0.05\text{G}$, usando las constantes de acoplamiento hiperfinas (hfcc) obtenidas experimentalmente, en él se modificando ciertos parámetros como el ancho de línea, la modulación de la amplitud o la relación Lorenziana/Gaussiana con el fin reproducir de mejor manera los espectros experimentales. La figura 24 muestra la nomenclatura que se utilizó para identificar los núcleos de los cuatro nitrofuranos.

Figura 24: Estructuras Nitrofuranos derivados ($n=0$ y $n=1$)



Nitrofuranos de tiosemicarbazona



Nitrofuranos de carbamato

Los cuatro nitrofuranos estudiados presentaron patrones hiperfinos diferentes (ver figuras 25-28), los cuales se presentan y analizan a continuación. Las figuras 25-28 muestran el espectro simulado (A) y el espectro experimental (B), respectivamente, para el radical nitro aniónico proveniente de los derivados 1, 2, 3 y 4-NF.

La figura 25 (B) representa el espectro REE experimental en DMSO del radical 1-NF. En él se observa un patrón hiperfino de 25 líneas. Este patrón representa principalmente un fenómeno influenciado por una gran deslocalización del electrón desapareado a través del anillo y la cadena lateral.

La figura 25 (A) muestra la simulación del espectro del radical 1-NF. La simulación realizada para este derivado concuerda bastante bien con el espectro experimental observado. Esta simulación se realizó considerando tres tripletes provenientes de los nitrógenos N_1' , N_2' y N_3' , donde N_1' corresponde al nitrógeno del grupo nitro, N_2' y N_3' a los nitrógenos de la cadena, los cuales se encuentran directamente enlazados, además de cinco dobletes, dos de ellos pertenecientes al H_1 y H_2 del anillo, los restantes asignados a los hidrógenos H_4 , H_5 y H_6 de la cadena lateral.

Un patrón hiperfino similar es mostrado en el derivado 2-NF (figura 26), en él se observa un espectro de 25 líneas (ver figura 26 (B)), menos resuelto que el exhibido para el derivado nitrotiosemicarbazona de cadena corta (1-NF ($n=0$)).

La figura 26 (A) muestra el espectro simulado para el radical 2-NF en cuanto a tres tripletes correspondiente a los átomos de nitrógeno N_1' , N_2' y N_3' descritos anteriormente y seis dobletes pertenecientes a los hidrógenos H_1 y H_2 del anillo y $H_{3a,b}$, H_4 y H_5 pertenecientes a la cadena de tiosemicarbazona (140).

Al igual que para el derivado 1-NF, los REE simulados indican que en la especie radical el electrón desapareado del grupo nitro se encuentra deslocalizado tanto en el anillo nitrofurano como en las cadenas laterales. La Tabla 4 muestra las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas mediante simulación y el valor g de la familia de nitrofuranos.

Figura 25: Espectros REE para el derivado 1-NF. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.

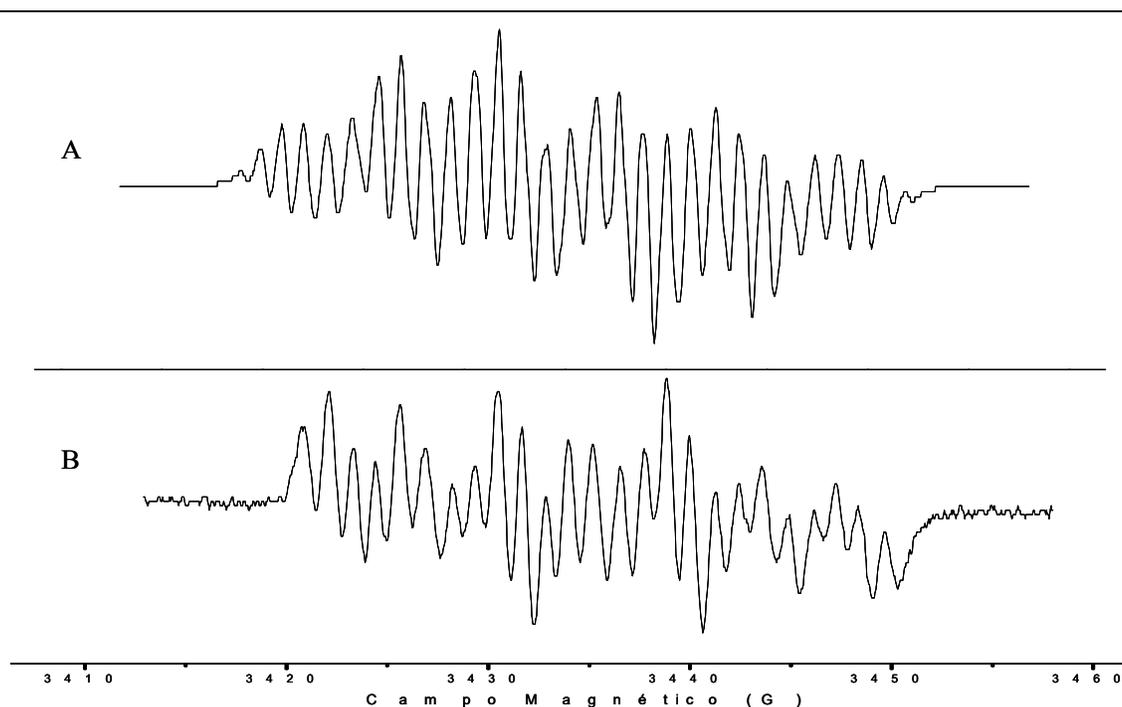


Figura 26: Espectros REE para el derivado 2-NF. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.

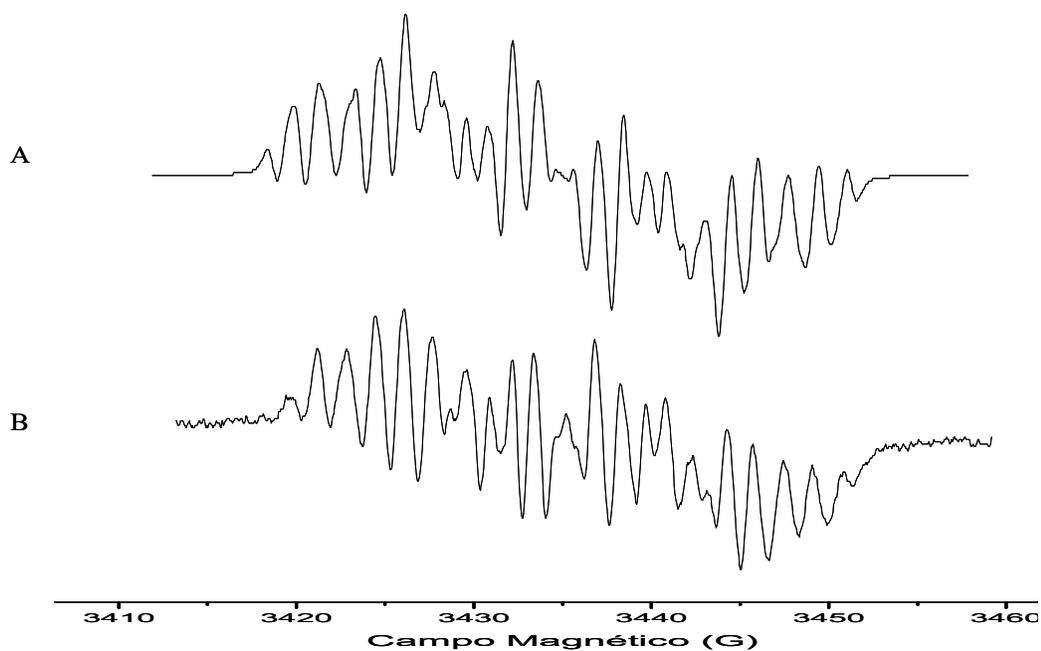
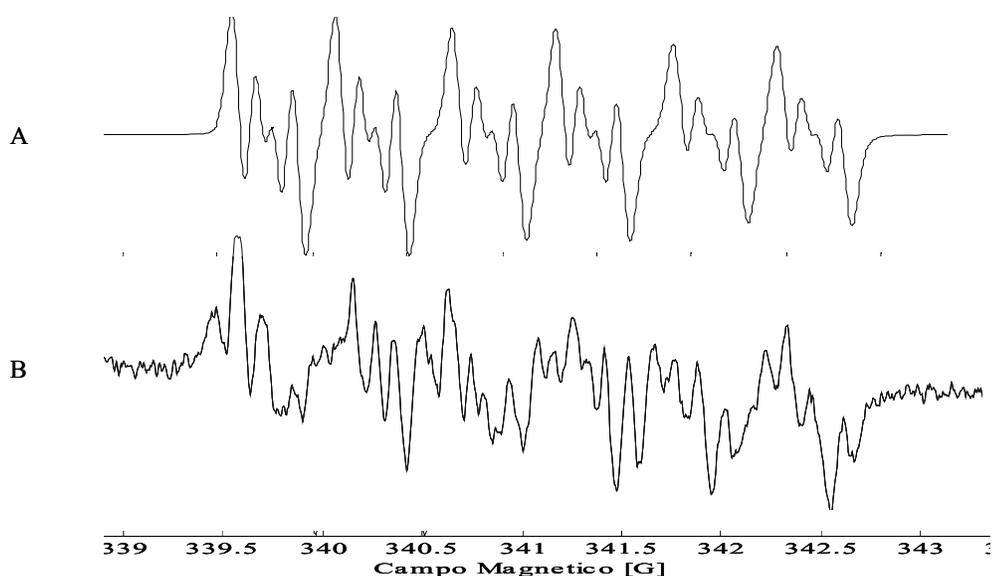


Tabla 4: Constantes de acoplamiento hiperfino y valores g para los nitrofuranos derivados.

Compuesto	$a_{N1'}$	$a_{N2'}$	$a_{N3'}$	a_{H1}	a_{H2}	a_{H3a}	a_{H3b}	a_{H4}	a_{H5}	a_{H6}	g
1-NF	1.54	6.24	1.57	1.08	1.08	4.82	4.84	0.94	2.0165
2-NF	1.54	6.24	1.57	1.08	1.08	4.82	4.82	0.94	0.15	2.0168
3-NF	11.74	0.21	0.21	2.00	1.10	5.50	2.0164
4-NF	4.42	0.78	1.20	1.25	2.71	3.94	0.75	0.30	2.0166

Las figuras 27 y 28 muestran los espectros REE para los derivados nitro con cadenas de carbamato (3-NF y 4-NF). El espectro experimental del derivado 3-NF (ver figura 27 (B)) también presenta un patrón hiperfino propio de la deslocalización electrónica, donde se observa un espectro de 26 líneas

Figura 27: Espectros REE para el derivado 3-NF. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.

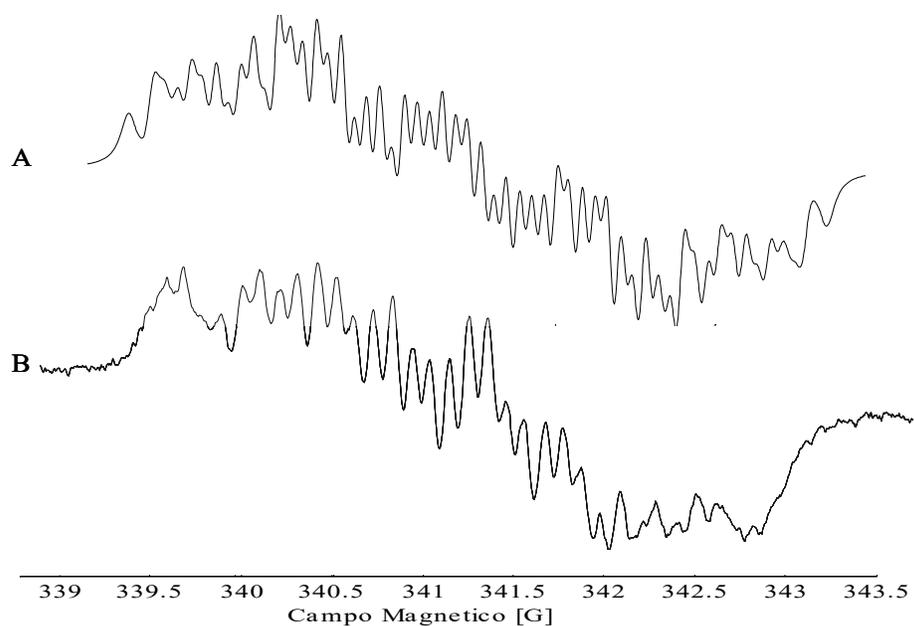


La figura 27 (A) exhibe el espectro simulado para el radical aniónico mencionado. En el análisis de éste se observó una señal patrón de tres tripletes, uno asignado al nitrógeno del grupo nitro N_1' , otro correspondiente al N_2' del grupo imino y un N_3' perteneciente al grupo carbamato. Al igual que los derivados 1-NF y 2-NF, los nitrógenos N_2' y N_3' se encuentran directamente enlazados.

También, se asignaron tres dobletes, dos de ellos para los átomos de H₁ y H₂ del anillo, el tercero H₄ presente en la cadena lateral.

El espectro de la figura 28 (B) muestra un patrón hiperfino complejo para el derivado 4-NF, provisto de 29 líneas.

Figura 28: Espectros REE para el derivado 4-NF. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.



La simulación de éste (figura 28 (A)) se realizó en cuanto a tres tripletes para los nitrógenos N₁' , N₂' y N₃' , además de cinco dobletes provenientes de los átomos de hidrogeno H₁ y H₂ del anillo y a los hidrógenos de la cadena H_{3a,b} y H₄.

En cuanto al valor de las constantes de acoplamiento hiperfinas de hidrógeno (a_H) y nitrógeno (a_N) obtenidas para cada nitro derivado, podemos concluir que para el caso de los nitrofuranos de tiosemicarbazona la a_N mas alta es aquella perteneciente al N_2' del grupo imino, seguida de las a_H de los átomos que se ubican entre el anillo nitrofurano y la imina. Este hecho indica que el electrón desapareado se ubica o centra preferentemente en el N_2' de la cadena.

El análisis de los valores de a_H y a_N de los derivados nitrofurano con cadena de carbamatos, nos muestra que la mayor constante de acoplamiento hiperfina se registra en el N_1' del grupo nitro. Este fenómeno nos indica que el electrón desapareado se ubica principalmente en este grupo. Por lo tanto, la deslocalización del electrón en estos derivados, es menor a la observada para los nitro de tiosemicarbazona. Este hecho radica en las características estructurales de la cadena tiosemicarbazona respecto del grupo carbamato, donde este último presenta una mayor densidad de carga debido a la presencia de los átomos de oxígeno del grupo carbamato y al grupo fenilo enlazado directamente a este. De este modo al electrón desapareado le resulta más complejo deslocalizarse por la cadena y se dispone preferentemente en el grupo nitro.

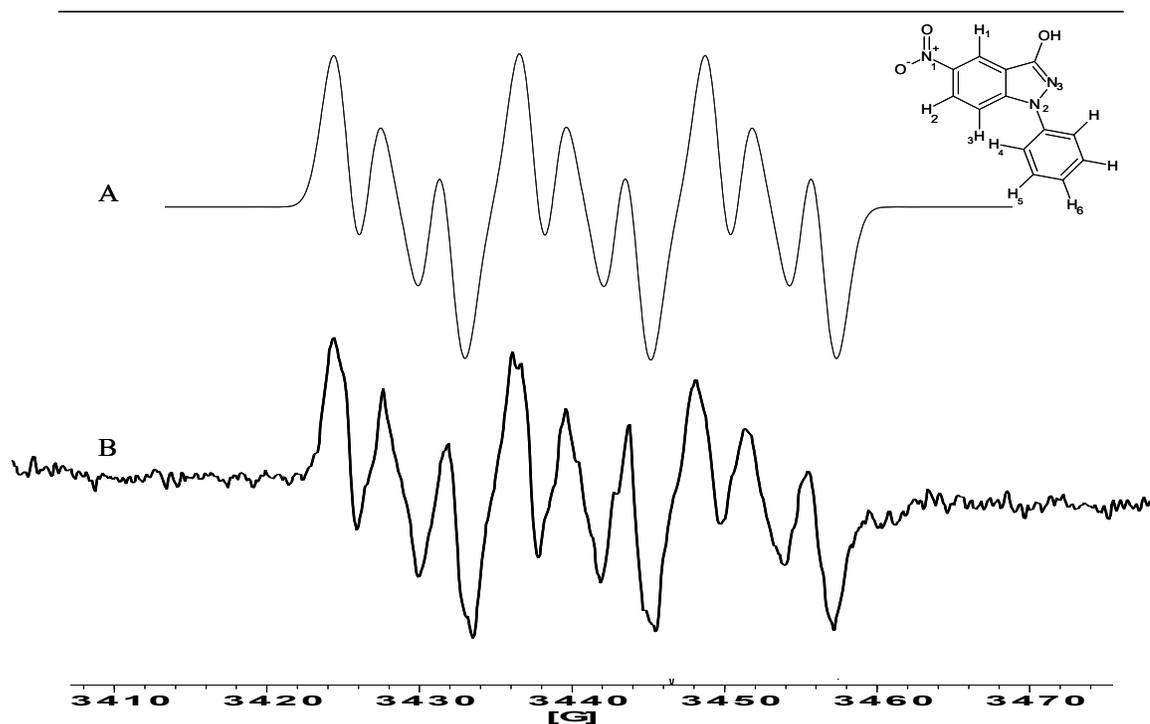
3.3.2. Nitroindazoles

Del mismo modo descrito previamente para la familia de nitrofuranos se procedió al registro experimental de los espectros de resonancia de espín electrónico y su posterior simulación mediante la aplicación del software WINEPR simfonia. La reducción *in situ* fue realizada empleando las mismas condiciones experimentales empleadas en VC. Para esta familia de aplicó el potencial de reducción encontrado para la cupla IIIc/IIIa.

Las simulaciones realizadas con una precisión ± 0.05 G fueron llevadas a cabo modificando las constantes de acoplamiento hiperfinas encontradas experimentalmente, además del ajuste de variables propias del espectro como el ancho de línea y la relación Lorenziana/Gaussiana.

Los diez nitroindazoles estudiados presentaron tres patrones hiperfinos diferentes, los cuales se presentan y analizan a continuación. Cada figura exhibida muestra la estructura del nitro derivado y la asignación de los núcleos respectivos. El primer caso exhibido en la figura 29 muestra un espectro de nueve líneas bien definidas correspondientes a los acoplamientos que se describen a continuación.

Figura 29: Espectros REE para el derivado 5-NI. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.



La figura 29 corresponde al patrón hiperfino del radical nitro aniónico proveniente del derivado 5-NI.

La simulación del espectro del radical 5-NI (fig. 29 (A)) corresponde a un triplete proveniente del nitrógeno del grupo nitro N₁, además de tres dobletes, pertenecientes a los hidrógenos H₁, H₂ y H₃ del anillo indazol. El valor de la constante de acoplamiento del N₁ (a_{N1}) es de $a_{N1}=12.01$ G, correspondiente a un triplete, el que compone principalmente el patrón hiperfino del derivado 5-NI, seguida del doblete del H₁ ($a_{H1}=4.12$ G).

Así, el espectro de nueve líneas observado es debido al desdoblamiento de la señal patrón por los hidrógenos que conforman el anillo indazol. Las constantes de acoplamiento obtenidas también nos permiten establecer la influencia del sustituyente R₁-fenilo enlazado directamente al N₂ del anillo nitroindazol, el cual estaría actuando como un grupo dador de electrones al impedir que el electrón desapareado se distribuya con facilidad entre el anillo indazol y el sustituyente aromático, y por tanto la distribución de la densidad de espín estaría desplazada hacia las cercanías del grupo nitro, hecho que explica los acoplamientos hiperfinos descritos.

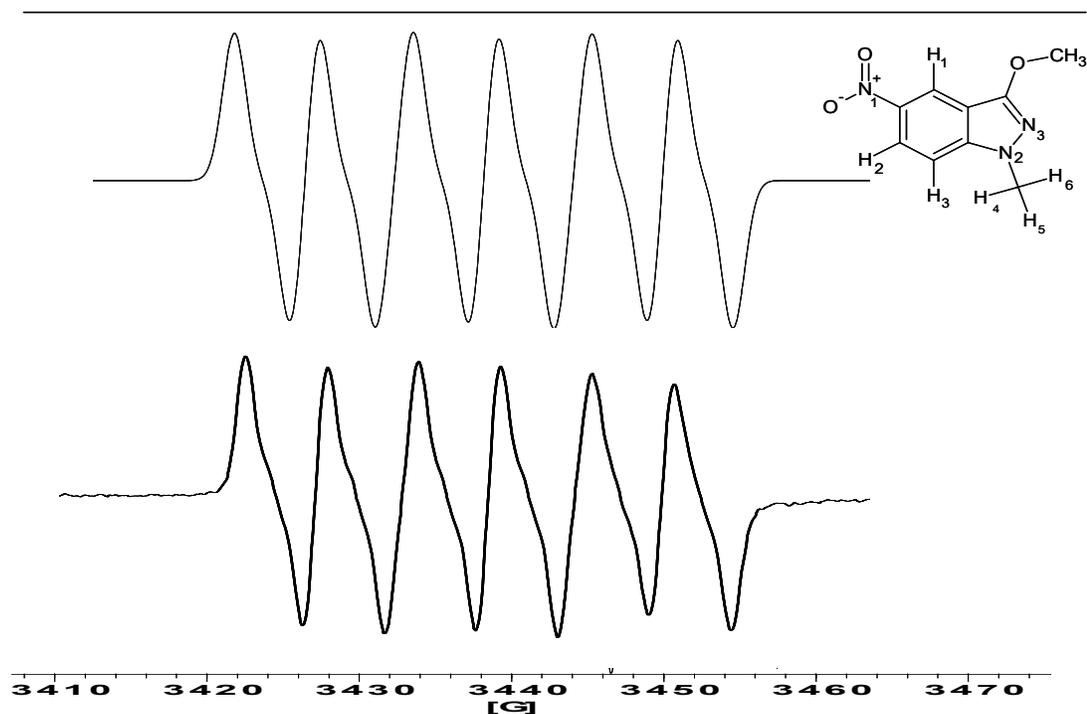
La figura 30 muestra el espectro simulado y el espectro experimental, respectivamente, para el radical nitro aniónico proveniente del derivado 10-NI.

Este espectro y su simulación pueden ser interpretados por dos tipos de desdoblamientos hiperfinos. Un primer patrón hiperfino corresponde a tres tripletes provenientes de los nitrógenos del derivado. Uno de ellos corresponde al N₁ perteneciente al grupo nitro y los otros dos corresponden a los N₂ y N₃ del anillo indazol.

Un segundo patrón hiperfino es atribuido a la interacción del electrón desapareado con un núcleo de hidrogeno H₁, el cual se evidencia como una señal doblete. Al igual que en el caso anterior el valor de a_{N1} es el mayor (a_{N1}=11.30 G), por tanto es el componente principal del patrón hiperfino del derivado 10-NI y el espectro bien resuelto de seis líneas es debido al desdoblamiento del triplete N₁, respecto de los demás núcleos descritos.

Al igual que en el caso anterior la tabla 5 muestra una constante de acoplamiento bastante grande perteneciente al H_1 ($a_{H1}=5.50$ G). Este hecho indica que el desplazamiento del electrón desapareado es preferentemente por la cara superior del anillo indazol, debido a la alta electronegatividad que presenta el átomo de oxígeno perteneciente al grupo metoxi enlazado al carbono del grupo imino del anillo.

Figura 30: Espectros REE para el derivado 10-NI. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.



La figura 31 exhibe el espectro simulado (figura 31 (A)) y experimental (figura 31 (B)) para el derivado 2-NI. En el análisis del espectro del radical 2-NI se observó una señal patrón de dos triplete, uno asignado al nitrógeno del grupo nitro N_1 y otro atribuible al nitrógeno N_2 del anillo indazol, además se asignaron tres dobletes, atribuidos a la

interacción del electrón desapareado con los núcleos de hidrogeno del anillo indazol H₁, H₂ y H₃. El espectro registrado para el derivado 2-NI muestra quince líneas resueltas, nuevamente, al igual que en los dos casos anteriores los mayores valores de constante de acoplamiento obtenidos son para el N₁ ($a_{N1}=11.96$ G) y el H₁ ($a_{H1}=4.63$ G) respectivamente. Este espectro presenta gran similitud con el registrado para el derivado 5-NI, siendo éste menos resuelto que el del derivado 5-NI. Esto podría deberse a una mayor deslocalización del electrón desapareado por la molécula, provocando una mayor interacción con los átomos vecinos.

Finalmente, para todos los casos presentados el átomo de oxígeno presente en los grupos metoxi, ceto e hidroxilo de las formas de nitroindazoles A y B, permiten que la deslocalización preferente de electrón desapareado sea entre el grupo nitro y el hidrógeno situado en la parte superior de anillo. Por otra parte, los sustituyentes R₁ enlazados directamente al nitrógeno N₂ del anillo indazol poseen baja influencia en los patrones hiperfinos registrados, ya que como se observa en tabla 5 que las constantes de acoplamiento son bastante similares entre sí.

Figura 31: Espectros REE para el derivado 2-NI. (A) Espectro simulado. (B) Espectro experimental en DMSO.

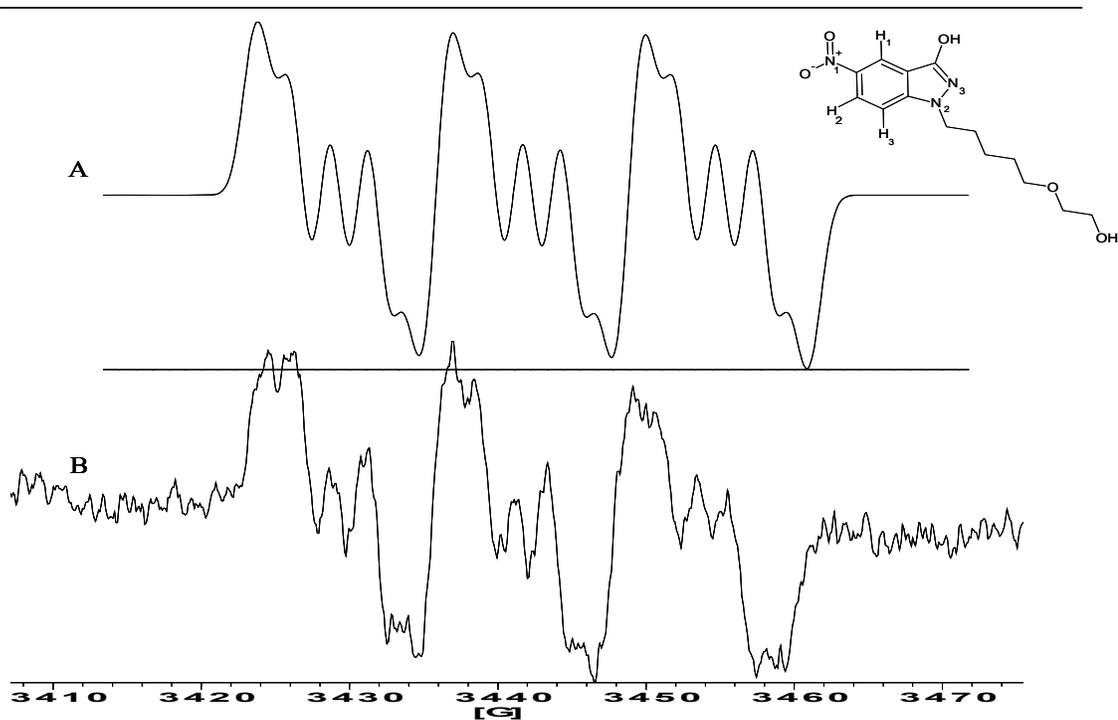


Tabla 5: Constantes de acoplamiento hiperfino y valores g para los nitroindazoles derivados.

Compuesto	a_{N_1}	a_{N_2}	a_{N_3}	a_{H_1}	a_{H_2}	a_{H_3}	g
1NI	11.74	1.08		4.77	2.31	0.71	2.017
2NI	11.96	1.13		4.63	2.41	0.9	2.023
3NI							
4NI							
5NI	12.01			4.12	2.41	0.77	2.022
6NI	11.76	1.25		5.18			2.012
7NI							
8NI	11.01	1.26		5.3			2.019
9NI							
10NI	11.3	0.22	0.22	5.5			2.017

La tabla 5 muestra espacios en blanco, no se registraron espectros REE.

La tabla 5 muestra las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas para los radicales derivados de nitroindazol. Los valores en negrita corresponden a los tres patrones observados para esta familia, además de las constantes calculadas experimentalmente para el resto de los nitroindazoles analizados

3.4 Generación y Detección Microsomal de Radicales Libres

Nitrofuranos y Nitroindazoles

Empleando la Técnica de Spín trapping descrita detalladamente en el Capítulo II se precedió a la detección y caracterización de radicales libres generados en medio biológico, específicamente en células parasitarias y en células tumorales mamarias. A través de esta metodología fue posible establecer la capacidad que poseen la familias de Nitrofuranos y Nitroindazoles, para generar radicales libres y/o estrés oxidativo a nivel celular.

Las células parasitarias de *Trypanosoma cruzi*, en estado morfológico epimastigote, fueron obtenidos desde el laboratorio del Dr. Juan Diego Maya. Para el ensayo descrito se probaron tres cepas diferentes de *T. cruzi*, cepa Yp34, Dm28c y Tulahuén, las cuales fueron cosechadas a 3.500 rpm por 10 minutos al quinto día después de la siembra, en esta fecha las células parasitarias se encontraban en fase exponencial de crecimiento. Luego de la cosecha, dichas células fueron suspendidas en buffer fosfato a pH = 7.4 hasta obtener una concentración de parásitos de alrededor de 15 mg proteína/mL, para trabajar en la celda de REE a una concentración de entre 8 y 10 mg proteína/mL.

Para el ensayo en sí, los nitro derivados fueron preparados en DMSO, incubados y homogeneizados a una concentración de 1mM en presencia de NADPH (1mM), empleando como atrapador de espín DMPO (100mM). Los ensayos fueron realizados manteniendo una temperatura aproximada de 28 °C para conservar las condiciones del cultivo parasitario.

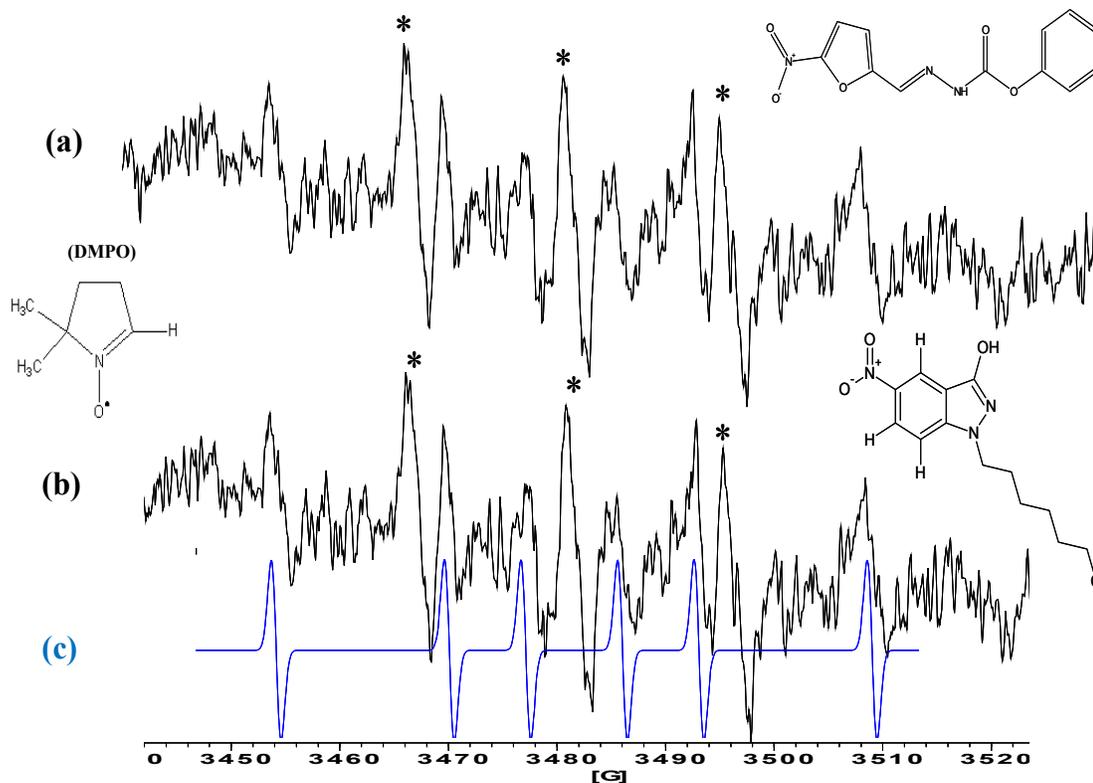
La figura 32-A muestra el patrón del espectro REE obtenido para el espín aducto del radical 3-NF (a) y del radical 4-NI (b). Además en ella se observa la simulación (c) de ambos espectros en base a dos núcleos diferentes (a_H y a_N). Los espectros registrados para ambas familias de nitro derivados (a y b) muestran un patrón consistente con dos patrones hiperfinos diferentes.

Los espectros de nueve líneas son consistentes con el atrapamiento del dos radicales distintos uno correspondiente al aducto DMPO-alquil y otro correspondiente al aducto DMPOX. Las constantes de acoplamiento calculadas corresponderían, en el primer caso, a la interacción del electrón desapareado con un núcleo de nitrógeno ($a_N= 15.95$ G) y con un núcleo de hidrógeno de DMPO ($a_H=23.00$ G) (Figura 32 (c)). El patrón hiperfino descrito representa un espectro de seis líneas con similares intensidades (1:1). Los espectros REE experimentales registrados para ambas familias de nitro derivados muestran un patrón hiperfino de nueve líneas, y la mencionada previamente describen un patrón de seis líneas. Las tres líneas que no han sido interpretadas representan un triplete bien definido (*). Esta señal es atribuible a la descomposición del atrapador DMPOX (117(a)).

Antecedentes indican que la señal que se observa como triplete bien definido que concuerda con la interacción del electrón desapareado con un núcleo de nitrógeno ($a_N=15.5$ G) y uno de hidrógeno ($a_H=9.12$ G) (117(a)). La gran intensidad del triplete puede deberse a una interferencia constructiva de los dos radicales atrapados.

Finalmente, podemos concluir que empleando las condiciones experimentales descritas no fue posible detectar especies reactivas de oxígeno generadas mediante la contribución redox de los nitro aniones derivados.

Figura 32-A: Espectros REE Experimentales en células parasitarias de *T. cruzi* (a) Espectro para el espín aducto del derivado 3-NF. (b) Espectro para el espín aducto del derivado 4-NI. (c) Superposición de espectro REE simulado en término de dós núcleos diferentes (a_N y a_H).



A pesar de los resultados obtenidos, se procedió a reproducir el experimento antes mencionado, variando en la metodología el atrapador de espín y el medio celular. Las células utilizadas fueron tumorales mamarias de la línea TA3, obtenidas desde el laboratorio del Dr. Juan Diego Maya (ICBM). La línea celular corresponde a una línea estable de adenocarcinoma humano. Todas ellas son de tipo adherente y crecen en monocapa. Se cultivaron en flask de 75cm² y se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% CO₂. La concentración final de células luego de la siembra en los pocillos fue de 1000 células/pocillo/200µL sembrados de TA3.

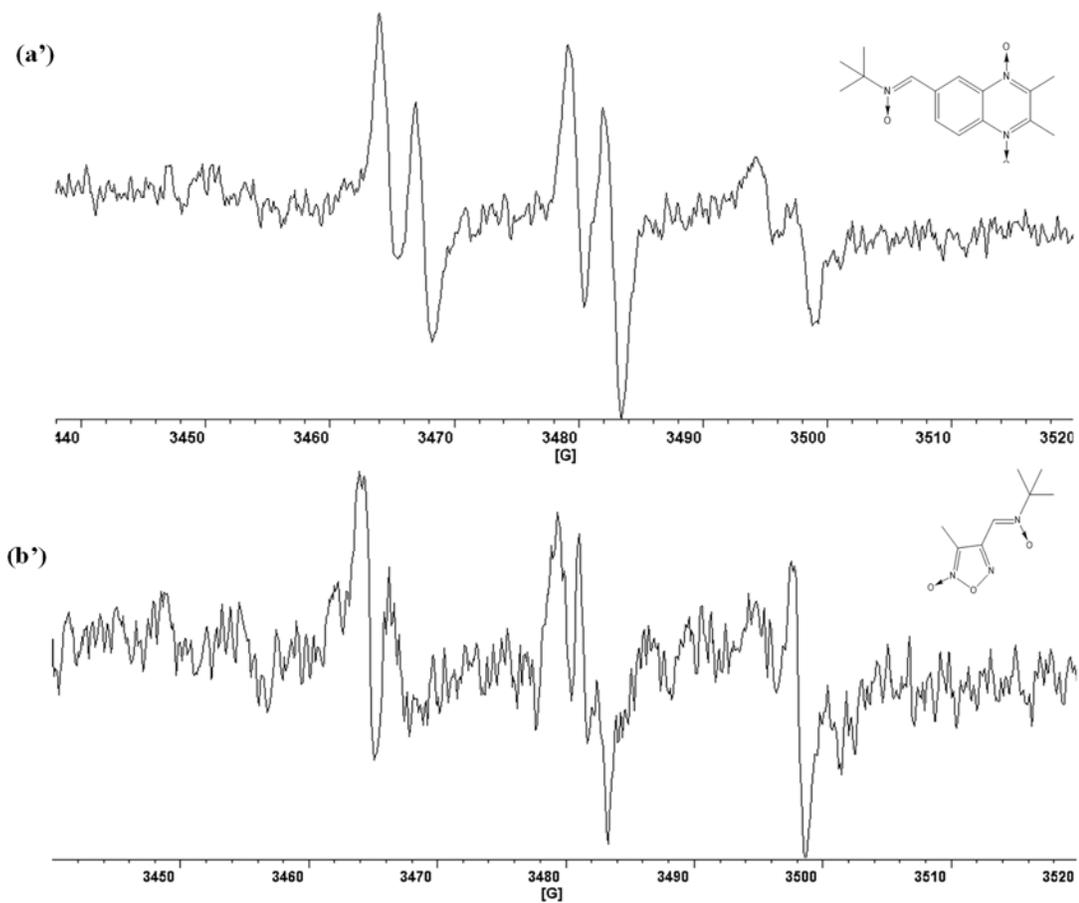
Se procedió a evaluar la capacidad de los derivados de NF y NI de generar especies radicalarias, empleando condiciones similares a las registradas para las células de epimastigotes *de T. cruzi*. La figura 32-B muestra el espectro registrado en medio biológico empleando como atrapador las nitronas WPQ52 y MN0804 (100 mM) respectivamente y como generador de estrés oxidativo el derivado 4-NI (1mM). En ella se observa un triplete que proviene del nitrógeno y su posterior desdoblamiento por la deslocalización del electrón sobre el hidrógeno del grupo nitrona presente en ambos atrapadores. Estos atrapadores muestran un patrón hiperfino de seis líneas, uno más resuelto que otro, donde la relación de intensidad señal/ruido es menor para el espectro registrado con el atrapador MN0804. Los espectros REE que se observan en figura 32-B son característicos del atrapamiento de radical hidroxilo.

Estudios indican que ambos atrapadores son más sensibles que DMPO para atrapar diversos radicales centrados tanto en nitrógeno, carbono, azufre y oxígeno, así como la diferencia de los patrones hiperfinos de estas nitronas debido a la estructura que las conforma (117 (b)). Este hecho habría permitido detectar radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), al reemplazar DMPO por WPQ52 o MN0804. Por tanto identificar especies reactivas de oxígeno que promueven estrés oxidativo depende de un impedimento más bien experimental que teórico, pues el mecanismo que involucra, por una parte generar o promover estrés oxidativo a nivel celular, existe, y es evidenciado a través del presente estudio

En las figuras 32-B se muestra el atrapamiento de radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) con las nitronas lineales (WPQ52 y MN0804), donde las constantes de acoplamiento calculadas corresponderían a la interacción del electrón desapareado con un núcleo de nitrógeno ($a_N=15.44\text{G}$, $a_N=15.15\text{G}$) y un núcleo de hidrogeno ($a_H=2.34\text{G}$, $a_H=2.93\text{G}$) pertenecientes a las nitronas WPQ52 y MN0804 respectivamente (117 (b)).

Mediante éste experimento fue posible dilucidar que los derivados de nitrofurano y nitroindazol son capaces de generar estrés oxidativo en medio biológico.

Figura 32-B (a' y b'): Atrapamiento del radical hidroxilo producido por estrés oxidativo del derivado 4-NI en células tumorales TA3. La figura (a') corresponde al atrapador MN0804, mientras que la figura (b') al atrapador WPQ52.



3.5 Estudio Teórico

En esta sección se presentan los datos más relevantes sobre las geometrías obtenidas de las optimizaciones realizadas a las dos familias en estudio en sus formas neutras y radicalarias, además del cálculo de las constantes de acoplamiento hiperfinas.

Posteriormente se realizaron los cálculos de las propiedades electrónicas que mejor describen su comportamiento electroquímico y espectroscópico. Los datos teóricos fueron comparados con los potenciales de reducción obtenidos y con las constantes de acoplamiento hiperfinas experimentales.

3.5.1 Nitrofuranos

En una primera etapa se ha determinado la especie cuya disposición espacio/conformacional se encuentre en el valle global de energía potencial, a través de la metodología de mecánica molecular bajo condiciones de tipo clásicas con el programa Spartan03. Esta etapa tiene como finalidad encontrar una estructura que modele la forma conformación de mayor representatividad (gobernada por la energía potencial) de la situación real. Las estructuras resultantes del proceso anterior fueron sometidas a re-optimización a través de métodos semi-empíricos (PM3) permitiendo refinar a bajo costo computacional la estructura precedente debido a la correcta parametrización del método. La estructura electrónica de cada compuesto fue develada mediante cálculo exhaustivo con metodología basada en el método de funcionales de la densidad, con el uso de formas híbridas en la definición del Hamiltoniano.

El híbrido empleado en la optimización de la estructura electrónica del sistema neutro y radicalarios fue (R/U) B3LYP/6-31G*⁺(d,p) (134).

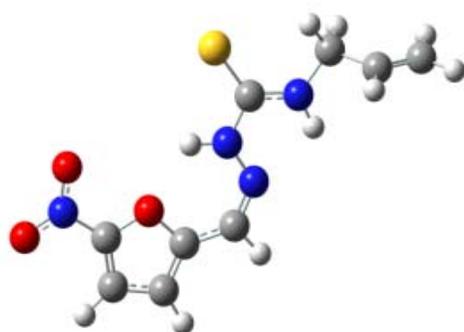
La figura 33 muestra los conformeros optimizados para los compuestos 1-NF y 4-NF, tanto para sus estructuras neutras como radicalarias.

Las estructuras optimizadas luego del cálculo DFT, muestran en general que las especies radicalarias tienden a adoptar una conformación plegada estabilizada, mientras que las moléculas neutras muestran la expansión de su cadena lateral, buscando la estabilidad a través de la planaridad. Dicha condición podría afectar directamente las constantes de acoplamiento hiperfinas que presentasen los nitro derivados estudiados, debido a las interacciones que pudiesen darse entre átomos producto de la distribución conformacional estabilizada (142).

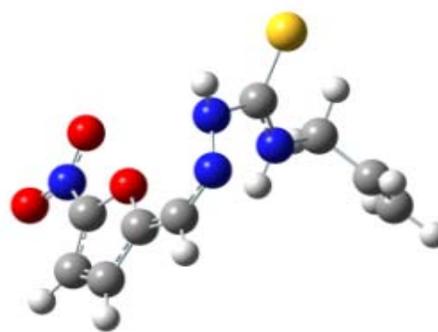
Este estudio conformacional también mostró que aquellos nitrofuranos neutros (ver figura 33 (A)), con cadenas más cortas ($n=0$; 1-NF y 3-NF), tendían claramente a adoptar una conformación plegada. Dicha conformación facilita interacciones puente de hidrógeno que estabilizan la molécula y permiten establecer un equilibrio entre la especie radical protonado ($\text{RNO}_2\text{H}^\cdot$) y la forma nitro anión radical ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) observada en el estudio electroquímico.

Del mismo modo pudimos establecer que los nitrofuranos neutros provistos de cadenas largas ($n=1$; 2-NF y 4-NF), tienden a adoptar una conformación más extendida, la cual permite una mayor deslocalización de la densidad de espín y por tanto un aumento en la densidad electrónica de los núcleos constituyentes de las cadenas (ver figura 33).

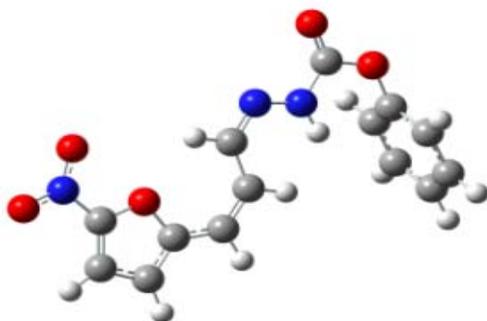
Figura 33: Distribución conformacional para los derivados 1-NF y 4-NF en condiciones de vacío. (A) Corresponde a los nitro derivados neutros. (B) Corresponde a los nitro derivados radicalarios.



A



B



A



B

La Tabla 6 muestra los ángulos diedros descritos en la figura 34, calculados mediante la metodología B3LYP/6-31G*⁺.

Figura 34: Ángulos diedros representativos en las conformaciones resultantes del análisis conformacional de nitrofuranos

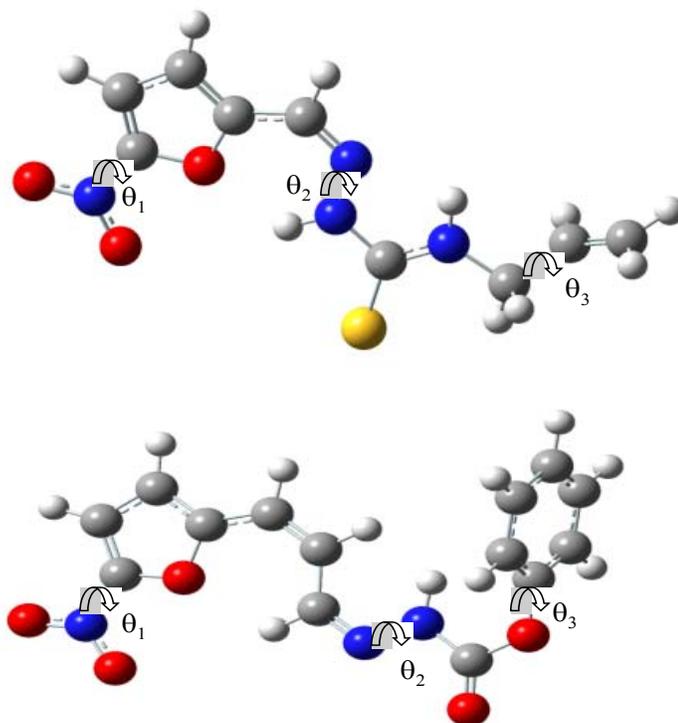


Tabla 6: Ángulos diedros calculados empleando como base B3LYP 6-31 G*⁺ y UB3LYP 6-31 G*⁺ respectivamente

Compuestos	1 NF		2NF		3NF		4NF	
	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical
θ_1 (°)	0.06	-0.02	0.07	0.02	-1.64	0.94	-0.10	-0.14
θ_2 (°)	179.99	179.91	169.85	-176.35	175.91	-171.93	-179.08	171.65
θ_3 (°)	121.55	124.51	118.18	122.50	-58.75	-102.10	87.69	123.81

En el mismo orden de ideas, se evaluó, tanto para los conformeros neutros como para los radicalarios las longitudes de enlace de ciertos átomos representativos, con el fin de establecer si existe alguna diferencia significativa en el carácter de los enlaces.

La Tabla 7 exhibe el resumen de las longitudes de enlaces que presentaron la familia de nitrofuranos.

Tabla 7: Longitudes de enlace* de los nitrofuranos derivados neutros y radicalarios



Compuestos	1-NF		2-NF		3-NF		4-NF	
Longitud enlaces (Å)	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical
N ₁ -O ₁	1.23	1.28	1.24	1.27	1.24	1.28	1.23	1.28
N ₁ -O ₂	1.23	1.27	1.23	1.26	1.23	1.28	1.23	1.27
N ₁ -C ₁	1.42	1.37	1.42	1.38	1.42	1.37	1.43	1.38
C ₂ =N ₂	1.30	1.32	1.30	1.32	1.29	1.31	1.30	1.31
N ₂ -N ₃	1.34	1.38	1.35	1.38	1.34	1.38	1.35	1.37
C ₆ =S ₁	1.67	1.70	1.68	1.71				
C ₃ =O ₃					1.20	1.21	1.20	1.21
C ₃ -N ₃	1.40	1.36	1.38	1.35	1.40	1.36	1.39	1.37

* Resultados obtenidos desde la optimización de la geometría empleando como base U/B3LYP/6-31G**

Los resultados obtenidos fueron comparados con datos cristalográficos reportados para estructuras similares (151, 152), donde fue posible establecer que el método DFT se ajusta bien al sistema y que la utilización de la base restringida B3LYP/6-31G** reproduce adecuadamente, con un valor cercano a 1.23 ó 1.24 Å, la longitud del enlace N-O del grupo nitro en los derivados neutros. Del mismo modo descrito previamente, pero empleando la base en su forma no restringida, se analizan los datos presentados en la Tabla 7 para los conformeros radicalarios.

En ella es posible observar que los enlaces N_1-O_1 y N_1-O_2 , pertenecientes al grupo nitro se incrementan empleando la base UB3LYP/6-31G*⁺. Este fenómeno puede deberse a la deslocalización de la densidad electrónica a través de la molécula debido al electrón desapareado, confiriéndole de este modo, un mayor carácter de enlace simple a los enlaces N-O. También es posible observar que la longitud del enlace C_1-N_1 decrece para las especies radicalarias respecto de las neutras, confiriéndole un mayor carácter de enlace doble debido al fenómeno recientemente descrito.

Con el fin de racionalizar los datos experimentales electroquímicos obtenidos para los derivados de nitrofurano con las propiedades electrónicas encontradas empleando la metodología DFT (153, 154), se procede a estudiar el comportamiento del potencial de reducción electroquímicos (E_{pc}) respecto de : La Afinidad Electrónica experimental, calculada con la diferencia entre las energías de la forma neutra y la forma radicalaria, la Electroafinidad teórica, expresada en términos del negativo de la energía del orbital molecular LUMO ($EA = -\epsilon_{LUMO}$), el Potencial de Ionización, formulado en términos del negativo de la energía del orbital molecular HOMO ($PI = -\epsilon_{HOMO}$) y la Electrofilia (ω y ϵ), respectivamente calculada según el teorema de Koopman's (155) y mediante el cociente entre los parámetros de reactividad dureza (η) (156) y potencial químico del sistema (μ) (156).

Donde $\eta = E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ (xvii)

$$\mu = (E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})/2 \quad (\text{xviii})$$

$$\varepsilon = \eta^2/2\mu \quad (\text{xix})$$

La Tabla 8 resume las propiedades electroquímicas y los índices de reactividad global calculados para los derivados de nitrofurano. El valor de la diferencia de energía, GAP ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$), obtenido indica que los derivados 1-NF y 2-NF serían menos favorables a una reducción debido a su menor valor de GAP.

Tabla 8: Resumen propiedades electroquímicas e índices de reactividad calculados para nitrofuranos

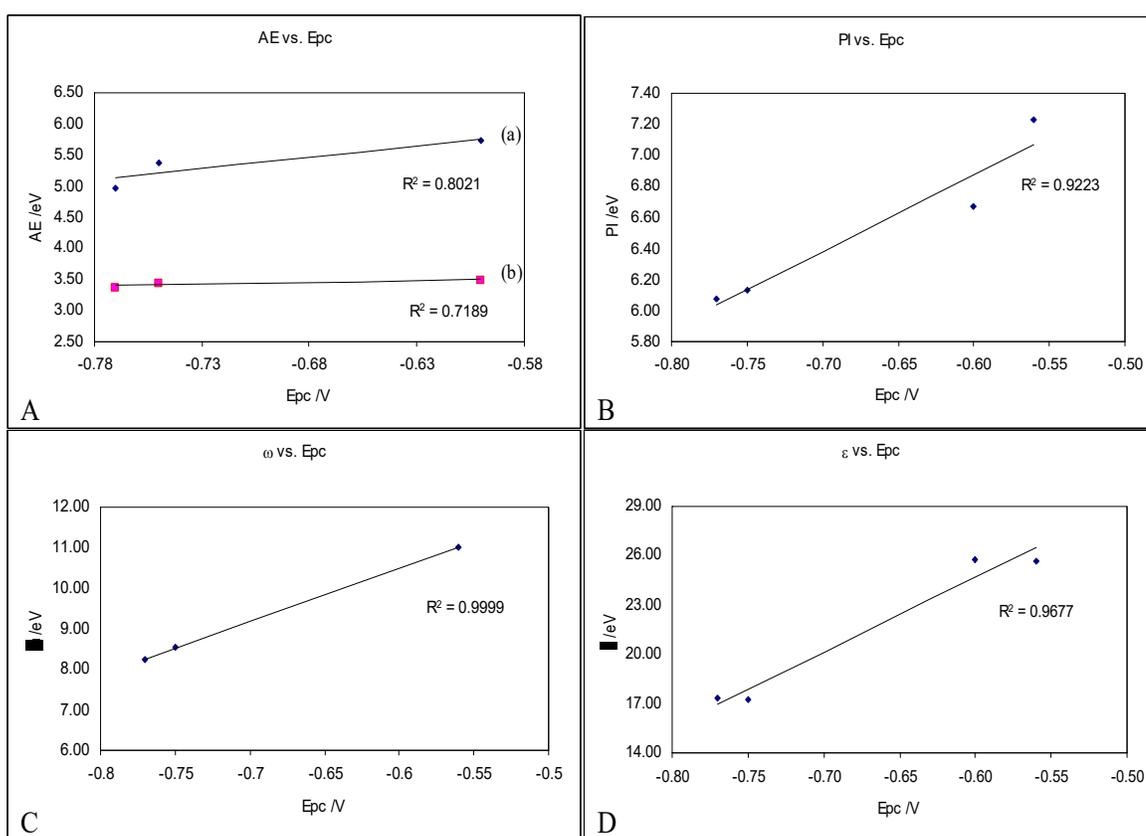
Compuesto	Epc /V	GAP /eV	AE exp. /eV	AE teo. /eV	PI /eV	μ /eV	η /eV	ε /eV	ω /eV
1-NF	-0.75	2.69	5.38	3.45	6.13	4.79	2.69	17.27	8.54
2-NF	-0.77	2.71	4.97	3.37	6.08	4.72	2.71	17.33	8.24
3-NF	-0.56	2.99	3.80	6.96	7.23	5.74	2.99	25.68	11.00
4-NF	-0.60	3.18	5.74	3.49	6.67	5.08	3.18	25.74	8.12

La figura 35 muestra las correlaciones de las propiedades electrónicas calculadas en función de los potenciales de pico catódico experimentales. En ella es posible observar una dependencia entre las propiedades electrónicas calculadas y los potenciales de reducción de los nitrofuranos. Las correlaciones obtenidas ($r^2=0.80$, $r^2=0.72$, $r^2=0.92$, $r^2=0.99$ y $r^2=0.97$) se exhiben al interior de la figura 35 (A-C). Éstas muestran que existe una buena correlación teórico-experimental entre las propiedades electrónicas obtenidas desde la optimización DFT y los potenciales de reducción experimentales.

Este fenómeno indica que el híbrido empleado en la optimización de la estructura electrónica describe satisfactoriamente el sistema.

En general, la Afinidad electrónica experimental muestra una tendencia a aumentar a medida que el potencial de reducción de las moléculas se hace menos negativo (ver figura 35 (A, a)).

Figura 35: Correlaciones obtenidas entre (A) AE exp./teo. (a/b), (B) PI y (C, D) Electrofilia vs Epc para las moléculas derivadas de nitrofurano



Así, como era de esperarse, una molécula que se reduce más fácilmente está más ávida a aceptar un electrón. Este mismo comportamiento no fue posible apreciar para la Afinidad electrónica teórica (figura 35 (A, b)), ya que se observa que todos los valores son similares

sin importar el potencial que ellas posean, excepto para el derivado 3-NF que escapa de esta tendencia, por lo tanto y a pesar de obtenerse valores cercanos a los experimentales se debe considerar que la Afinidad electrónica teórica no reproduce adecuadamente los datos experimentales.

La figura 35 (B) muestra como varía el PI en función del potencial de reducción de los nitrocompuestos. En ella es posible observar que el PI aumenta a medida que el potencial de reducción las moléculas es menos negativo. Esta tendencia indicaría que las moléculas son menos ávidas a perder electrones (quedar de la forma A^+) a medida que su potencial de reducción es menos negativo, por tanto se espera que el proceso inverso, es decir, la ganancia de electrones se vea favorecido.

En cuanto a la capacidad de una molécula para reaccionar con un compuesto dador de electrones (electrofilia), es posible apreciar en la figura 35 (C, D) que la electrofilia calculada ω y ϵ , siguen la misma tendencia, aumentando a medida que el potencial de reducción es menos negativo, mostrando que aquellas moléculas con potenciales de reducción menores poseen una mayor demanda de electrones, favoreciendo el proceso de reducción.

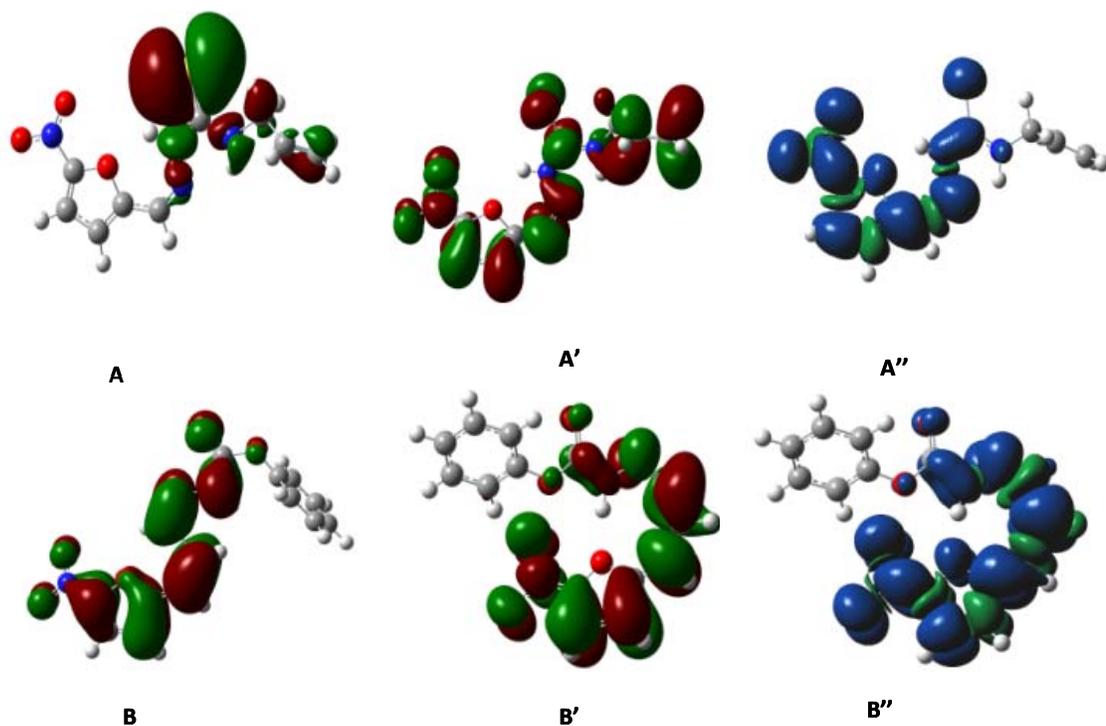
Finalmente, se procedió a realizar las representaciones graficas de las energías potenciales del HOMO, el SOMO y de la Densidad de espín, tanto para las especies neutras como radicalarias. La figura 36 muestra las isosuperficies generadas para los compuestos 1-NF (A/ superior) y 4-NF (B/ inferior).

Las isosuperficies generadas a partir de la optimización DFT, muestran que el HOMO del derivado 1-NF se encuentra distribuido sobre la cadena lateral (ver figura 36 A), mientras que para la distribución tanto del SOMO como la de la Densidad de espín es preferentemente sobre el grupo nitro y el anillo furano, tomando una pequeña parte de la cadena lateral (ver figura 36 A' y A''). El derivado 4-NF muestra que el HOMO se extiende casi por sobre toda la molécula (ver figura 36 B), mientras que la distribución tanto del SOMO como la de la Densidad de espín se localiza, al igual que en el caso anterior preferentemente sobre el anillo nitrofurano (ver figura 36 B' y B'') (157).

Importante es mencionar que existe congruencia entre las isosuperficies del SOMO y de la Densidad de espín para todos los casos estudiados, esto indica que la especie radical se ubica preferentemente sobre el grupo nitro y el anillo, existiendo algún grado de deslocalización electrónica en parte de la cadena lateral para los cuatro derivados.

El fenómeno recientemente descrito es interesante de analizar ya que permite ratificar las interacciones del electrón desapareado tanto en el anillo nitrofurano como en la cadena lateral, que se reflejan en las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas desde los espectros REE, tanto experimentales como simulados.

Figura 36: Isosuperficies generadas para los derivados 1-NF y 4-NF



A, A' y A'' corresponden respectivamente a las isosuperficies HOMO, SOMO y Densidad de espín del derivado 1-NF
B, B' y B'' corresponden respectivamente a las isosuperficies HOMO, SOMO y Densidad de espín del derivado 4-NF

Así, al comparar las constantes de acoplamiento con los mapas de la densidad de espín observamos que las regiones en las cuales existe mayor localización de la densidad de espín los valores de constantes de acoplamiento son más altos.

A pesar de encontrar que las isosuperficies concuerdan con los resultados experimentales encontrados para la familia de nitrofuranos, que además se observó una buena correlación entre las propiedades electrónicas tanto teóricas como experimentales y que existe una concordancia entre las constantes de acoplamiento y la distribución de la densidad de espín encontrada, este tipo de metodología entregó valores de hfcc diferentes a los experimentales, en cuanto al valor numérico, aunque, en general, siguen la tendencia encontrada mediante simulación (ver Tabla 9), donde observamos que los valores más altos experimentales (N_2') concuerdan con los mayores valores teóricos. El hecho de encontrar esta diferencia numérica podría deberse a una subestimación de la densidad de espín en el núcleo de nitrógeno del grupo imino y a una sobreestimación del H1 del anillo furano. Además los valores hfcc obtenidos son los encontrados en un sistema en el vacío, donde podría influir el efecto soluto-solvente.

Tabla 9: Constantes de acoplamiento hiperfino experimental y calculadas para los nitrofuranos

Nitrofurano	$aN_{1/(exp)}$	$aN_{2/(exp)}$	$aN_{3/(exp)}$	$aH_{1/(exp)}$	$aH_{2/(exp)}$	$aH_{3a/(exp)}$	$aH_{3b/(exp)}$	$aH_{4/(exp)}$	$aH_{5/(exp)}$	$aH_{6/(exp)}$
1NF	2.08 (1.54)	4.27 (6.24)	0.21 (1.57)	1.93 (1.08)	0.55 (1.08)			0.71 (4.82)	0.69 (4.84)	0.10 (0.94)
2NF	1.38 (1.54)	4.33 (6.24)	0.64 (1.57)	0.31 (1.08)	0.14 (1.08)	1.98 (4.82)	3.76 (4.82)	0.33 (0.94)	0.22 (0.15)	0.22
3NF	3.21 (11.74)	3.98 (0.21)	0.18 (0.21)	3.10 (2.0)	1.32 (1.10)			0.20 (5.50)	0.71	
4NF	2.11 (4.62)	3.49 (0.78)	0.01 (1.20)	1.96 (1.25)	0.33 (2.71)	5.90 (3.94)	2.19 (0.75)	0.34 (0.30)		

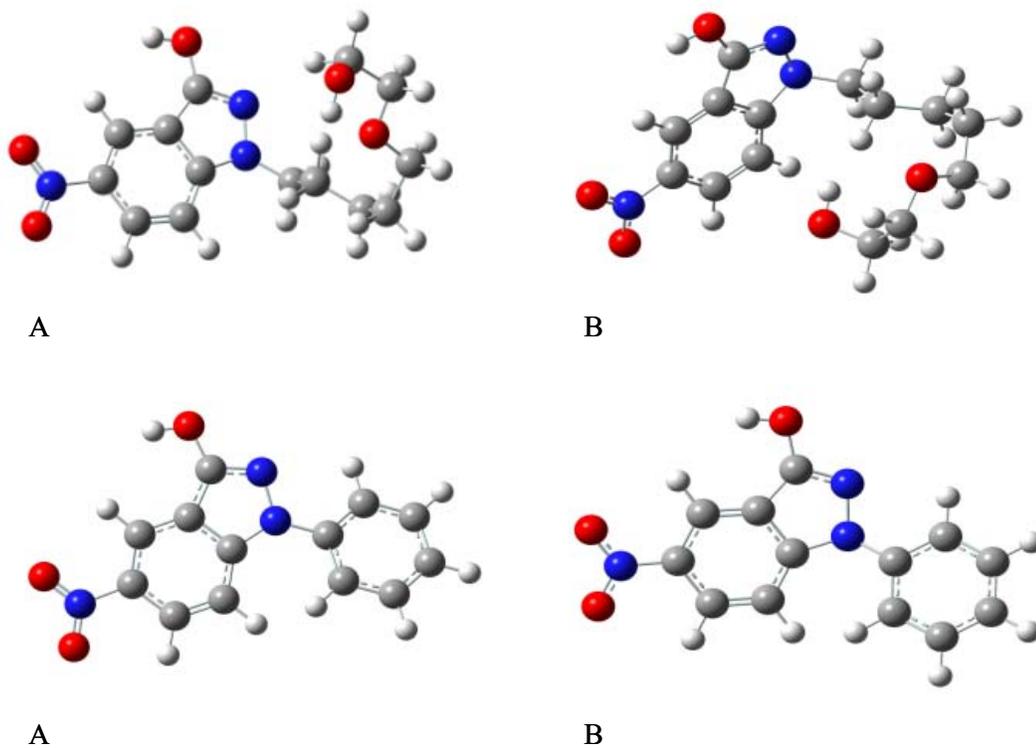
3.5.2 Nitroindazoles

Como se describió previamente en el punto 3.5.1 se procedió a determinar la especie cuya disposición espacio/conformacional se encuentra en el valle global de energía potencial empleando mecánica molecular bajo condiciones de tipo clásicas con el programa Spartan03.

Las estructuras resultantes del proceso anteriormente mencionado fueron sometidas a re-optimización a través de métodos semi-empíricos (PM3) permitiendo refinar a bajo costo computacional la estructura precedente. Finalmente, la estructura electrónica de cada compuesto fue obtenida empleando el método de funcionales de la densidad, con el uso de formas híbridas en la definición del Hamiltoniano. El híbrido empleado en la optimización de la estructura electrónica del sistema neutro y radicalario fue (R/U) B3LYP/6-31G*⁺(d,p) (134).

La figura 37 muestra los confórmeros optimizados para los derivados 2-NI y 5-NI, tanto para sus estructuras neutras como radicalarias.

Figura 37: Distribución conformacional para los derivados 2-NI y 5-NI en condiciones de vacío. (A) Nitro derivados neutros. (B) Nitro derivados radicalarios.



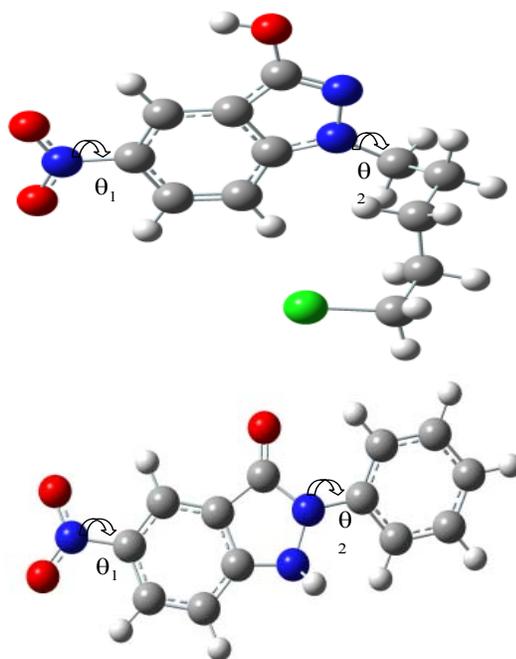
Las estructuras optimizadas luego del cálculo DFT, muestran en general que todos los NI derivados buscan la estabilidad a través de la planaridad. En todos los casos el grupo nitro respecto del anillo indazólico se encontraron coplanares. Por otra parte, las pequeñas variaciones observadas en los conformeros luego de la optimización de la geometría DFT, son atribuidas a la influencia de los sustituyentes.

Respecto de ésta idea, podemos describir que en todos los casos en los cuales los sustituyentes eran de tipo alifático el sistema tendían a buscar la estabilidad a través del plegamiento de la cadena, sin embargo aquellos NI con sustituyentes de naturaleza aromática se observaron como los confórmeros de tipo más plano, fenómeno que podría contribuir a una mayor deslocalización del electrón desapareado, traducándose en una distribución de la densidad de espín por gran parte de la molécula.

La Tabla 10 muestra los ángulos diedros descritos en la figura 38, calculados mediante la metodología B3LYP/6-31G*⁺. En el mismo orden de ideas, se evaluó, tanto para los confórmeros neutros como para los radicalarios las longitudes de enlace de ciertos átomos representativos, con el fin de establecer si existe alguna diferencia significativa en el carácter de los enlaces.

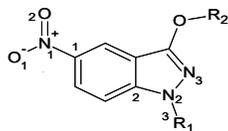
La Tabla 11 exhibe el resumen de las longitudes de enlaces que presentaron la familia de nitroindazoles. Los resultados obtenidos fueron comparados con datos cristalográficos reportados para estructuras similares (151, 152), donde fue posible establecer que el método DFT se ajusta bien al sistema y que la utilización de la base restringida B3LYP/6-31G*⁺ reproduce adecuadamente, con un valor cercano a 1.23 Å, la longitud del enlace N-O del grupo nitro en los derivados neutros. Del mismo modo descrito previamente, pero empleando la base en su forma no restringida, se analizan los datos presentados en la tabla 10 para los confórmeros radicalarios.

Figura 38: Ángulos diedros representativos en las conformaciones resultantes del análisis conformacional de nitrofuranos



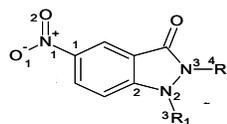
En ella es posible observar que los enlaces N₁-O₁ y N₁-O₂, pertenecientes al grupo nitro se incrementan empleando la base UB3LYP/6-31G⁺⁺. Este fenómeno puede deberse a la deslocalización de la densidad electrónica a través de la molécula debido al electrón desapareado, confiriéndole de este modo, un mayor carácter de enlace simple a los enlaces N-O. También es posible observar que la longitud del enlace C₁-N₁ decrece para las especies radicalarias respecto de las neutras, confiriéndole un mayor carácter de enlace doble debido al fenómeno recientemente descrito. Además se observa que no existe una influencia de los sustituyentes en la longitud del enlace ligada a los átomos recientemente descritos, y que el enlace N₂-N₃ no presenta variaciones significativas de longitud al evaluar un sustituyente u otro.

Tabla 11: Longitudes de enlace* de los nitroindazoles derivados neutros y radicalarios



Nitroindazoles Tipo A

Compuestos	1 NI		2NI		3NI		4NI		5NI	10NI	
	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Neutro	Radical
N ₁ -O ₁	1.23	1.29	1.23	1.29		1.29	1.23	1.29	1.23	1.24	1.29
N ₁ -O ₂	1.24	1.29	1.24	1.29		1.29	1.24	1.29	1.24	1.23	1.29
N ₁ -C ₁	1.46	1.39	1.46	1.39		1.39	1.46	1.39	1.46	1.43	1.4
C ₂ -N ₂	1.36	1.38	1.36	1.38		1.38	1.36	1.39	1.37	1.36	1.39
N ₂ -N ₃	1.38	1.38	1.38	1.38		1.37	1.38	1.37	1.38	1.38	1.38
N ₂ -C ₃	1.45	1.44	1.46	1.44		1.44	1.46	1.44	1.42	1.45	1.44



Nitroindazoles Tipo B

Compuestos	6NI		7NI		8NI		9NI	
	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical	Neutro	Radical
N ₁ -O ₁	1.23		1.23	1.29	1.23	1.29	1.23	1.29
N ₁ -O ₂	1.23		1.23	1.29	1.23	1.28	1.23	1.29
N ₁ -C ₁	1.47		1.47	1.39	1.47	1.39	1.47	1.39
C ₂ -N ₂	1.39		1.37	1.41	1.39	1.43	1.39	1.43
N ₂ -N ₃	1.42		1.40	1.42	1.42	1.43	1.42	1.43
N ₃ -C ₄	1.45		1.40	1.39	1.45	1.45	1.42	1.40
N ₂ -C ₃					1.46	1.47		

* Resultados obtenidos desde la optimización de la geometría empleando como base U/B3LYP/6-31G**

Con el fin de racionalizar los datos experimentales electroquímicos obtenidos para los derivados de nitroindazol con las propiedades electrónicas (153, 154) encontradas empleando la metodología DFT, se procede a estudiar el comportamiento del potencial de reducción electroquímico (Epc) respecto de la Afinidad Electrónica experimental, calculada con la diferencia entre las energías de la forma neutra y la forma radicalaria, la Electroafinidad teórica, expresada en términos del negativo de la energía del orbital molecular LUMO ($EA = -\epsilon_{LUMO}$), el Potencial de Ionización, formulado en términos del

negativo de la energía del orbital molecular HOMO ($PI = -\epsilon_{HOMO}$) y la Electrofilia (ω y ϵ), respectivamente calculada según el teorema de Koopman's (155) y mediante el cociente entre los parámetros de reactividad dureza (η) (156) y potencial químico del sistema (μ) (156).

Análogo a lo expuesto para los derivados de nitrofurano, fueron utilizadas las ecuaciones *xvii*, *xviii* y *xix* para el cálculo de la dureza, el potencial químico y la electrofilia respectivamente.

La Tabla 12 muestra el resumen de las propiedades electroquímicas y los índices de reactividad global calculados para los derivados de nitroindazol. El valor de GAP obtenido para cada uno de ellos indica, que dentro de la forma A, el derivado que presenta el menor GAP es el compuesto 5-NI, este hecho indica que es más favorable ganar un electrón.

Para la familia de nitroindazoles de la forma B el derivado que exhibió un menor GAP fue el 7-NI. Sin embargo los cuatro derivados presentan GAP muy similares, del orden de 4 eV.

La figura 39 muestra las correlaciones de las propiedades electrónicas calculadas en función de los potenciales de pico catódico experimentales. En ella es posible observar una dependencia entre las propiedades electrónicas calculadas y los potenciales de reducción de los nitroindazoles. Las correlaciones obtenidas para ambas formas se exhiben en la figura 39 (A-C).

En ella se observa que existe una buena correlación teórico–experimental entre las propiedades electrónicas obtenidas desde la optimización DFT y los potenciales de reducción experimentales.

Este fenómeno indicaría que el híbrido empleado en la optimización de la estructura electrónica describe satisfactoriamente el sistema.

Tabla 12: Resumen propiedades electroquímicas e índices de reactividad calculados para nitroindazoles

Compuesto	Epc /V	GAP /eV	AE exp. /eV	AE teo. /eV	PI /eV	μ /eV	η /eV	ε /eV	ω /eV
Estructura Forma A									
1-NI	-1.43	3.65	6.76	2.72	6.37	4.54	3.65	30.21	5.66
2-NI	-1.42	3.73	6.84	2.67	6.39	4.53	3.73	31.48	5.51
3-NI	-1.43								
4-NI	-1.47	3.78	6.77	2.56	6.34	4.45	3.78	31.83	5.23
5-NI	-1.38	3.54	6.47	2.80	6.34	4.57	3.54	28.60	5.91
10-NI	-1.13	3.92	7.02	2.05	6.42	4.46	3.92	34.26	5.08
Estructura Forma B									
6-NI	-1.13	4.00	8.11	3.18	7.18	5.18	4.00	41.47	6.72
7-NI	-1.57	3.95	6.86	2.78	6.72	4.75	3.95	36.96	5.71
8-NI	-1.13	3.97	7.09	2.75	6.72	4.73	3.97	37.37	5.64
9-NI	-1.56	4.00	7.03	2.80	6.80	4.80	4.00	38.42	5.77

Todos de los parámetros calculados presentan tendencias similares a las encontradas para los nitrofuranos previamente descritos, precisamente se observa el mismo fenómeno, cuando se relaciona la Afinidad electrónica (AE) experimental y teórica con el potencial de reducción. A pesar de observarse un leve incremento en la Afinidad Electrónica a medida que el potencial de reducción es menos negativo, los valores se aprecian similares entre sí, sin importar el potencial que ellas posean. Por lo tanto y a pesar de obtenerse valores cercanos a los experimentales se debe considerar que la Afinidad electrónica teórica y experimental no son reproducidas adecuadamente con la base B3LYP/6-31G*+.

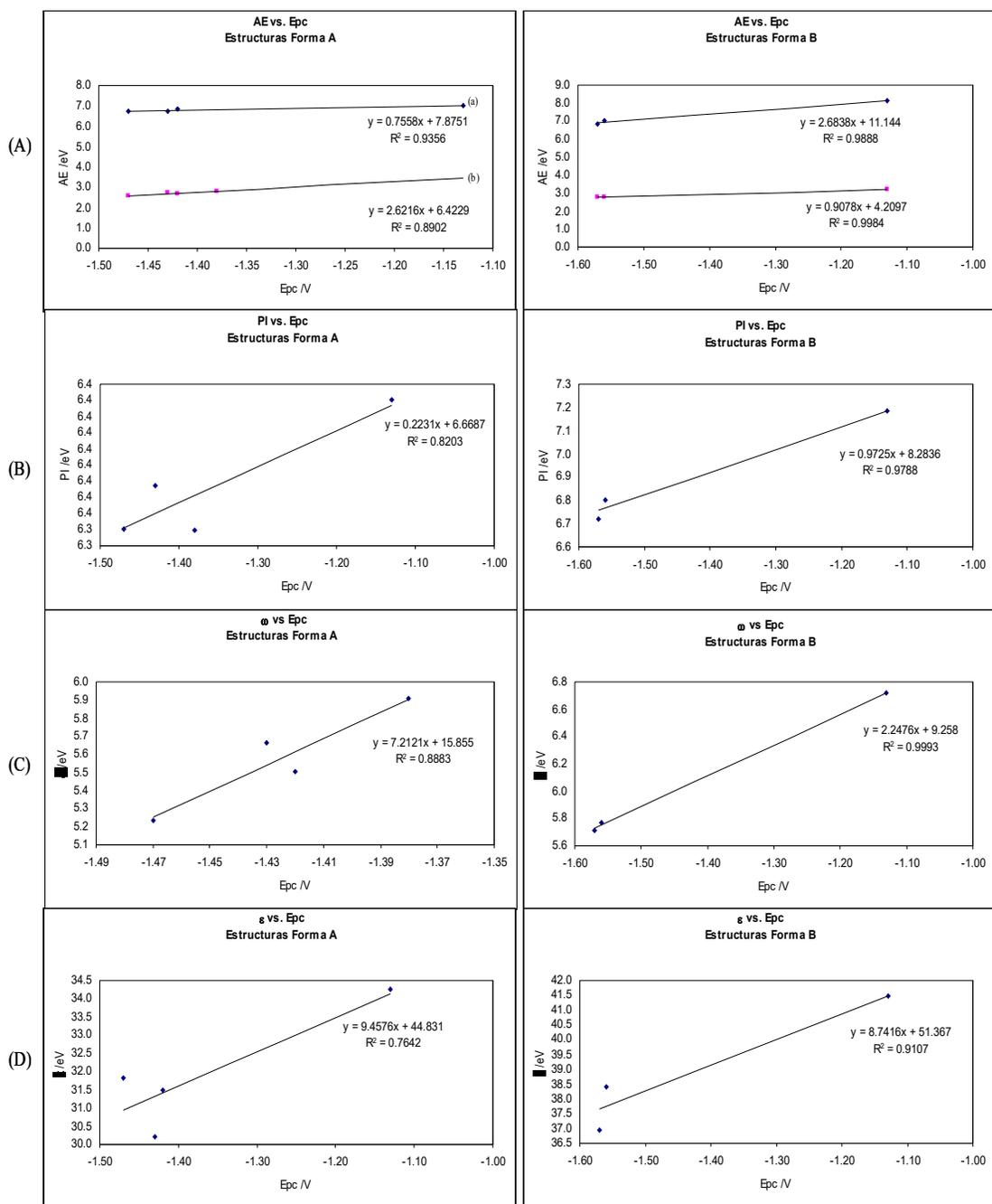
El fenómeno descrito se observa tanto para derivados de la forma A como B (ver figura 39 (A a/b)).

Importante es mencionar que el híbrido empleado a pesar de no representar la respuesta esperada a la relación entre Afinidad Electrónica y el potencial de reducción describe de manera apropiada la mayoría de las propiedades electrónicas calculadas en esta investigación.

La figura 39 (B) muestra como varía el PI en función del potencial de reducción de los nitroindazoles. En ella es posible observar que el PI aumenta a medida que el potencial de reducción de las moléculas se hace menos negativo, para ambas formas de derivados. Esta tendencia indicaría que las moléculas más ávidas a perder electrones serían aquellas con mayor potencial de reducción (más negativos). En cuanto a la capacidad de una molécula para reaccionar con un compuesto dador de electrones (electrofilia), es posible apreciar en la figura 39 (C, D) que la electrofilia calculada ω y ϵ , siguen la misma tendencia, aumentando a medida que el potencial de reducción es menos negativo, mostrando nuevamente que aquellas moléculas con potenciales de reducción menos negativos poseen una mayor demanda de electrones. De este modo podemos corroborar que la molécula que se reduce más fácilmente está más ávida a aceptar un electrón.

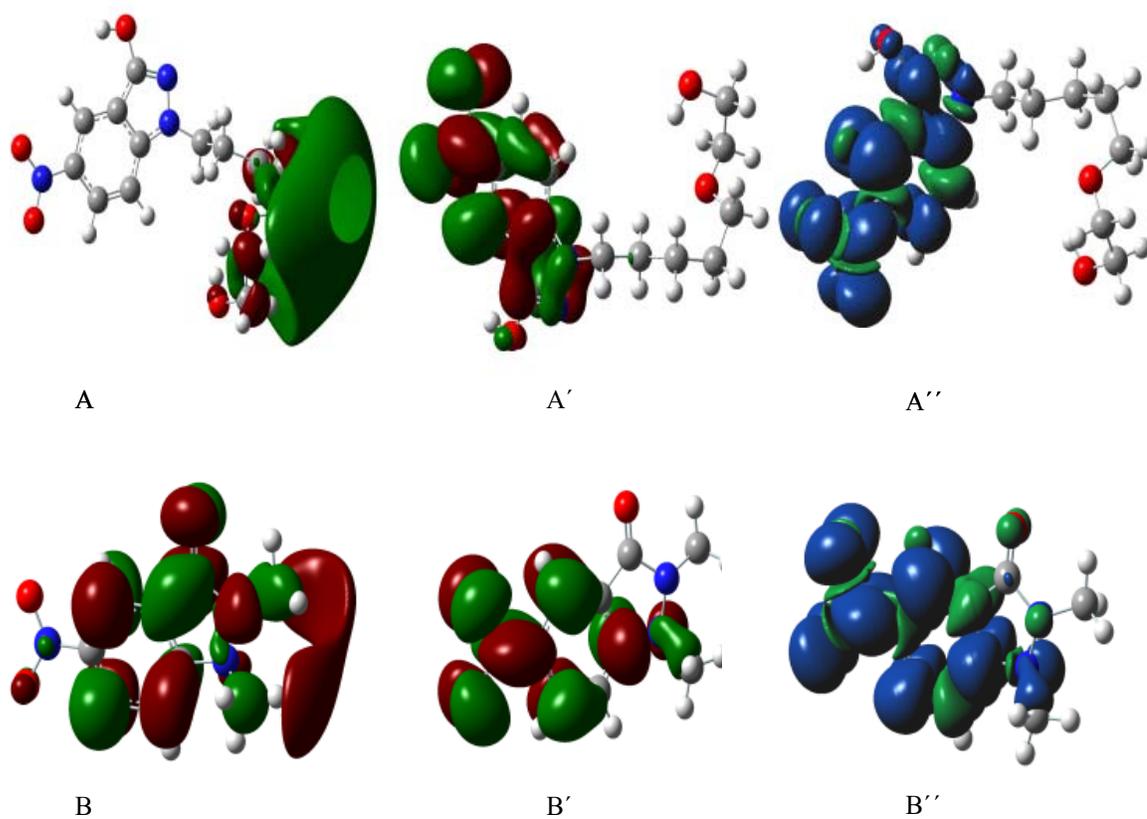
Finalmente, se procedió a realizar las representaciones graficas de las energías potenciales del HOMO, el SOMO y de la Densidad de espín, tanto para las especies neutras como radicalarias. La figura 40 muestra las isosuperficies generadas para los compuestos.

Figura 39: Correlaciones obtenidas entre (A) AE exp./teo (a/b), (B) PI y (C, B) Electrofilia vs Epc para las moléculas derivadas de nitroindazol de las forma A y B



Las isosuperficies generadas a partir de la optimización DFT, muestra que el HOMO del derivado 2-NI se encuentran distribuido sobre la cadena lateral (ver figura 40 A), mientras que la distribución tanto del SOMO como la de la Densidad de espín es preferentemente sobre el grupo nitro y el anillo indazol (ver figura 40 A' y A'').

Figura 40: Isosuperficies generadas para los derivados 2-NI y 8-NI



A, A' y A'' corresponden respectivamente a las isosuperficies HOMO, SOMO y Densidad de espín del derivado 2-NI.

B, B' y B'' corresponden respectivamente a las isosuperficies HOMO, SOMO y Densidad de espín del derivado 8-NI.

El comportamiento observado en el derivado 8-NI muestra que el HOMO se extiende preferentemente sobre el anillo indazol y fuera del grupo nitro, mientras que la distribución tanto del SOMO como la de la Densidad de espín se localizan sobre el anillo indazol y el grupo nitro (ver figura 40 B' y B'') (157).

Los derivados nitroindazol exhibidos recientemente muestran isosuperficies comparables con las obtenidas para los derivados nitrofuranos.

Estos derivados también muestran que existe una congruencia entre las isosuperficies del SOMO y de la Densidad de espín par todos los casos estudiados. Este hecho indica que la especie radical se ubica preferentemente sobre el grupo nitro y el anillo, existiendo algún grado de deslocalización electrónica en parte de la cadena lateral, cuando los derivados de indazol presentan cadenas sustituyentes largas provistas de átomos con alta electronegatividad.

El fenómeno descrito permite ratificar las interacciones del electrón desapareado tanto en el anillo nitroindazol como en la cadena lateral, que se reflejan en las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas desde los espectros REE, tanto experimentales como simulados. Así, al comparar las constantes de acoplamiento con los mapas de la densidad de espín observamos que las regiones en las cuales existe mayor localización de la densidad de espín concuerdan con los valores de constantes de acoplamiento más altos.

A pesar de encontrar que los datos geométricos calculados concuerdan con los resultados experimentales encontrados para la familia de nitroindazoles, que además se observó una buena correlación entre las propiedades electrónicas tanto teóricas como experimentales y que existe una concordancia entre las constantes de acoplamiento y la distribución de la densidad de espín encontrada, este tipo de metodología entrega valores de hfcc diferentes a los experimentales, en cuanto al valor numérico, aunque siguen la tendencia encontrada mediante simulación (ver Tabla 13). Este hecho podría deberse a una subestimación de la densidad de espín en el núcleo de nitrógeno del grupo nitro y a una sobreestimación del H1 de la especie aromático contigua al grupo nitro. Además debemos considerar que el cálculo fue realizado en condiciones de vacío, donde la ausencia del solvente (DMSO), empleado en la determinación experimental de hfcc, podría haber influido en dicha diferencia. Sin embargo, también debemos considerar que este solvente polar podría polarizar la molécula, he influir, por tanto, en la distribución de densidad de espín.

El mismo comportamiento fue encontrado por los autores Rodríguez y col. (117) que estudiaron una familia de nitroindazoles, a los cuales, luego del cálculo DFT, se les realizó un cálculo Single Point, considerando interacciones soluto-solvente, empleando la geometría optimizada en el vacío.

Tabla 13: Constantes de acoplamiento hiperfino experimental y calculadas para los nitroindazoles

Nitroindazoles	$aN_{1(\text{exp})}$	$aN_{2(\text{exp})}$	$aN_{3(\text{exp})}$	$aH_{1(\text{exp})}$	$aH_{2(\text{exp})}$	$aH_{3(\text{exp})}$
1NI	5.64 (11.74)	0.51 (1.08)		7.19 (4.77)	1.44 (2.31)	0.81 (0.71)
2NI	5.62 (11.96)	0.17 (1.13)		7.42 (4.63)	1.31 (2.41)	0.77 (0.90)
3NI	3.56	0.83		6.71	2.18	0.78
4NI	3.84	0.72		6.44	2.29	0.68
5NI	3.47 (12.01)			4.86 (4.12)	3.24 (2.41)	0.9 (0.77)
6NI	5.39 (11.76)	0.10 (1.25)		5.01 (5.18)		
7NI	3.25	0.32		7.69	1.06	2.02
8NI	3.49 (11.01)	0.59 (1.26)		5.38 (5.30)		
9NI	3.67		1.48	6.65	1.91	1.87
10NI	3.91 (11.30)	1.12 (0.22)	0.20 (0.22)	5.44 (5.50)	3.15	1.04

Para finalizar el apartado de cálculos teóricos, que hasta ahora se presentó de manera independiente para la familia de nitrofuranos y para la de nitroindazoles, se procede a exhibir y comparar los valores de reactividad global y local calculada para ambas familias de compuestos.

Para describir la reactividad local o regional empleamos los valores obtenidos de reactividad global (ω ecuación *viii*) exhibidas en las propiedades electrónicas.

La electrofilia local (regional) puede calcularse usando la inversa entre la dureza química ($S=1/\eta$) y la blandura global, empleando la siguiente conocida expresión:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{\mu^2}{2}S \quad (viii)$$

Dentro de este modelo se asume que el sitio electrofílico en una molécula será aquel descrito por la blandura local para un ataque nucleofílico S.

El máximo poder de electrofilia dentro de una molécula estará entonces localizado en el sitio de mayor blandura del sistema. Del mismo modo descrito previamente es posible calcular la electrofilia local a través de la relación entre la blandura local y la función de Fukui. La función de Fukui $f(r)$ fue introducida por Parr y Yang como una generalización del concepto de Orbitales Moleculares de Fukui (137), que centra la noción de reactividad en la interacción entre los orbitales frontera HOMO y LUMO. La función de Fukui se define como el cambio de densidad electrónica en un punto del espacio ($f(r)$) cuando varía el número de electrones del sistema N , manteniendo el potencial externo (v), o la geometría, constante. Así el máximo poder de electrofilia en una molécula estará desarrollado en el sitio donde la función de Fukui, para un ataque nucleofílico $f(r)^+$ o electrofílico $f(r)^-$, presente su máximo valor, es decir, el sitio activo del electrófilo y el nucleófilo respectivamente (138). Considerando la aproximación de átomos en moléculas de Yung and Mortier (138) se obtiene para el ataque de un nucleófilo la función de Fukui nucleofílica siguiente

$$f_k^+ = q_k^N - q_k^{N+1}$$

y para el ataque de un electrófilo la función de Fukui electrofílica siguiente,

$$f_k^- = q_k^{N-1} - q_k^N$$

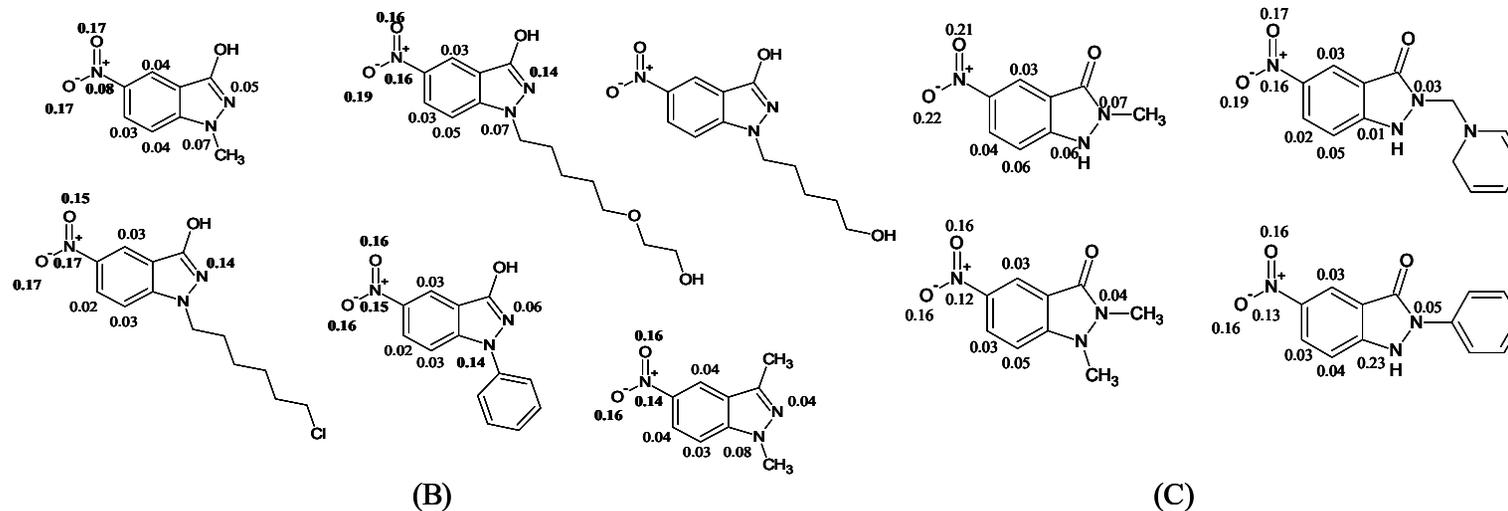
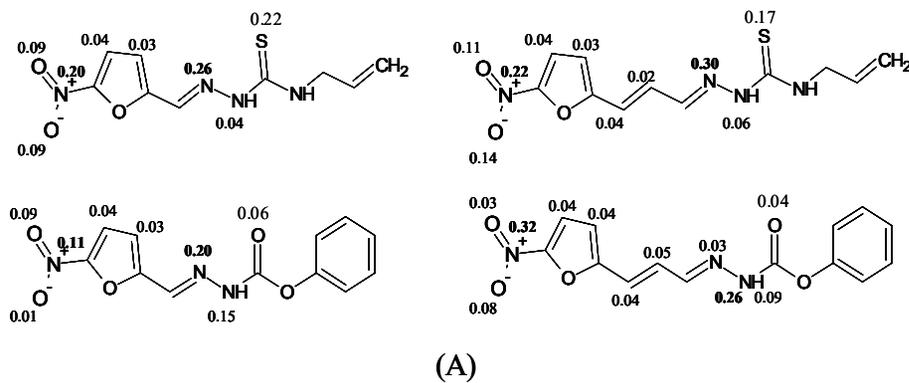
Donde q_k representa la carga atómica de Mulliken sobre el átomo k .

La implementación operacional de las ecuaciones exhibidas previamente introduce la función de Fukui regional o condensada a un átomo, f_k (155). A través de estas ecuaciones obtenemos las funciones de Fukui condensadas en átomos, para un ataque electrofílico, y para un ataque nucleofílico, determinando específicamente los átomos más susceptibles a sufrir el ataque en caso de enfrentarse a un electrófilo o a un nucleófilo.

La figura 41 muestra todas las estructuras químicas de los derivados estudiados con su respectivo valor de la función de Fukui nucleofílica ($f(r)^+$), a partir de las cargas atómicas de Mulliken, de las formas N y N+1 electrones.

Al comparar, las constantes de acoplamiento que representan donde se encuentra el electrón, es decir las de mayor valor, se observan datos concordantes respecto a las zonas reactivas de las moléculas. La figura 41 (A) muestra la reactividad local de las moléculas derivadas de nitrofurano a través de las funciones de Fukui condensadas $f(r)^+$, en ella se observan a los nitrógenos del grupo nitro y uno perteneciente a la semicarbazona, además del azufre de esta misma cadena, como los centros más reactivos frente al ataque de un electrón (nucleófilo). Además los derivados de nitrofuranos con cadena de carbamato presentan similar comportamiento al descrito previamente, sin tomar en cuenta la reactividad el átomo de azufre, ya que no está presente en su estructura.

Figura 41: Funciones de Fukui condensadas $f(r)^+$ para nitrofuranos (A) y nitroindazoles (B y C)



(A) Derivados Nitrofuranos con cadenas de tiosemicarbazona y carbamato.

(B y C) Derivados de Nitroindazol y Nitroindazolona respectivamente

Del mismo modo comparamos los mapas de la densidad de espín obtenidos para estos derivados (ver figura 36), con los valores de las funciones de Fukui calculadas, donde es posible observar que la localización de la densidad de espín (o localización del electrón desapareado) se encuentra en las mismas regiones donde la función de Fukui nucleofílica es máxima, dejando evidencia de la consistencia de los cálculos teóricos.

El mismo análisis se realizó para la familia de nitroindazoles. Aquí fue posible encontrar un comportamiento similar al descrito para los nitrofuranos, donde los valores de las constantes de acoplamiento más altos concuerdan con los valores máximos en las funciones de Fukui nucleofílicas ($f(r)^+$). La figura 41 (B y C) muestra que los átomos más reactivos bajo el ataque de un nucleófilo (o de un electrón) son los átomos de oxígeno y el nitrógeno del grupo nitro localizando el electrón desapareado preferentemente en el anillo bencénico. Tal como se observó para los nitrofuranos, el mapa de la densidad de espín obtenido para los nitroindazoles (ver figura 40), muestra que la localización de la densidad de espín concuerda con las regiones donde el valor de la $f(r)^+$ es más alto, volviendo a ratificar la consistencia de los datos teóricos.

En general, no es posible establecer una influencia de los sustituyentes en los valores encontrados para las $f(r)^+$, ya que para todos los derivados estudiados comparables entre sí se observan valores del mismo orden.

Estudio Biológico

3.6 Familias de Nitrofuranos y Nitroindazoles

En esta sección se exhiben los resultados obtenidos para las familias de NF y NI a partir de los diversos ensayos biológicos realizados según la metodología descrita en el punto 2.7 de la presente tesis.

El tratamiento de datos y la presentación de los resultados en esta sección son desarrollados tratando en conjunto ambas familias de compuestos para la mayoría de los estudios realizados.

Otros estudios fueron realizados para alguna familia o compuesto en particular, los cuales se describen en detalle a continuación.

3.6.1. Citotoxicidad en macrófagos RAW 264.7

El estudio de citotoxicidad en macrófagos del tipo RAW fue realizado para un total de once, de los catorce derivados estudiados, los que se listan en la tabla 14. Además se dispone con los valores de citotoxicidad de los fármacos empleados en el tratamiento de esta patología (Nfx y Bnz).

Los valores de IC_{50} calculados mediante el análisis de la absorbancia de los cristales formazan (ensayo MTT), fueron obtenidos a través del estudio de curvas dosis-respuesta tratadas empleando el software Prism 5.0.

Tal como se describe en la metodología en este estudio se trabajó con una concentración constante de células en la microplaca de 0.5 millones de células/mL. Dicha placa contenía muestras control las cuales eran sometidas al ensayo MTT en la ausencia de concentración de nitro compuestos ($0 \mu\text{M}$). Además se contaba con blancos que sólo contenían el medio del cultivo celular en ausencia de células y compuesto.

Todas las muestras contenidas en la placa fueron trabajadas en triplicado. En cada placa se usaron cinco diferentes concentraciones de trabajo de los nitrocompuestos estudiados, estas iban desde $6.25 \mu\text{M}$ hasta $100 \mu\text{M}$. Todos los compuestos fueron preparados en DMSO, procurando que en la placa la concentración final de DMSO no superara el 5%.

Los valores de IC_{50} exhibidos en la tabla 14 muestran en general una citotoxicidad comparable para la mayoría de los compuestos estudiados del orden de $1\text{E}-05$ a $9\text{E}-05$ M, con excepciones importantes.

Tabla 14: Valores de IC₅₀ obtenidos mediante un análisis de curva dosis-respuesta del ensayo MTT

Nitrocompuestos	IC ₅₀ (μM)
1 - NF	49.7
2 - NF	8.14
3 - NF	4.00·10 ⁴
4 - NF	10.0
2 - NI	> 200
4 - NI	>200
5 - NI	53.6
6 - NI	13.9
8 - NI	>200
9 - NI	>200
10 - NI	33.0
Nifurtimox	92.7
Benznidazol	180

En cuanto a los **derivados NF** es posible apreciar que el **3-NF** es el que presenta la menor citotoxicidad en células mamíferas, siendo tres órdenes de magnitud más grande la concentración necesaria para matar el 50% de las células que en el resto de los derivados, haciendo que este compuesto sea mucho menos tóxico en el hospedero que Nifutimox y Benznidazol.

El derivado **2-NF** se observa como el compuesto más tóxico ya que posee el menor valor de IC₅₀, en comparación al resto de los nitro compuestos estudiados y también a los fármacos empleados actualmente en el tratamiento del mal de Chagas.

Los **derivados de NI**, sometidos a este ensayo, presentaron un comportamiento débilmente tóxico sobre este tipo de símil mamífero, tanto las formas de hidrocarburos A como las B. En la mayoría de los derivados no se encontró una variación significativa entre las células viables tratadas con los NI derivados y los controles sin fármaco.

El hecho de no presentar citotoxicidad o presentar una baja citotoxicidad en células de símil mamíferas, representa una ventaja como potencial fármaco para este tipo de compuestos, pues no causarían o bien minimizarían el daño celular en el hospedero u/o paciente tratado.

A pesar de observar un comportamiento, en general no tóxico para estos derivados, la tabla 14 exhibe valores calculados de IC_{50} para los derivados 5-NI, 6-NI y 10-NI, compuestos que sí presentaron citotoxicidad en células RAW. Estos valores muestran que los derivados mencionados son citotóxicos, pero dentro del orden citotoxicidad que poseen los fármacos hoy empleados para el tratamiento del mal de Chagas, Benznidazol y Nifurtimox.

3.6.2 Actividad sobre *Trypanosoma cruzi*

3.6.2.1 Actividad en epimastigotes de *T. cruzi*

Se evaluó la actividad citotóxica que pudiesen presentar los catorce nitro derivados estudiados en ésta tesis, a través del uso de la técnica MTT descrita.

En primer lugar se realizó un screening o análisis preliminar de todos los derivados estudiados, donde fue posible apreciar la actividad de éstos más la de Nifurtimox y Benznidazol a una única concentración equivalente a 100µM. Se seleccionó la concentración más alta utilizada normalmente para este tipo de cultivos, con el fin de poder discriminar principalmente, cuáles de los diez NI estudiados eran interesantes de seguir analizando su actividad sobre *T. cruzi* a menores concentraciones y por otras metodologías.

Los cuatro NF estudiados también fueron analizados a través de esta metodología. Este hecho, (ambas familias tratadas y estudiadas con la misma técnica), permitió establecer un patrón de comparación entre los derivados NF y los derivados NI que se discute a continuación.

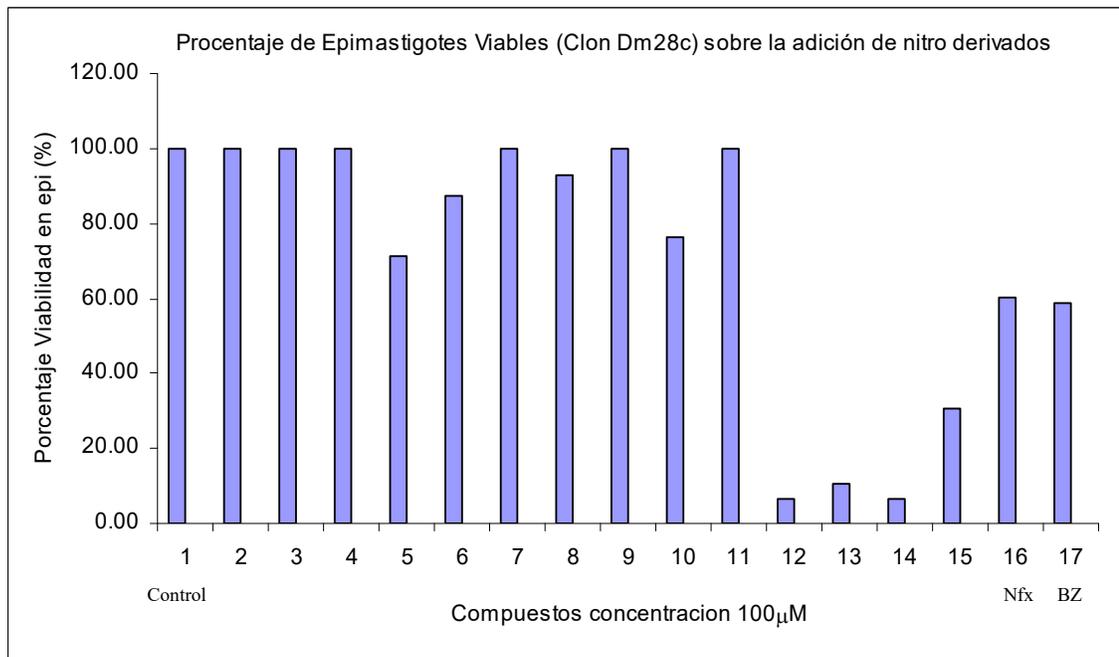
Durante el estudio realizado se pudo observar que la adición de DMSO al cultivo parasitario tenía cierto porcentaje de citotoxicidad (bajo), por lo tanto para evitar posibles influencias del solvente en la actividad de los nitro derivados se preparó un control con DMSO, el cual se estableció como el 100% de epimastigotes viables.

La figura 42 muestra el porcentaje de epimastigotes viables, luego de la adición de los derivados descritos anteriormente comparadas con el control sin fármaco.

El gráfico muestra que la mayoría de los derivados NI no presentan citotoxicidad sobre epimastigotes de *T. cruzi*, con la excepción de los compuestos **5, 6, 8 y 10**, que corresponden a los derivados **4-NI, 5-NI, 7-NI y 9-NI**.

Importante es mencionar que los NI activos en epimastigotes corresponden a dos compuestos derivados de la forma de hidrocarburos A y dos del tipo B, donde predomina como sustituyente más activo derivados aromáticos (fenilo y piridina).

Figura 42: Epimastigotes viables clon Dm28c para los nitro derivados estudiados.



Los derivados **12, 13, 14 y 15**, que corresponden a los compuestos **1-NF, 2-NF, 3-NF y 4-NF** de la familia de nitrofuranos, se observa como la familia de nitro compuestos con mayor actividad citotóxica, sobre epimastigotes de la cepa Dm28c, inclusive mayor a la actividad observada para Benznidazol y Nifurtimox

Esta conclusión se establece a partir del hecho de que el valor porcentual calculado de epimastigotes viables, a través del método MTT, es bajo, de alrededor del 10%.

Finalmente, es importante discutir sobre la relación que existe entre la citotoxicidad en células mamíferas y la citotoxicidad en células parasitarias.

Un modelo ideal para un potencial fármaco sería aquel en el cual su actividad sea selectiva sobre células parasitarias y prácticamente inactivo (inofensivo) sobre células mamíferas.

Por tanto, basados en esta idea el derivado **3-NF** presentaría excelentes perspectivas en el tratamiento del mal de Chagas, al presentar baja citotoxicidad en células mamíferas y alta citotoxicidad en células parasitarias.

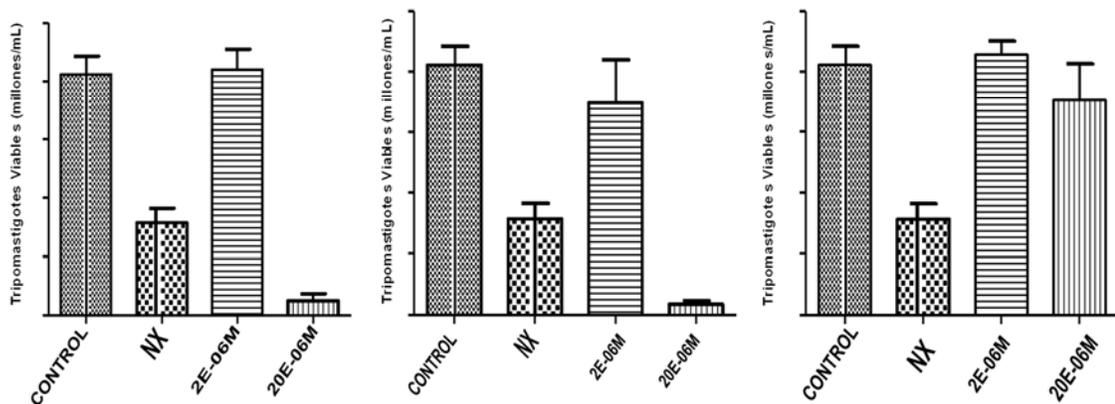
3.6.2.2 Actividad en tripomastigotes de *T. cruzi*

Con el fin de evaluar la actividad de los nitro derivados (NF y NI) sobre parásitos de *T. cruzi* en estado morfológico infectante, se procedió a realizar un estudio de viabilidad de células parasitarias clon Dm28c, empleando las metodologías descritas (apartado 2.7.2.1).

En el presente estudio fueron considerados seis nitro derivados de los más activos (**2, 3 y 4-NF**, y **5,6 y 10-NI**), más Nifurtimox y Benznidazol. Estos últimos empleados como blancos positivos con conocida citotoxicidad en tripomastigotes.

La actividad que pudiesen presentar estos nitro derivados sobre células parasitarias de *T cruzi*, fue estudiada a dos distintas concentraciones de 2 μM y 20 μM . Mientras que para Nifurtimox y Beznidasol se utilizó una única concentración de trabajo de trabajo de 20 μM (concentración conocida, a la cual ambos fármacos son activos en tripomastigotes). La información del % tripomastigotes viables luego del tratamiento con nitro derivados se muestra en la figura 43.

Figura 43: Tripomastigotes viables para los derivados 2-NF (a), 3-NF (b) y 10-NI (c) respectivamente.



En general, todos los derivados NF estudiados presentaron citotoxicidad en tripomastigotes, unos con actividad comparable a Nifurtimox, otros mucho más tóxicos que éste a la misma concentración.

Los derivados de NI no presentaron actividad citotóxica sobre tripomastigotes clon Dm28c; observándose una baja dependencia dosis/respuesta al elevar la concentración de potencial fármaco desde 2 μ M hasta 20 μ M.

La figura 43 muestra tres de los derivados estudiados, donde es posible observar una directa relación dosis/respuesta, entre la dosis de nitro compuesto empleada y la respuesta citotóxica de éstos.

Los nitro derivados estudiados mostraron una mayor citotoxicidad, o bien menor % de tripomastigotes viables, a mayor concentración aplicada de nitro derivado.

Este comportamiento que se replica para todos los nitro derivados estudiados en este ensayo. Además es preciso indicar que los seis nitro compuestos estudiados mediante este ensayo no mostraron una citotoxicidad importante en tripomastigotes al ser tratados a una concentración 2x10⁻⁶M.

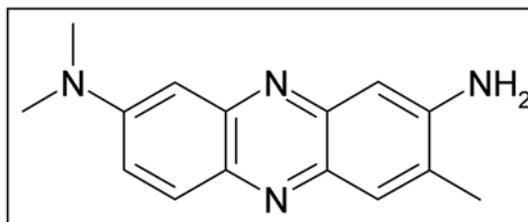
La actividad discutida recientemente para ambas familias de nitro derivados estudiados nos indica, nuevamente, que los NF derivados se exhiben como un grupo de compuestos con excelentes perspectivas como potencial fármaco en el tratamiento del mal de Chagas. Finalmente, es preciso indicar que existe una correlación en los resultados obtenidos para las dos técnicas empleadas en evaluar actividad parasitaria en *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad en epimastigotes (apartado 3.6.1.1), muestra la misma concordancia que los registrados para tripomastigotes, es decir los compuestos que resultan más atractivos terapéuticamente para el tratamiento del mal de Chagas resultan ser los derivados de NF, específicamente el derivado 3-NF que presenta baja citotoxicidad en células de símil mamífero y alta citotoxicidad en células parasitarias estado morfológico epimastigote y tripomastigote.

3.6.3. Toxicidad en células tumorales mamarias línea TA3

Los resultados recientemente expuestos muestra que los derivados de NI presentan una baja actividad antiparasitaria, sin embargo, su estructura química cumple con los requerimientos de potencial fármaco anticancerígeno (158, 159), además los resultados encontrados empleando la técnica de spin trapping sugerían actividad a través de generación de estrés oxidativo (sección 3.4). Por tanto, se propuso estudiar la actividad citotóxica de la familia de nitro indazoles sobre una línea de células tumorales mamarias, utilizando una metodología similar a la de MTT, denominada neutral red. La actividad citotóxica se evaluó a través de la captación y acumulación del compuesto vital rojo neutro (Nombre IUPAC **rojo toluileno** (figura 44), en los lisosomas de las células viables, es decir las células cuyas membranas no han sido dañadas por un determinado compuesto a ensayar.

Figura 44: Estructura química del compuesto rojo toluileno



La liberación de este colorante rojo permite evaluar los efectos de la toxicidad inmediata como daño a la membrana plasmática y pérdida a la integridad lisosomal causadas por exposiciones breves a diferentes concentraciones de compuesto. En definitiva la toxicidad de los derivados NI se determinó por la cantidad de colorante liberado por las células que previamente lo habían captado.

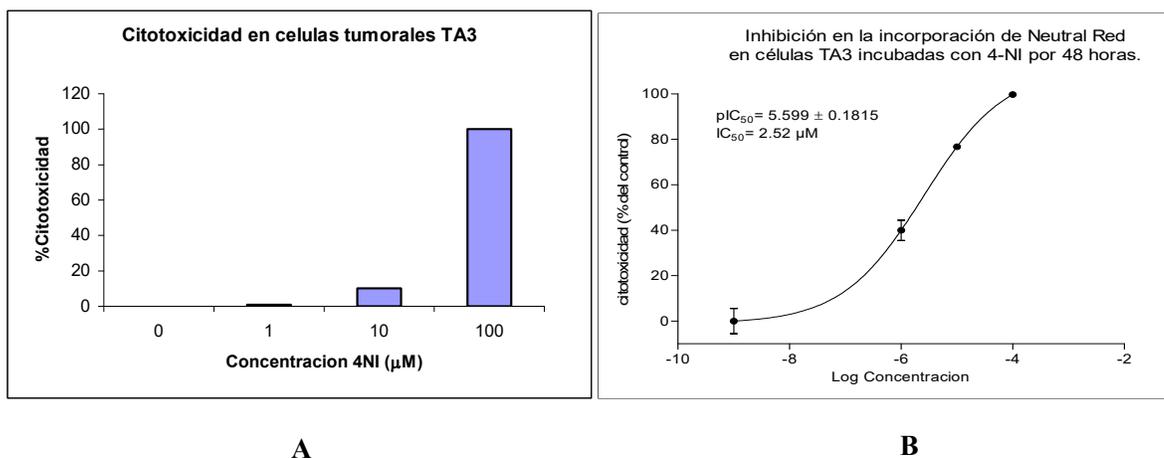
En primer lugar se propone realizar un ensayo exploratorio previo a los diez derivados NI (hidrocarburos de la forma A y B), donde se determina la actividad que presentan a una única concentración final en la celda de 100 μ M.

Esa prueba arrojó como resultado que el derivado 4-NI era el compuesto más citotóxico sobre esta línea celular, ya que a 100 μ M de concentración no existían células tumorales viables, es decir todo el rojo neutro captado había sido liberado, hecho que se interpreta como los efectos tóxicos del compuesto ensayado sobre la célula tumoral.

Una vez realizada esa prueba se realizó un segundo ensayo, donde la misma línea de células tumorales murinas (TA3) fue estudiada a tres diferentes concentraciones (1, 10 y 100 μ M) del compuesto 4-NI por triplicado.

Los resultados obtenidos en el ensayo neutral red para el derivado 4-NI se muestran en la siguiente figura 45.

Figura 45: (A) Representación de la citotoxicidad porcentual vs. Concentración de 4-NI en células tumorales de la línea TA3. (B) Representación de la citotoxicidad porcentual vs. log (concentración)



La figura 45A representa la citotoxicidad del compuesto 4-NI ensayado. Aquí se observa una clara dependencia de la dosis en cuanto a la respuesta citotóxica del derivado. La figura 45B es el ajuste matemático (log (c)) realizado a la curva dosis-respuesta de pendiente variable, en la cual se grafica el % de citotoxicidad en función del logaritmo de la concentración.

A partir de este ajuste y empleando el programa Prism5 es posible obtener el valor de IC_{50} del derivado 4-NI, este valor es de $2,5\mu M$, lo cual indica que la concentración necesaria de “potencial fármaco” para disminuir las células tumorales viables en un 50% es muy baja.

El resultado obtenido para el derivado 4-NI a partir del ensayo de neutral red resulta muy ventajoso a la hora del diseño de potenciales fármacos antineoplásicos. Además, los resultados exhibidos para el derivado 4-NI en el estudio de citotoxicidad en símil mamífero muestran que no presentan citotoxicidad sobre células de la línea RAW 264.7 (ver tabla 14), por tanto dicho compuesto se presenta con excelentes proyecciones para el uso como potencia fármaco antineoplásico selectivo, ya que es sensible a baja concentración sobre células tumorales e inactivo a esa concentración sobre células sanas. Los resultados obtenidos sobre células tumorales indicarían que el mecanismo de acción que seguiría el derivado 4-NI sobre células de la línea TA3 involucra la generación de especies reactivas de oxígeno, a través de un ciclo redox que involucra la generación de radical hidroxilo.

3.6.4 Inhibición del crecimiento parasitario

El presente estudio fue realizado sólo para la familia de NF, ya que los NI derivados han mostrado, a medida que avanza la investigación, muy baja actividad antiparasitaria, por tanto no presentan mayor atractivo para un estudio de estas características.

Con el propósito de evaluar la actividad que presentan los derivados de nitrofurano frente al crecimiento de un cultivo parasitario de *T. cruzi* (cepa Dm28c fase epimastigote) se procedió a realizar un estudio de inhibición empleando una técnica nefelométrica.

Para ello se efectuó la inoculación de los derivados a tres diferentes concentraciones (1, 10 y 100 μ M en DMSO) sobre el cultivo parasitario.

También fueron preparadas muestras control sin fármaco (cultivo parasitario + concentración $0\mu\text{M}$ de NF), las cuales permiten seguir el crecimiento del parásito sin droga.

Además se empleó un blanco, los cuales contenían el medio de cultivo de los parásitos en ausencia de parásitos y droga.

Todas las medidas realizadas tanto para los cultivos tratados con NF derivados, controles y blancos fueron realizadas por triplicado. Además se procuró que la concentración de DMSO no superara 1% en los cultivos tratados.

Las curvas obtenidas en este estudio relacionan el índice nefelométrico o densidad óptica con el tiempo de crecimiento de los parásitos (7 días).

El tratamiento de datos permite obtener la concentración de NF derivado a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de epimastigotes cepa Dm28c a 27°C . Este valor de concentración se denomina IC_{50} y se informa con su respectiva desviación estándar.

La tabla 15 muestra los valores de IC_{50} en epimastigotes y en macrófagos determinados a partir del ensayo de inhibición del crecimiento parasitario en la familia de nitrofuranos incluido Nifurtimox. Además exhibe el índice de selectividad para cada uno de ellos.

En ella es posible apreciar que los cuatro nitrofuranos poseen valores de IC_{50} comparables con Nifurtimox, indicando que estos derivados serían tan potentes como Nifurtimox en su acción sobre el crecimiento parasitario de *T. cruzi*.

Tabla 15: Valores IC₅₀ determinados para Epimastigotes y Macrófagos

Nitrofuranos	IC ₅₀ EPI (μM)	IC ₅₀ RAW (μM)	IS ^(a)
1 - NF	49.2	49.7	1.01
2 - NF	48.5	8.14	16.8
3 - NF	54.3	4.00·10 ⁴	737
4 - NF	48.5	10.0	20.6
Nifurtimox	22.3	92.7	4.16

(a) IS = IC₅₀ RAW/IC₅₀ EPI

En la sección 3.6.1 se determinó la citotoxicidad de los derivados de nitrofurano y nitroindazol sobre células mamíferas de la línea RAW 264.7, donde la citotoxicidad fue evaluada en referencia al control y expresada como IC₅₀. Este valor es utilizado nuevamente en esta sección con el fin de estimar la relación entre la citotoxicidad y la actividad registrada.

Para evidenciar la citotoxicidad selectividad hacia *T. cruzi* se determinó el índice de selectividad (IS), definido como el cociente entre IC₅₀ de células mamíferas y el IC₅₀ en los diferentes estadios del parásito, en nuestro caso corresponde al IC₅₀ epimastigote de *T. cruzi*. Entre mayor sea esta relación, mayor será el valor de índice de selectividad y por tanto la selectividad frente a *T. cruzi*. La tabla 15 exhibe los IS calculados para la familia de nitrofuranos derivados.

En ella es posible observar que en general todos los derivados son selectivos frente a *T. cruzi* en relación a las células mamífera, si se comparan con Nifurtimox. Además se observa que el derivado 3-NF presenta un excelente perfil de selectividad con un valor de $IS > 700$, siendo el compuesto más selectivo estudiado, dos órdenes de magnitud mayores que su droga parental

3.6.5 Efecto del consumo de oxígeno y reciclaje redox

Para estudiar los efectos en el consumo de oxígeno de parásitos de *T. cruzi* e identificar la posible generación de estrés oxidativo de estos compuestos. Se propuso realizar un estudio, *in vitro*, del consumo de oxígeno en células parasitarias.

Este estudio permite evaluar, si el mecanismo de acción antiparasitario, que siguen los compuestos derivados NF, implica la generación de especies reactivas de oxígeno a través de un ciclo redox, al igual que Nifurtimox.

Todos los **derivados NF** fueron estudiados mediante esta técnica, donde es posible observar el efecto de la serie de derivados NF sobre la velocidad de consumo de oxígeno en células de epimastigotes clon Dm28c.

Para este ensayo se utilizaron seis concentraciones diferentes para cada NF que corresponden al factor de $1 \cdot IC_{50}$ hasta $27 \cdot IC_{50}$. Todas las medidas fueron realizadas registrando en primer lugar un control sin fármaco, luego fueron adicionados los derivados de NF a las concentraciones descritas.

Para analizar el efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno se realizó un análisis comparativo entre las magnitudes de las pendientes registradas para cada control y para cada derivado estudiado. Las pendientes obtenidas en este ensayo son informadas empleado la unidad %O₂*s⁻¹.

La tabla 16 muestra las pendientes calculadas para cada NF derivado a una concentración de 0,5mM, además informa el valor de las pendientes para los controles respectivos y también los valores de pendiente para la respuesta de un inhibidor reversible de la respiración, KCN (0.1M).

Tabla 16: Velocidad de consumo de oxígeno para los derivados de NF y Nifurtimox

Compuesto	Pendientes (% O ₂ *s ⁻¹)			Efecto del consumo de O ₂ (%)	Factor IC ₅₀ EPI
	Control Dm28c	NF derivado	KCN		
1 - NF	0.059	0.056	0.004	Disminuye 5.912	5.0
2 - NF	0.040	0.041	0.004	Aumenta 3.030	5.0
3 - NF	0.015	0.026	0.004	Aumenta 67.763	5.0
4 - NF	0.024	0.030	0.004	Aumenta 24.472	5.0
NFX	0.029	0.043	0.004	Aumenta 47.440	27.0

Los valores que exhibe la tabla 16 revelan que el comportamiento que predomina en los NF derivados está ligado a un aumento en la velocidad del consumo de oxígeno, similar al efecto observado para Nifurtimox. Este comportamiento se observa marcadamente en los derivados 3-NF y 4-NF, mientras que para los derivados 1-NF y 2-NF no se observó

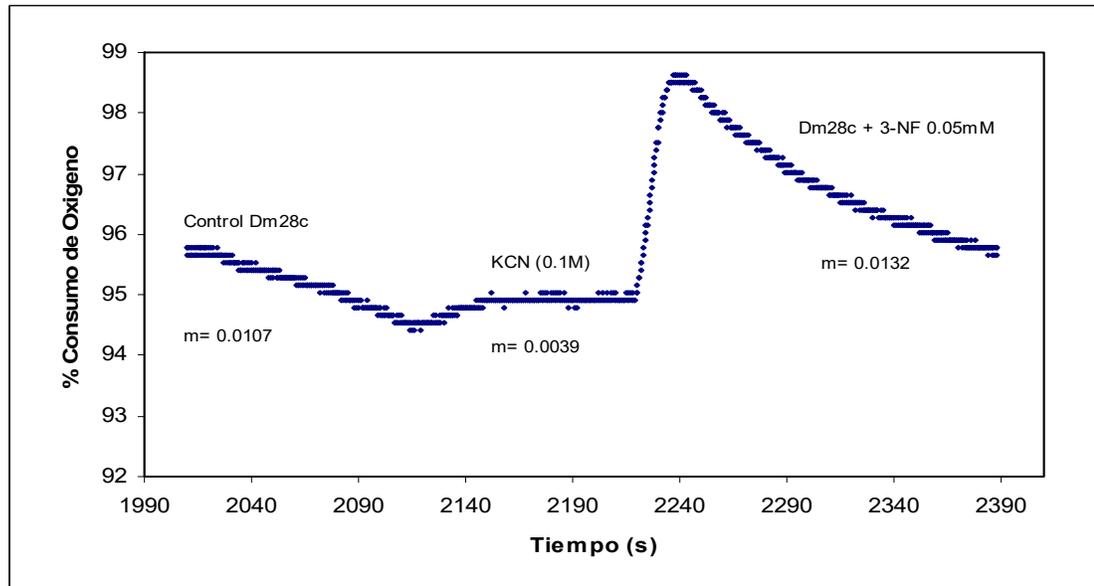
un efecto considerable de aumento o disminución del consumo de oxígeno, a la concentración de trabajo.

Basados en la variación% de las pendientes obtenidas en este estudio podemos concluir que el aumento en el consumo de oxígeno de las células parasitarias tratadas con los derivados NF es atribuido a la generación de reciclaje redox. Con el fin de discriminar si el efecto observado corresponde a la generación de estrés oxidativo a través de ciclaje redox provocado por los nitro derivados estudiados, o bien corresponde al proceso de respiración mitocondrial propio de la célula parasitaria epimastigote.

Se propuso utilizar un inhibidor de la respiración mitocondrial, en este caso se empleó una solución 0,1 M de cianuro de potasio (KCN 0,1M).

La figura 46 muestra las medidas sucesivas de consumo oxígeno en la cámara que fueron registrados a lo largo del tiempo que duro cada ensayo. Además exhibe las medidas consecutivas realizadas al control, al inhibidor de la respiración y al nitro derivado.

Figura 46: Representación gráfica del experimento de oxigrafía realizado al derivado 3-NF a una concentración de 0.05mM. Los valores de pendiente (m) se encuentran expresados en %O₂*s⁻¹.



Aquí se destacan dos procesos significativos el primero tiene relación con el cambio de pendiente desde el control hasta la adición del inhibidor, esta variación indica que el registro de consumo de oxígeno porcentual en el control puede inhibirse ($\approx 64\%$) al adicionar $10\mu\text{L}$ de KCN $0,1\text{M}$ (concentración final del inhibidor en la cámara de oxigrafía $1,6\text{ mM}$)

El segundo se relaciona con la adición del derivado 3-NF en la cámara, donde el incremento de la pendiente en el último tramo, luego de inhibida la respiración mitocondrial, se atribuye a un fenómeno de reciclaje redox, pues se observa que la pendiente de la última etapa es mayor a la del control sin fármaco. Además es posible observar que KCN actúa como un inhibidor reversible de la respiración mitocondrial.

Finalmente fue posible observar para todas las concentraciones trabajadas que los derivados NF con cadenas de carbamato (2-NF y 3-NF) tuvieron un comportamiento comparable a Nifurtimox, característico de un mecanismo en el cual intervienen especies reactivas de oxígeno (ERO's) generadas en el ciclo redox.

3.6 Discusión global

La presente sección tiene por finalidad englobar los resultados más relevantes que se obtienen a partir de los estudios experimentales y teóricos, intentando identificar las propiedades distintivas de estos nuevos nitrocompuestos, lo cual permita esbozar un mecanismo de acción antichagásico de los compuestos estudiados en esta tesis.

Se evaluó la actividad antiparasitaria de dos familias de compuestos nitrofuranos (NF) y nitroindazoles (NI), sobre células de *Trypanosoma cruzi*, además de su capacidad generadora de radicales libres capaces de promover estrés oxidativo a nivel celular como parte de su mecanismo de acción.

Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos muestran a los derivados de NF como la familia más activa sobre células parasitarias de *T. cruzi* (epimastigotes y tripomastigote) y que presentan una potencia citotóxica en ambos estadios parasitarios, similar o mayor que Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ). La familia de los NF evaluados, además es capaz de inhibir el crecimiento parasitario a concentraciones muy próximas a las de sus drogas de referencia (NF-IC₅₀≈50μM (ver tabla 15), NFX-IC₅₀≈25μM).

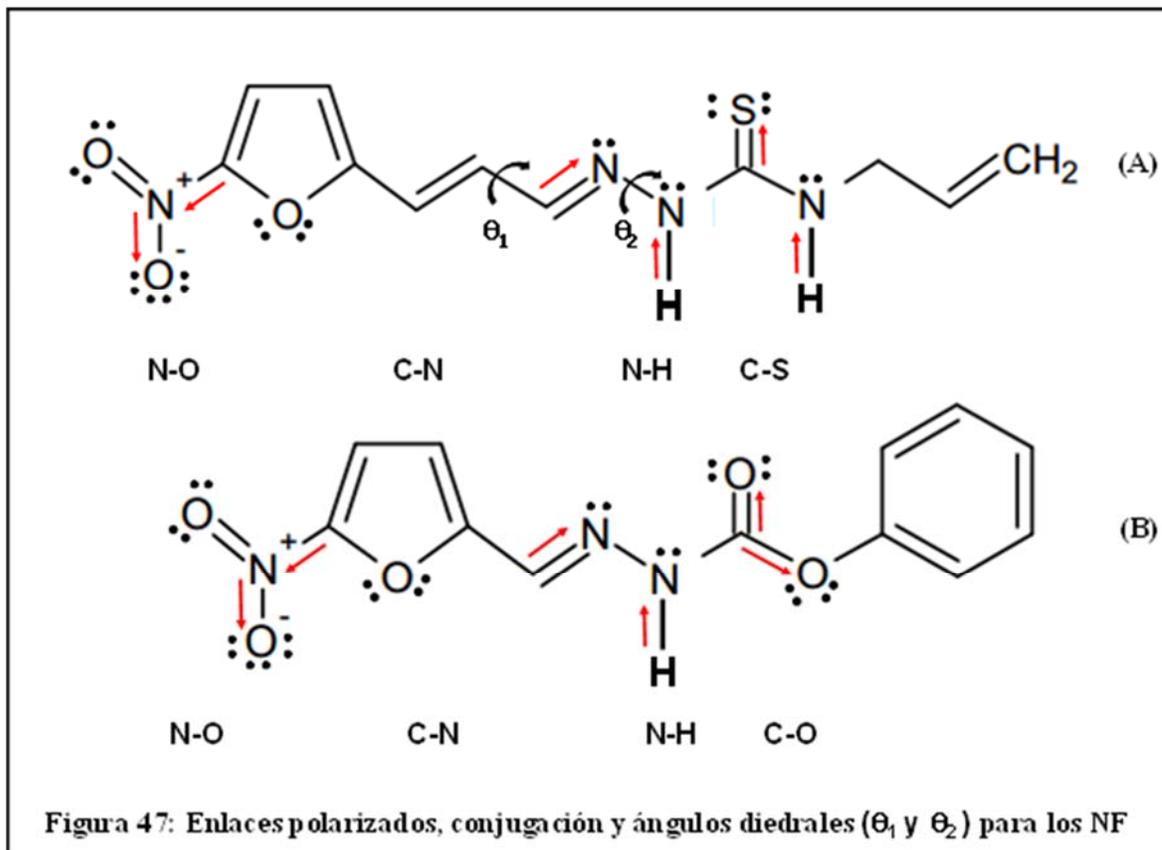
El mismo grupo de compuestos estudiados, presenta una baja toxicidad en glóbulos blancos (utilizados como células “normales de referencia”) y consecuentemente una alta selectividad, muy deseable desde su potencial aplicación para el desarrollo de fármacos. Indicativo de lo anterior: al evaluar el comportamiento citotóxico de estos nitrocompuestos en células macrófagos (RAW 264,7), se establece que (al comparar los valor de IC₅₀) los NF evaluados despliegan una citotoxicidad similar a NFX y BNZ,

destacando el compuesto 3-NF el cual exhibe un elevado índice de selectividad ($IS > 700$) en comparación a los registrados para NFX y BNZ ($IS > 20$).

También fue posible establecer que los NF aumentan la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos epimastigotes, lo cual indicaría que su actividad antiparasitaria estaría ligada a la generación especies reactivas de oxígeno en los parásitos.

Los resultados exhibidos permiten establecer que la generación de especies radicales podría ser uno de los mecanismos determinante en la actividad citotóxica, y que la nitroreducción es parte de su mecanismo de acción. Esta capacidad generadora de radicales libres oxigenados encuentra estrechamente ligada a la estructura química del compuesto y a sus propiedades físico-químicas.

Los NF estudiados se encuentran conformados por un anillo heteroatómico (anillo furánico), provisto de un grupo nitro en la posición C₅ y sustituidos en la posición C₂ con cadenas de tiosemicarbazona o carbamato respectivamente (ejemplo Figura 47 (A y B)). Para describir algunas de las propiedades más relevantes de estos compuestos se muestran como ejemplo los derivados 2-NF y 3-NF (Figura 47-A y 47-B respectivamente).



El grupo nitro (-NO_2) presente en la estructura tiene una influencia importante tanto sobre el anillo furano y su densidad de carga, como en las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Este grupo presenta una diferencia de electronegatividad (ΔEN) entre los átomos que lo constituye provocando la aparición de ciertos efectos de polarización y deslocalización electrónica. Uno de estos efectos es el inductivo (-I), aquí la nube electrónica del enlace sigma N-O heteroatómico, no es uniforme sino, que está ligeramente desplazado hacia el átomo más electronegativo (EN) provocando un estado

permanente de polaridad, donde el átomo más EN (O) tiene una densidad carga negativa, mientras que el átomo de N adquiere una diferencial de carga positiva.

Este hecho, sumado a la conjugación de los enlaces $O=N-O^-$, hacen de éste un grupo desactivante, pues, su efecto inductivo $-I$ sobre el anillo furano es retirando densidad electrónica del sistema aromático (π), así el flujo neto de electrones desde y hacia el sustituyente esta también determinado por este efecto e influyen en su capacidad para reducirse y por tanto en su potencial redox.

Sin embargo, y a pesar que este efecto es permanente en el grupo nitro y en el resto de los enlaces polarizados de la molécula, el efecto inductivo, tal como se espera, decrece rápidamente al aumentar la distancia al origen del desplazamiento electrónico, y por tanto su influencia es menor en comparación a otros efectos como el mesomérico. La figura 47 muestra los enlaces polarizados (\rightarrow) más significativos de la molécula y que logran dar cuenta de su mecanismo de reducción y de sus características espectroscópicas.

Al analizar las estructuras de los nitrofuranos se observa una hiperconjugación importante tanto en el anillo nitrofurano como en la cadena sustituyente, así como átomos con pares de electrones libres, lo que se traduce en un marcado del efecto resonante. Aquí los dobles enlaces conjugados, interaccionan entre sí, y el resultado de esta interacción es una estabilización adicional de la molécula (a través de la contribución de las estructuras resonantes).

Este efecto permite explicar razonablemente la deslocalización electrónica observada en los patrones hiperfinos de los espectros de resonancia de espín electrónico (EPR), así como las isosuperficies de la densidad de espín y la estabilidad de la especie nitro radical. Empleando voltamperometría cíclica (VC) en medio aprótico se determinó el potencial de reducción (E_{pc}) para los NF vs SCE. Aquí se observó, que las características estructurales distintivas de los NF, permitían que éstos se redujeran a E_{pc} menores a los registrados para la primera cupla de reducción de NFX. Este hecho estaría indicando que, si el mecanismo de acción antichagásico de los NF involucra la especie nitro radical, el E_{pc} podría ser un buen referente de su actividad biológica.

Por tanto, por una parte es importante que nuestro potencial fármaco antichagásico cuente con un grupo electro-activo capaz de reducirse a bajo potencial redox ($E_{pc\ NF} \approx -0,6V$ / $E_{pc\ NFX} \approx -0,9V$ vs. SCE) y un sistema (esqueleto) que permita la estabilización de la especie radical por conjugación, confiriéndole características que pueden ser cruciales en la actividad biológica de los NF. El análisis en profundidad de estos conceptos se presenta a continuación empleando cálculos teóricos como una valiosa herramienta que permita racionalizar los resultados experimentales obtenidos.

Otra característica importante de estos compuestos se encuentra asociada a su cadena sustituyente enlazada al C₂ del anillo nitrofurano y las fracciones que la constituyen. Las cadenas laterales de tiosemicarbazona y carbamato poseen cierta similitud estructural y por tanto propiedades semejantes, las cuales se discuten a continuación:

- 1) Ambas cuentan con un grupo hidrazona ($RC=NNR$) en su estructura, un largo de cadena apropiado y ángulos diedros (ver Figura 47), que posibilitan a la cadena sustituyente a posicionarse fuera del plano formado por el nitroaromático, confiriéndole libre rotación y la posibilidad de diversos conformeros estables.
- 2) Otra similitud entre las cadenas laterales es que cuentan con un enlace doble $RC=O$ (grupo carbonilo) y otro enlace doble $RC=S$, que podrían asumirse de similares características, ya que ambos elementos (O y S) pertenecen al mismo grupo del sistema periódico.

Los electrones del doble enlace unen dos elementos de electronegatividades bastante diferentes y por ende no se comparten por igual; la nube electrónica se dirige con más fuerza hacia el átomo de O y/o S electronegativo, produciendo una polaridad permanente de los enlaces $C\rightarrow O$ y $C\rightarrow S$ (Efecto inductivo).

Ya que la EN del O es mayor que la del S la polarización del enlace $C=O$ es mayor que la del enlace $C=S$ y por tanto la longitud de enlace de este último es mayor. Este efecto inductivo influye en las magnitudes de las constantes de acoplamiento hiperfinas (hcc) obtenidas desde el análisis de EPR, así como también lo hace, con una influencia mayor, el efecto mesomérico.

La polarización de enlace, antes mencionada, genera zonas de densidad de carga positiva y negativa que en algunos casos determinan las propiedades física y químicas de los compuestos que las contienen ya que generan regiones propensas a un ataque

nucleofílico y/o electrofílico, las cuales determinan la reactividad y estabilidad de la especie nitro radical.

La presencia de este tipo de grupos también influye en la acidez del átomo vecino al carbono sp^2 , en nuestro caso aumenta la acidez del nitrógeno adyacente (disminución del pK_a) o más bien aumenta la acidez del enlace N-H. Ambos hechos indican que este tipo de estructuras facilita la existencia de un hidrógeno lábil capaz de protonar el grupo nitro, y formar intermediarios como los propuestos en el mecanismo de reducción electroquímico de estos compuestos (mecanismo de autoprotónación).

3) Las estructuras de NF propuestas en este estudio también cuentan, al término de su cadena lateral, con una región formada por un anillo aromático o un sistema conjugado rico en electrones π , es decir de alta densidad electrónica. Esta región tiene la posibilidad de situarse fuera del plano donde se encuentra el anillo nitrofurano, debido a que los ángulos diedros le permiten adoptar diferentes conformaciones. En este mismo orden de ideas es que realizó un estudio conformacional de los NF, empleado la metodología de cálculo DFT, tanto a las especies en sus formas neutras como radical, ambas en el vacío.

En él fue posible observar que los confórmeros de mínima energía obtenidos para los NF radicalarios tendían a plegar su cadena lateral en torno al anillo nitrofurano, facilitando la interacción del electrón desapareado, que preferentemente debiese encontrarse en el N del grupo nitro, con los núcleos de N de la cadena lateral.

Esta conformación plegada estabilizada podría permitir transferir a través del espacio densidad electrónica desde el grupo nitro hacia la cadena sustituyente traduciéndose en hcc mayores ciertos núcleos de la cadena lateral que en N del nitro. Este hecho también es congruente con la isosuperficie generada para de la densidad de espín de los NF.

Con la finalidad de entregar resultados con un nivel de precisión aceptable es que se propone utilizar la teoría funcional de la densidad (DFT) como un poderoso método para el estudio de la reactividad y estabilidad de los NF tanto en el vacío como con la influencia de un solvente aprótico, dimetilsulfóxido (DMSO). Así desde las ecuaciones de DFT se propone un nuevo método para determinar simultáneamente las funciones de Fukui electrofílica y nucleofílica ($f^-(r)/f^+(r)$) denominado descriptor dual (160), donde un centro altamente electrofílico/ nucleofílico es un sitio que presenta un alto valor de la función de Fukui asociado (138).

La Figura 48 muestra la representación gráfica de las funciones de Fukui $f^+(r)/f^-(r)$ para el radical 3-NF tanto en el vacío como en DMSO.

Las regiones coloreadas celeste muestran las zonas más propensas a recibir una ataque electrofílico (E^+), es decir representan la función de Fukui electrofílica $f^-(r)$. Del mismo modo las regiones coloreadas grises muestran zonas más propensas a recibir una ataque nucleofílico ($Nu:^-$), por tanto representan la función de Fukui nucleofílica $f^+(r)$.

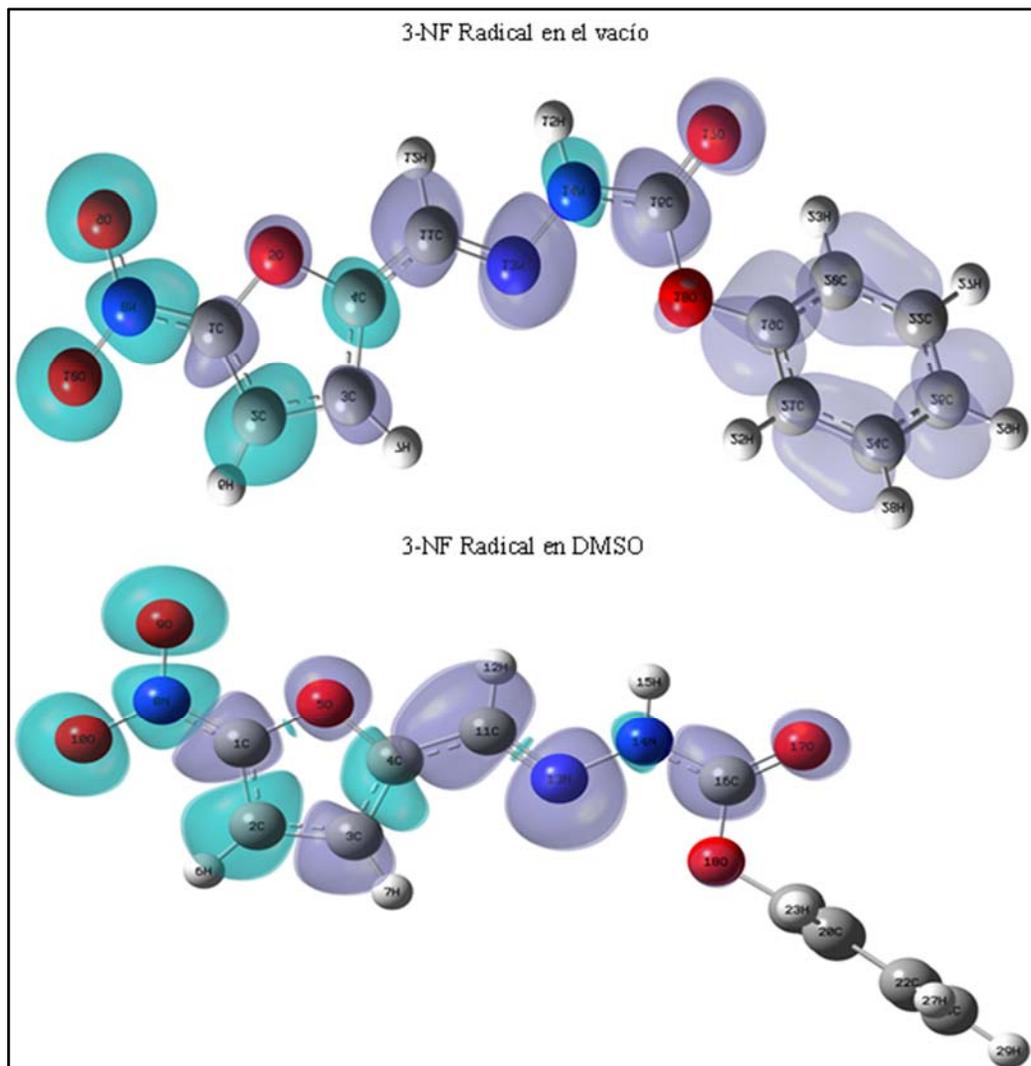


Figura 48: Representación gráfica de las funciones Fukui $f^+(r)/f^-(r)$ en el vacío y en solvente.

El compuesto 3-NF radical en el vacío (ver figura 48) muestra diversas funciones de Fukui tanto $f^+(r)$ como $f^-(r)$ a lo largo de toda la molécula, determinadas desde el análisis de descriptor dual, donde se observa que las magnitudes de las $f^+(r)$ son más importantes que las observadas para $f^-(r)$ indicando que existen varias regiones en la molécula susceptibles a un ataque nucleofílico. La figura 48 en el vacío también muestra regiones ó conjunto de átomos que se observan más reactivos a un ataque electrofílico, como era de esperarse, es el grupo nitro radical ($^{\cdot}\text{O}_9\text{-N}_8\text{-O}_{10}$) con funciones $f^-(r)$ apreciables y constantes de acoplamiento hiperfinas (hcc) esperables para este tipo de moléculas, sin embargo también se observan otros núcleos con funciones $f^-(r)$ importantes, si se comparan con las obtenidas para el grupo nitro ($\text{C}_2\text{-C}_4$ anillo nitrofurano y N_{14} de la cadena lateral). Los antecedentes señalados implican que existe una interacción del electrón desapareado con diferentes núcleos de la molécula, pues éste se encuentra más bien deslocalizado a través de ésta mediante conjugación.

El comportamiento recientemente descrito logra explicar razonablemente las magnitudes de las constantes de acoplamiento hiperfinas (hcc) obtenidas para estos compuestos a partir del cálculo DFT en el vacío, donde núcleos de N e H pertenecientes a la cadena lateral y no al anillo nitrofurano (Ar-NO_2) poseen valores elevados de hcc respecto a lo esperado (mayores hcc en el N de nitro y en los H del anillo cercanos al nitro).

La Figura 48 en el vacío muestra para el N₈ del Ar-NO₂ y el para N₁₄ de la cadena lateral valores de $f^-(r) < 0$, lo cual implica que son sitios reactivos a un ataque electrofílico, por tanto corresponde a una región de la molécula que tiene acumulada carga o bien acumula carga negativa con mayor facilidad. Este efecto tiene una influencia directa sobre las magnitudes de las hcc, pues indica que el electrón desapareado pasa tiempo en las regiones que comprenden estos átomos obteniéndose así hcc mayores en núcleos distintos a los del grupo nitro. Del mismo modo es posible explicar la hcc para el H₁₅ que se encuentra directamente enlazado al N₁₄ nucleófilo.

Otro hecho interesante de analizar es el efecto del solvente en la representación de las funciones de Fukui $f^+(r)/f^-(r)$ y por tanto en la reactividad y estabilidad de la especie nitro radical (RNO₂[·]). El radical 3-NF en DMSO muestra que las funciones de Fukui $f^+(r)$ y $f^-(r)$ tienden a ser más significativas o mayores en el Ar-NO₂ y en parte de la cadena lateral, mientras que en el grupo terminal fenilo ya no se observa el fenómeno visto en el vacío.

Además las funciones de Fukui $f^+(r)$ y $f^-(r)$ tienden a concentrarse más bien en la región Ar-NO₂, donde las $f^-(r)$ de mayor relevancia están centradas en el grupo nitro radical ([·]O₉-N₈-O₁₀) y en los núcleos de C₂ y C₄ pertenecientes al anillo nitrofurano. Por tanto, es posible establecer que el efecto del solvente aprótico sobre los nitro radicales es por una parte, hacer más reactiva la especie nitro radical (más nucleófilo), incrementando su $f^-(r)$, y por otra parte, como era de esperarse, estabiliza la especie nitro radical tendiendo

a centrar mayormente el radical en el anillo nitrofurano (el electrón desapareado pasa más tiempo en Ar-NO₂), estableciendo una especie nitro radical más estable.

Como se estableció con esta metodología las regiones con $f^-(r)$ importantes (valores altos) hacen de esa zona o región de la molécula más reactiva, más nucleófila, lo cual puede relacionarse directamente con el potencial de reducción de estos compuestos obtenidos desde voltamperometría cíclica (VC) en DMSO. Los antecedentes recientemente descritos logran explicar que contar con regiones con elevadas $f^-(r)$ permiten a las moléculas (en estas zonas) acumular carga, lo cual favorece la reducción haciendo que ésta sea más fácil y por tanto que los potenciales de reducción de estos compuestos sean menores a los registrados para la primera cupla de reducción de Nifurtimox (NFX). En éste mismo orden de ideas es que resulta interesante observar la diferencia en los potenciales de reducción de los compuestos radicales 2-NF (sustituyente cadena tiosemicarbazona) y 3-NF (sustituyente cadena carbamato) en DMSO ($E_{pc2-NF} = -0,77$ V / $E_{pc3-NF} = -0,56$ V vs SCE). El radical 2-NF (Figura no mostrada) exhibe incrementadas las $f_+(r)$ como efecto del solvente tanto en núcleos pertenecientes al Ar-NO₂ como en núcleos de la cadena sustituyente, mientras que para el radical 3-NF las $f_+(r)$ que se observan importantes están principalmente concentradas en el Ar-NO₂ y una pequeña fracción en la cadena lateral (si se compara con la especie en el vacío).

Este comportamiento indicaría que los NF con cadenas de carbamato resultarían más fácilmente reducibles en medio aprótico ya que la región Ar-NO₂ de la especie radical estable está provista de diversas zonas reactivas al ataque de un nucleófilo (Nu:⁻).

Experimentalmente observamos que si bien toda la familia de NF se reduce más fácilmente que NFX los derivados sustituidos con cadenas de carbamato se reducen a los menores potenciales de reducción ($E_{pc3-NF} = -0,56$ V/ $E_{pc4-NF} = -0,60$ V vs SCE). Esta característica indicaría que estos compuestos podrían ser capaces de reducirse en medio biológico mediante la acción de nitroreductasas y promover estrés oxidativo a nivel celular con mayor facilidad que las drogas actualmente utilizadas, dada sus características estructurales y propiedades electrónicas.

Finalmente podemos establecer que un compuesto antichagásico debe contar con tres fracciones fundamentales en su estructura química (ver figura 49) que dan cuenta de la relación estructura-actividad:

- I) Una región aromática plana formada por un anillo nitrofurano.
- II) Un sustituyente imino unido al C₂ del anillo nitrofurano y a lo menos un ángulo diedro que le confiera libre rotación a la cadena.
- III) Una región fuera del plano formado por un anillo o bien un sistema conjugado rico en electrones π .

Estas características estructurales definen la reactividad y estabilidad de la especie nitro radical, y por tanto, juegan un rol crucial a la hora de evaluar la actividad antichagásica de los NF basados en un mecanismo de acción que involucra la generación de nitro radicales estables y reactivos que inducen estrés oxidativo a nivel celular.

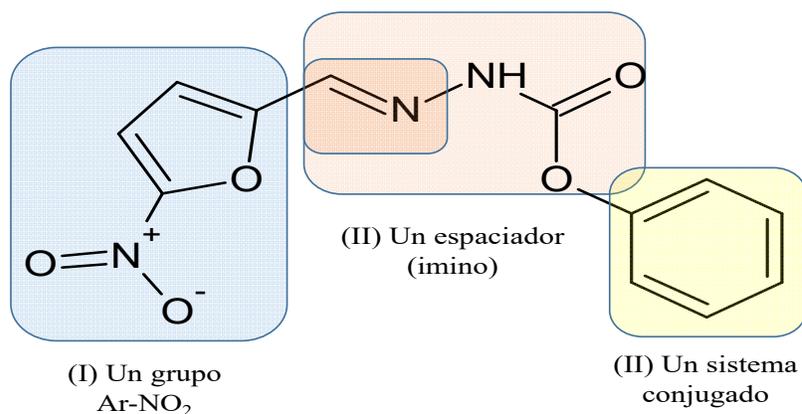


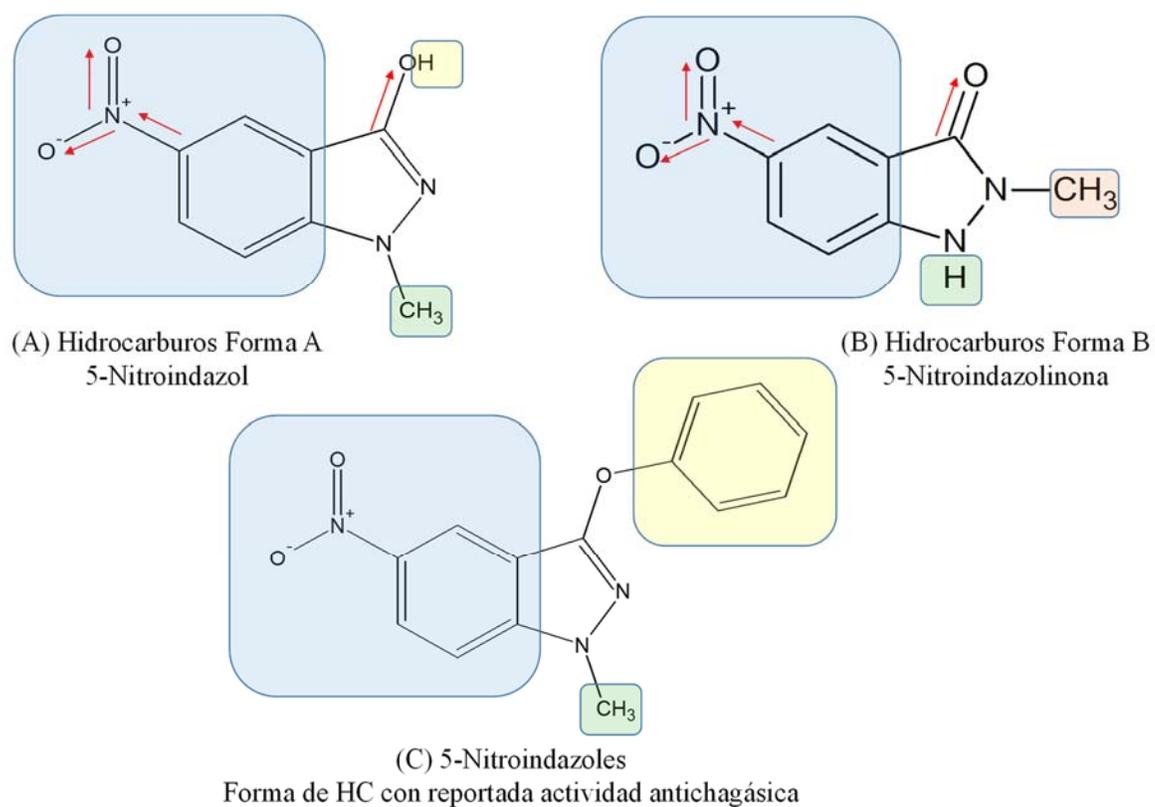
Figura 49: Estructura química de NF propuesta como modelo de farmacóforo sobre *T. cruzi*.

Por otra parte, la estructura química de los nitroindazoles (NI) estudiados en esta tesis presenta varias similitudes con las estructuras de los NF y por tanto, ciertas propiedades fisicoquímicas describen un comportamiento similar.

Ambas familias cuentan con el grupo nitro (-NO₂) enlazado a un sistema aromático (Ar-NO₂), hecho que facilitaría la obtención de la especie nitro-radical (Ar-NO₂•⁻). Además el sistema aromático permitiría la deslocalización del electrón desapareado, estabilizando la especie nitro-radical mediante un efecto mesomérico.

Como se discutió anteriormente el nitro (-NO₂) es un grupo electro-atractor, el cual posee un efecto inductivo I- sobre el anillo aromático retirando densidad electrónica del sistema pi (π). Este efecto permanente influye en su capacidad para reducirse y por tanto en su potencial redox.

La Figura 50 (A y B) exhibe dos ejemplos de derivados de NI estudiados, uno de cada forma de hidrocarburo y la estructura (C) representa el esqueleto general de derivados de 5-nitroindazol con reportada actividad antichagásica.



(→) Enlaces polarizados en el grupo nitro, (Cuadro azul) Nitro-aromático común, (Cuadro verde, amarillo y verde, rojo) Sustituyentes en posiciones del anillo indazol 1,3 y 1,2 respectivamente.

Figura 50: (A) Compuesto 1-NI- HC de Forma A, (B) Compuesto 6-NI-HC de Forma B y (C) 5-Nitroindazoles con reportada actividad en *T. cruzi*.

Como se plantea en la hipótesis las semejanzas estructurales de los NF y los NI con los fármacos de referencias empleados para el mal de Chagas permitiría gatillar un mecanismo de acción distintivo para cada familia.

Así, a partir de los estudio biológicos, fue posible establecer que los derivados de NI presentaban una baja citotoxicidad en células símil mamífero ($IC_{50} \gg 200 \mu M$ en macrófagos), hecho interesante a la hora de buscar un fármaco más selectivo; sin embargo la actividad citotóxica registrada en células parasitarias de *T. cruzi* era menor en comparación a las obtenidas para las sus drogas de referencia (NFX y BNZ), y también para los derivados de NF.

Este hecho desalentó ensayos biológicos más profundos en células de *T. cruzi*, sin embargo abrió un conjunto de interrogantes que plantean en términos simples, ¿Por qué, si ambas familias de compuestos presentan características estructurales similares, tienen actividad antichagásica totalmente opuesta?

Responder esta interrogante no es sencillo, sin embargo, a través de los estudios realizados experimentales y teóricos se pretende dar respuesta a ésta.

Como se ha discutido ampliamente en el capítulo I el mecanismo de acción del NFX involucra la producción de radicales libres, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos que afectan al parásito (161) y Benznidazol actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria y, se ha demostrado que los metabolitos reducidos de este fármaco unidos covalentemente a macromoléculas interaccionan con el

DNA del parásito (8). Por tanto resulta interesante estudiar la capacidad para reducirse en medio aprótico que presenten estos compuestos.

Usando VC en DMSO se determinó el potencial de reducción (E_{pc}) para los NI ($E_{pc} > -1,13V$ vs. SCE para los diez NI). Aquí se observó, que las características estructurales de estos compuestos, permitían que éstos se redujeran a E_{pc} mayores a los registrados para la primera cupla de reducción de NFX y BNZ ($E_{pc} \approx -0,91V$ y $E_{pc} \approx -1,02V$ vs SCE respectivamente) y también mayores a los obtenidos para la familia de NF, por tanto los NI se reducirían con menor facilidad que los fármacos de referencia. Este hecho podría interferir con su actividad biológica e inhibir un mecanismo que implique especies radicales. La diferencia sustancial en los potenciales de reducción de los NF y NI puede deberse al tipo de sistema aromático enlazado al grupo nitro.

Para los NF el compuesto aromático es un heterociclo: el furano, mientras que para los NI es el anillo indazol, sin embargo, la interacción del grupo nitro en los NI es directa con la fracción bencénica del indazol y no con la fracción pirazol de éste mismo. Por tanto, el carácter nitro aromático, de éstos está determinado más por la fracción bencénica que la indazólica.

Este hecho es determinante a la hora de evaluar la estabilidad y reactividad del $Ar-NO_2$. El sistema cíclico del benceno provisto de electrones π capaces de deslocalizarse, le confieren a éste una gran estabilidad (menos reactivo). Esta propiedad conocida como aromaticidad del benceno es máxima para este compuesto, por tanto se considera 100% aromático.

El fenómeno descrito implica que el Ar-NO₂ derivado del benceno será menos reactivo al ataque de un nucleófilo (Nu:⁻), por lo cual obtener la especie Ar-NO₂^{•-} sería energéticamente menos favorable lo cual explicaría los altos potenciales de reducción de NI si se comparan con los NF.

Del mismo modo el furano (compuesto heteroaromático π -excedente), presenta una menor aromaticidad, por tanto posee menor energía de estabilización respecto del benceno haciendo de esta una molécula más reactiva.

A partir de los conceptos discutidos y basados en la baja actividad antichagásica determinada para los NI, es posible proponer que, para que un derivado de NI sea activo sobre *T. cruzi* deben considerarse propiedades que apunten hacia un objetivo distinto al de un mecanismo que implique la nitro reducción y posterior ciclaje redox. Las actuales investigaciones sobre nuevos compuestos derivados de NI apuntan a encontrar un blanco terapéutico ideal, un inhibidor específico contra *T. cruzi* que no altere el metabolismo del hospedero mamífero. Las importantes diferencias existentes entre el metabolismo de tripanosomátidos con respecto a su hospedero mamífero; ha tomado una gran importancia en el diseño racional de fármacos especie-específicos. La propia naturaleza de *T. cruzi* ha permitido un avance importante en esta búsqueda, donde las diferencias más exploradas incluyen las enzimas glucolíticas compartimentalizadas en el glicosoma (162), el sistema de tripanotión (163), la cruzipaina (164) y la síntesis del ergosterol (165).

Considerando lo anterior es posible establecer que el mecanismo de acción de derivados de NI activos sobre *T. cruzi* podría involucrar una inhibición enzimática y por tanto los requerimientos estructurales estarán en concordancia con la vía enzimática que se desea intervenir.

En la figura 50 (C) es posible observar que existen similitudes estructurales entre estos NI activos en *T. cruzi* y los NI estudiados en esta tesis. La principal similitud es que ambas familias cuentan con la fracción 5-nitroindazol (cuadro azul), donde los NI estudiados de la forma de hidrocarburo A (HC-FA) son los que muestran una mayor similitud estructural ya que los derivados de la forma B (HC-FB) presentan un grupo cetona unido al anillo (nitroindazolinona), el cual no se encuentra presente en gran parte de los derivados que reportan actividad antichagásica. Otra similitud es la sustitución de los HC-FA en las posiciones 1 y 3 del anillo nitroindazol respecto del modelo de farmacóforo propuesto (ver Figura 50).

Sin embargo, y a pesar de las similitudes descritas toda la variedad estructural de NI estudiados presenta en la posición 1 la fracción -O-R, donde el grupo R (cuadro amarillo) mayormente es hidrógeno (H) y carece de grupos grandes y/o de alta densidad electrónica como el fenilo, el cual sí está presente en el modelo sugerido en la Figura 50 (C) para NI activos sobre *T. cruzi*.

Este hecho estaría indicando que la sustitución en posición 1 del anillo indazol es importante a la hora de diseñar un fármaco antichagásico que actué a través de alguna vía enzimática imprescindible para la supervivencia del parásito, el cual debe considerar un grupo –O-R, donde R necesariamente sea un grupo: cíclico rico en electrones π o bien extendido con numerosos enlaces dobles que confieran propiedades similares a las de un sistema aromático.

El hecho de carecer de una fracción aromática o similar en los NI estudiados podría explicar la baja actividad antiparasitaria de estos compuestos, ya que un fármaco diseñado para actuar a través de un mecanismo inhibidor enzimático requeriría tanto la especie Ar-NO₂ como un grupo –O-R- en posición 1, donde R sea un grupo aromático.

Además la sustitución en posición 3 requiere un grupo pequeño con baja densidad electrónica capaz de donar electrones (introducir carga en el anillo), como lo es el grupo metilo (-CH₃).

Finalmente es importante mencionar que la hipótesis propuesta, basada en las diferencias estructurales presentes en los NF y NI, que pudiesen gatillar un mecanismo de acción distinto para cada familia de compuestos fue cumplida. También es necesario precisar que la utilización conjunta de las técnicas empleadas, tanto experimentales como teóricas, han permitido esbozar un mecanismo de acción antichagásico posible para cada una de las familias estudiadas. Además permitieron señalar y/o proponer determinadas características estructurales y propiedades fisicoquímicas atractivas de considerar en el diseño de un nuevo fármaco antichagásico.

CONCLUSION

El estudio de voltamperométrico en DMSO realizado a las familias derivadas de nitrofurano y nitroindazol muestra un comportamiento electroquímico comparable, donde se evidenció la generación de diferentes intermediarios radicalarios ($\text{HRNO}_2^{\cdot-}$, $\text{RNO}_2^{\cdot-}$) y neutros (RNHOH , HRNO) en el mecanismo de reducción de estas familias.

Para ambas familias se observó un mecanismo de reducción que entre sus etapas involucra una reducción electroquímica monoelectrónica, proceso que se encuentra asociado a una reacción química de autoprotonación, posibilitado dadas las características estructurales de los nitro derivados (Mecanismo reducción Electroquímico-Químico-Electroquímico).

El mecanismo de reducción de estos nitroderivados en medio mixto (DMF:Buffer citrato) mostró estar ligado directamente al valor de pH. Así a pH 2 el mecanismo de reducción presenta dos etapas, la primera asignada a la reducción de RNO_2 a RNHOH en medio ácido vía la transferencia de 4 electrones y la segunda perteneciente a la reducción de la RNHOH_2^+ a RNH_2 vía la transferencia de 2 electrones. A pH 7 y 9, no se observa el amino derivado y el potencial de reducción del grupo nitro se hace más negativo.

La obtención de las especie nitroradical, a través de la reducción eletroquímica en situ fue posible. Así se logró el registro de los espectros REE y la caracterización de la especie radicalaria a través de la determinación de las constantes de acoplamiento hiperfinas empleando como herramienta el software WINEPR Simfonia.

El uso de técnicas de spin trapping y la utilización de nuevos atrapadores posibilitaron la detección de radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) en células de adenocarcinoma mamario TA3 y en células parasitarias de *T. cruzi*

Las estructuras optimizadas luego del cálculo DFT, mostró que las especies radicalarias derivadas de NF tienden a adoptar una conformación plegada estabilizada, mientras que las moléculas neutras muestran la expansión de su cadena lateral, buscando la estabilidad a través de la planaridad. En el caso de los NI los conformeros de mínima energía se observaron influenciados más bien por los sustituyentes, que por el tipo de estructura, neutra o radical. Así sistemas con sustituyentes alifático tendían a buscar la estabilidad a través del plegamiento de la cadena, mientras que los sustituyentes de naturaleza aromática se ubicaban coplanares respecto del anillo nitroindazol.

En cuanto a la determinación teórica de las propiedades electrónicas y su correlación con los potenciales de pico catódico experimentales podemos establecer que el funcional híbrido B3LYP/6-31G*+(d,p) escogido para el cálculo, correlaciona satisfactoriamente estas propiedades, pues logra explicar el comportamiento esperado según su potencial de reducción experimental.

Del DFT también se extraen las constantes de acoplamiento hiperfinas teóricas, las cuales reproducen satisfactoriamente los valores experimentales encontrados.

La reactividad local se determinó a través de las funciones nucleofílicas ($f(r)^+$) de Fukui. Estas mostraron para la familia de nitrofuranos que los átomos más susceptibles a sufrir el ataque de un nucleófilo son: el N del grupo nitro y un N de la cadena lateral, mientras que para la familia de nitroindazoles los átomos de O del grupo nitro poseen las mayores funciones de Fukui, sin observarse una influencia de los sustituyentes o de la naturaleza del anillo indazol.

Al estudiar la tasa de crecimiento y/o inhibición parasitaria sobre los derivados de nitrofurano se obtienen valores de IC_{50} del orden de su droga parental Nifurtimox, observándose una inhibición significativa del crecimiento parasitario respecto del control sin droga seguido durante 7 días a través de la densidad óptica del cultivo.

De los estudios de citotoxicidad realizados en células RAW y en células de *T. cruzi* se puede concluir que los derivados de nitroindazol no presentan citotoxicidad tanto en células RAW como células de *T. cruzi*, mientras que los derivados de nitrofurano resultaron ser tan citotóxicos en células RAW como Nifurtimox y Benznidazol, pero más activos que éstos sobre células de *T. cruzi* (epimastigote y tripomastigote) a la misma concentración (Destaca 3-NF, alto $IS \approx 700$).

Los nitrofuranos se analizaron mediante oxigrafía y se determinó que éstos promueven estrés oxidativo una vez inhibida la respiración mitocondrial.

Finalmente, luego del estudio realizado podemos establecer que uno de los mecanismos de acción antiparasitario de los derivados de nitrofurano, por una parte, involucra la generación de radical $OH\cdot$ el cual promueve estrés oxidativo a nivel celular. Además las diferencias estructurales de los nitrocompuestos estudiados gatillaron dos tipos de comportamiento antiparasitario, lo que se tradujo finalmente en una diferencia sustancial en su capacidad tripanocida.

Referencias

1. Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia o e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico do nova entidade mórbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1(2): 159–218.
2. Organización mundial de la salud, Comité experto en el control de la enfermedad de Chagas, 2002.
3. Aufderheide, A., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, Jr. L., Fornaciari, G. and Allison, M. 2004. A 9000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of National Academy of Sciences* 101(7):2034–2039.
4. Kirchhoff, L. 1993. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) A tropical Disease Now in the United States. *The new England Journal of Medicine* 329 (9): 639-644.
5. Molyneux, D. and Ashford, R. 1983. *The biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals*. London, England. Taylor and Francis Eds. 294p.
6. Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* 1(2): 92–100.
7. Atias, A. 1998. *Parasitología Médica* 1º Ed. Santiago. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda.: 251-264.
8. Faúndez, M., Pino, L., Letelier, P., Ortiz, C., López, R., Seguel, C., Ferreira, J., Pavani, M., Morello, A., Maya, J.D. 2005. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49(1): 126–130.
9. Morello, A. 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 90: 1–12.
10. Morello, A., Lipchenko, I., Cassels, B.K., Speisky, H., Aldunate, J., Repetto, Y. 1994. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 107(3): 367–371.
11. Bock, M., Gonnert, R. and Haberkorn, A. 1969. Studies with bay 2502 in animals. *Boletín Chileno de Parasitología* 24:13-16.

12. Pollak, A. and Richle, R. 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative Benznidazole. *Annals of Topical Medicene and Parasitology* 72(1): 45-54.
13. Van Voorhis, W. C. 1990. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs* 40(2): 176-202.
14. Rodriques-Coura, J., and de Castro, S. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 3–24.
15. Kirchhoff, L. 2000. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Rakel in R.E. (Ed.), *Conn's Current Therapy*. W. B. Saunders, New York. pp. 101–102.
16. Zahoor, A., Lafleur, M., Knight, R., Loman, H., Edwards, D. 1987. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochemical Pharmacology* 36(19): 3299–3304.
17. Gorla, N., Ledesma, O., Barbieri, G. and Larripa I. 1989. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with Nifurtimox. *Mutation Research* 224: 263-267.
18. Apt, W. 1999. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Parasitología al Día* 23(3-4): 100–112.
19. Filardi, L. and Brener, Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(6): 755–759.
20. Castro, A., de Meca, M., Bartell, L. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas`Disease (American trypanosomiasis). *Human and Experimental Toxicology* 8:471-9.
21. Moreno, S., Docampo, R., Mason, R., Leon, W. and Stoppani, A. 1982. Diferent behaviorns of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 218(2): 585-91.
22. Díaz de Toranzo, E., Castro, J., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J. 1988. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplactic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 44: 880–88.

23. Docampo, R. and Stoppani, A. 1980. Mechanism of the trypanocidal action of Nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires)* 40 (Suppl. 1):10–6.
24. Docampo, R., Moreno, S. 1984. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews. Infectious Diseases* 6: 223–238.
25. Docampo, R. and Stoppani, A. 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives Biochemistry Biophysics* 197(1): 317–321.
26. Peterson, F. J., Mason, R. P., Hovsepian, J., and Holtzman, J. L. 1979. *Journal of Biological Chemistry* 254 (10): 4009–4014
27. Mc Calla, D. R., Reuvers, A., and Kaiser, C. 1971. Breakage of bacterial DNA by nitrofurans derivatives. *Cancer Research*. 31(12) 2184–2188.
28. Streeter, A. J., and Hoener, B. A. 1988. Evidence for the involvement of a nitrenium ion in the covalent binding of nitrofurazone to DNA. *Pharmaceutical Research*. 5 (7): 434–436.
29. Beckett, A. H. and Robinson, A. E. 1959. Reduction of a series of antibacterial nitrofurans (type B compounds) by *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 1 (2): 155–164
30. Gavin, J. J., Ebetino, F. F., Freedman, R., and Waterbury, W. E. (1966) The aerobic degradation of 1-(5-nitrofurfurylideneamino)-2-imidazolidinone (NF-246) by *Escherichia coli*. *Archives Biochemistry Biophysics* 113(2): 399–404.
31. Swaminathan, S., and Bryan, G. T. 1984. Biotransformation of the Bladder Carcinogen N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide in Mice. *Cancer Research*. 44: 2331–2338.
32. Mason, R. D., and Holtzman, J. L. 1975. The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. *Biochemistry* 14: 1626–1632.
33. Mason, R. D., and Holtzman, J. L. 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 67(4): 1267–1274.

34. Priotto, G., Fogg, C., Balasegaram, M., Erphas, O., Louga, A., Checchi, F., Ghabri, S., and Piola, P. 2006. Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLOS Clinical Trials* 1 (8): 1555-5887.
35. Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E., and Kande, V. 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicenter randomised phase III, non-inferiority trial. *The Lancet* 374 (9683): 56–64.
36. Saulnier Sholler, G. L., Kalkunte, S., Greenlaw, C., McCarten, K., and Forman, E. 2006. Antitumor activity of nifurtimox observed in a patient with neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology-Oncology* 28(10): 693–695.
37. Saulnier Sholler, G. L., Brard, L., Straub, J. A., Dorf, L., Illeyne, S., Koto, K., Kalkunte, S., Bosenberg, M., Ashikaga, T., and Nishi, R. 2009. Nifurtimox induces apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Journal of Pediatric Hematology-Oncology* 31(3):187–193
38. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., and Cheeseman, I. 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(13): 5022–5027.
39. Baker, N., Alsford, S., and Horn, D. 2011. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Molecular and Biochemical Parasitology* 176(1): 55–57.
40. Kubata, B. K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C. J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Maruyama, T., Martin, S. K., Duszenko, M., and Urade, Y. 2002. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Experimental Medicine* 196(9): 1241–1251.
41. Hall, B. S., Bot, C. and Wilkinson, R. 2011. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *Journal of Biological Chemistry* 286 (15):13088–13095.

42. Masana, M., De Toranzo, E., Castro, J. 1982. Reductive Metabolism and activation of Benznidazole. *Biochemical Pharmacology* 33(7): 1041-5.
43. Maya, J.D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J., Téllez, R., Gaule, C., Morello, A. 1997. Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 86(1):101–106.
44. Maya, J.D., Rodríguez, A., Pino, L., Pabon, A., Ferreira, J., Pavani, M., Repetto, Y., Morello, A. 2004. Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biological Research* 37(1): 61–69.
45. Murta, S., Ropert, C., Alves, R., Gazzinelli, R., and Romanha, A. 1999. In vivo treatment with Benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistat *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology* 21(10): 535-44.
46. Turrens, J., Watts, Jr., B., Zhong, L., Docampo, R. 1996. Inhibition of *T. cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology* 82:125–129.
47. Darsaud, A., Chevrier, C., Bourdon, L., Dumas, M., Buguet, A., Bouteille, B. 2004. Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. *Tropical Medicine and International Health* 9(1):83–91.
48. Maya, J., Bollo, S., Nuñez-Vergara, L., Squella, J., Repetto, Y., Morello, A., Périé, J., Chauvière, G. 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology* 65(6): 999–1006.
49. Enanga, B., Ariyanayagam, M., Stewart, M., Barrett, M. 2003. Activity of Megazol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(10): 3368–3370.
50. Nesslany, F., Brugier, S., Mouries, M., Le, C., Marzin, D. 2004. In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol. *Mutation Research* 560(2): 147–158.

51. Halliwell, B., and Gutteridge, J. 1989. *Free radical in biology and medicine*. 2° Ed. Oxford: Clarendon Press 1:142-149.
52. Gutiérrez, Cap. J. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2):126–133.
53. Cuzzocrea, S., Riley, D., Caputi, A., and Salvemini, D. 2001. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological Reviews*. 53(1):135–159.
54. Singh, U., and Jialal, I. 2009. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* 20(3):82–9.
55. Zana, M., Janka, Z., and Kálmán, J. 2007. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 28(5): 648-76.
56. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Mini.review Chemicobiological Interactions* 160(1): 1–40.
57. Gutteridge, J., and Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899:136–147.
58. Turrens, J. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine* 25(1-2):211–220.
59. Wilkinson, S., Kelly, J. 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological Chemistry* 384(4): 517–525.
60. Krauth-Siegel, R., Meiering, S., Schmidt, H. 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biological Chemistry* 384(4): 539–549.
61. Wilkinson, S., Temperton, N., Mondragon, A., Kelly, J. 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 275(11): 8220–8225.
62. Clark, D., Albrecht, M., Arevalo, J. 1994. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Molecular And Biochemical Parasitology* 66 (1): 143-5.

63. Ariyanayagam, M., Fairlamb, A. 2001. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol* 115(2):189–198.
64. Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9-10): 916-21.
65. Keppler, D. 1999. Export pumps for glutathione s-conjugates. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9-10): 985-91.
66. Eaton, D. 2000. Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. *Neurotoxicology* 21(1-2): 101-11.
67. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification *Clinica Chimica Acta* 333(1): 19–39.
68. Valko, M., Morris, H., Cronin, M. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161–1208.
69. Mazur, L. 2000. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutation Research* 468(1):27–33.
70. Hayes, J. and McLellan, L. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radicals. Research* 31(4): 273–300.
71. Kuhn, H., Borchert, A. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidation and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 33(2): 154–172.
72. Fernandes A., Holmgren, A. 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling* 6(1): 63–74.
73. Luo, J., Jankowski, V., Henning, L., Schluter, H., Zidec, W., Jankowski, J. 2006. Endogenous coenzyme A glutathione disulfide in human myocardial tissue. *Journal of endocrinological investigation* 29(8): 688-93.
74. Fairlamb, A. and Cerami, A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology* 46 : 695–729.
75. Oza, S., Tetaud, E., Ariyanayagam, M., Warnon, S., Fairlamb, A. 2002. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 35853–35861

76. Steenkamp, D. 2002. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxidants and Redox Signaling* 4 : 105–121.
77. Krauth-Siegel, R. and Ludemann, H. 1996. Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80(2): 203–208.
78. Thomson, L., Denicola, A., Radi, R. 2003. The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412(1): 55–64.
79. Dormeyer, M., Reckenfelderbaumer, N., Ludemann, H., Krauth-Siegel, R. 2001. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry* 276(14): 10602–10606.
80. Aldunate, J., Morello, A. 1993. Free radicals in the mode of action of parasitic drugs. *Free Radicals in Tropical Diseases*. Harwood Academic Publishers, Switzerland: 137–165.
81. Bautista-Martínez, J., González, I., Aguilar-Martínez, M. 2004. Influence of the acidity level change in aprotic media on the voltammetric behavior of nitrogabacinamamides. *Electrochimica Acta* 49(20): 3403–3411.
82. Carbajo J., Bollo S., Núñez-Vergara L., Campero A., Squella J. 2002. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 531:187–194.
83. Viode C., Bettache N., Cenas N., Krauth-Siegel R., Chauviere G., Bakalara N, Perie J., 1999. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology* 57:549–557.
84. Olea-Azar C., Rigol C., Mendizabal F., Morello A., Maya JD., Moncada C., Cabrera E., di Maio R., González M., Cerecetto H., 2003. ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofurans derivative analogues of nifurtimox by electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction. *Free Radical Research* 37:997–1001.
85. Wardman P. 1985. Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. *Environ Health Perspective* 64:309-320.

86. Mason R. & Holtzman J. 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 67:1267-74.
87. Mason R. 1982. Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. *Free radicals in Biology V*:161.
88. A. Alvarez-Lueje, H. Pessoa, L.J. Nuñez-Vergara, J.A. Squella. 1998. Electrochemical reduction of 2,5-dimethoxy nitrobenzenes: nitro radical anion generation and biological activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 46(1):21–28.
89. Bollo S., Núñez-Vergara L., Martinez C., Chauviere G., Périé J. And Squella J. 2003. Voltammetric study of nitro radical anion generated from some nitrofurans compounds of pharmacological significance. *Electroanalysis* 15(1): 19-25.
90. Bollo S., Núñez-Vergara L., Bonta M., Chauviere G., Périé J. and Squella J. 2001. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megazol and some related nitroimidazole derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 511:46-54.
91. Núñez-Vergara L., Bollo S., Álvarez A., Blázquez M., Squella J. 1993. Nitro radical anion formation from nimodipine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 345:121-133.
92. Squella J., Mosre J., Blázquez M. and Núñez-Vergara L. 1993. Cyclic voltammetric study of the nitro radical anion from nitrendipine generated electrochemically. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 319:177-184.
93. Tocher J. & Edwards D. 1990. Electrochemical characteristics of nitroheterocyclic compounds of biological interest: Measurement and comparison of nitro radical lifetimes. *International Journal of Radiation Biology* 57:45-53.
94. J. Carbajo, S Bollo, Luis J. Núñez-Vergara, P. Navarrete, JA. Squella. 2000. Voltammetric studies of aromatic nitro compounds: pH-dependence on decay of the nitro radical anion in mixed media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 494(1):69-76.
95. Tocher J., Edwards D. 1995. The interaction of nitroaromatic drugs with aminothiols. *Biochemical Pharmacology* 50(1): 1367-1371.

96. Michael P., Barrett A., Fairlamb H., Rousseau B., Chauvière G. and Perié J. 2000. Uptake of the Nitroimidazole Drug Megazol by African Trypanosomes. *Biochemical Pharmacology* 59:615–620.
97. Sokolova, A. Y., Wyllie, S. Patterson, S., Oza, S. L., Read, K.D. and Fairlamb A. H. 2010. Cross-Resistance to Nitro Drugs and Implications for Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(7):2893-900.
98. Cerecetto H. & González M. 2001. N-oxide as Hypoxic Selective Cytotoxins. *Mini Reviews in Medical Chemistry* 1:219–231.
99. Tocher J., 1997. Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. *General Pharmacology* 28(4): 485–487.
100. Fanny Palace-Berl, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Salom Doria Jorge, Bianca Zingales, Rodrigo Rocha Zorzi, Marcelo Nunes Silva, Adilson Kleber Ferreira, Ricardo Alexandre de Azevedo, Sarah Fernandes Teixeira, Leoberto Costa Tavares. 2015. Designing and exploring active N-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients. *European Journal of Medicinal Chemistry* 96: 330-339.
101. Christopher Bot, Belinda S. Hall, Guzmán Álvarez, Rossanna Di Maio, Mercedes González, Hugo Cerecetto, Shane R. Wilkinson. 2013. Evaluating 5-Nitrofurans as Trypanocidal Agents. *American Society for Microbiology Journals- Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(4): 1638–1647.
102. R. Arancibia, A. Klahn, G. Buono-Core, E. Gutierrez-Puebla, A. Monge, M. Medina, C. Olea-Azar, J. Maya, F. Godoy. 2011. Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of ferrocenyl and cyrhetrenyl imines derived from 5-nitrofurane. *Journal of Organometallic Chemistry* 696(20)3238-3244.
103. Rodrigo Arancibia, A. Hugo Klahn, Gonzalo E. Buono-Core, Daniel Contreras, German Barriga, Claudio Olea-Azar, Michel Lapier, Juan D. Maya, Andrés Ibañez, Maria Teresa Garland. 2013. Organometallic Schiff bases derived from 5-nitrothiophene and 5-nitrofurane: Synthesis, crystallographic, electrochemical, ESR and anti-*Trypanosoma cruzi* studies. *Journal of Organometallic Chemistry* 743:49-54.
104. Merlino A., Otero L., Gambino D., Coitiño L. 2011. In search of patterns over physicochemical properties and pharmacological activities for a set of

- [MCl₂(thiosemicarbazone)] complexes (M=Pt/Pd): Support for multiple mechanisms of antichagasic action excluding DNA-bonding in vivo?. *European Journal of Medical Chemistry* 46:2639-2651.
105. Denicola A., Boiani M., Boiani L., Piacenza L., Hernandez P., Cerecetto H., Gonzalez M. 2010. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology* 79:1736–1745.
 106. Gerpe A., Álvarez G., Benítez D., Boiani L., Quiroga M., Hernández P., Sortino M., Zacchino S., González M., Cerecetto H. 2009. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic & Medical Chemistry* 17(21):7500–7509.
 107. Gerpe A., Odreman-Nuñez I., Draper P., Boiani L., Urbina JA, González M, Cerecetto H. 2008. Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorganic & Medical Chemistry* 16(1):569-77.
 108. Olea-Azar C., Pagano M., Demoro B., Toloza J., Boiani L., Gonzalez M., Cerecetto H., Norambuena E., Gambino D., Otero L. 2009. Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(12):4937–4943.
 109. Di Maio R., Gonzalez M., Cerecetto H., Cabrera E., Gonzalez-Murguiondo M., Gonzalez-Arias M., Arredondo C., Pintos C., Aguirre G., Fernandez M., Basmadjian Y., Rosa R., Pacheco J., Raymondo S. 2009. 5-Nitro-2-furyl derivative actives against *Trypanosoma cruzi*: Preliminary in vivo Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(10):3909–3914.
 110. M.C. Vega, M. Rolón, A. Montero-Torres, C. Fonseca-Berzal, J.A. Escario, A. Gómez-Barrio, J. Gálvez, Y. Marrero-Ponce, V.J. Arán. 2012. Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives:1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. *European Journal of Medicinal Chemistry* 58:214-27.
 111. M.C. Vega, A. Montero-Torres, Y. Marrero-Ponce, M. Rolón, A. Gómez-Barrio, J.A. Escario, V.J. Arán, J.J. Nogal, A. Meneses-Marcel, F. Torrens. 2006. New ligand

based approach for the discovery of antitrypanosomal compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16(7):1898-904.

112. J.A. Castillo-Garit, M.C. Vega, M. Rolón, Y. Marrero-Ponce, A. Gómez-Barrio, J.A. Escario, A. Álvarez Bello, A. Montero, F. Torrens, F. Pérez-Giménez, V.J. Arán, C. Abad. 2011. Ligand-based discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds: in silico identification and experimental support. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46:3324-3330.
113. B. Aguilera-Venegas, C. Olea-Azar, E. Norambuena, V.J. Arán, F. Mendizábal, M. Lapiere, J.D. Maya, U. Kemmerling, R. López-Muñoz. 2011. ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1,4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Spectrochimica Acta Part A* 78(3): 1004-1012.
114. Beatriz Muro, Felipe Reviriego, Pilar Navarro, Clotilde Marín, Inmaculada Ramírez Macías, María José Rosales, Manuel Sánchez-Moreno, Vicente J. Arán. 2014. New perspectives on the synthesis and antichagasic activity of 3-alkoxy-1-alkyl-5-nitroindazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 74: 124-134.
115. Christian Folch-Cano, Claudio Olea-Azar, Vicente J. Arán, Christian Diaz-Urrutia. 2010. ESR and electrochemical study of 1,2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. *Spectrochimica Acta Part A* 75: 375–380.
116. Rodríguez J., Olea-Azar C., Barriga G., Folch Ch., Gerpe A., Cerecetto H., González M. 2008. Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-Alkoxy, 3-hydroxy and 3-oxo derivatives. *Spectrochimica Acta Part A* 70:557–563.
117. (a) Rodríguez J., Arán V., Boiani L., Olea-Azar C., Lavaggi M., González M., Cerecetto H., Maya J., Carrasco-Pozo C., Speisky H. 2009. New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17(24): 8186–8196.
(b) Germán Barriga, Claudio Olea-Azar, Ester Norambuena, Ana Castro, Williams Porcal, Alejandra Gerpe, Mercedes González, Hugo Cerecetto. 2010. "New heteroaryl nitrones with spin trap properties: Identification of a 4-furoxanyl

derivative with excellent properties to be used in biological systems". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(2):795-802.

118. Gerpe A., Aguirre G., Boiani L., Cerecetto H., González M., Olea-Azar C., Rigol C., Maya J., Morello A., Piro O., Arán V., Azqueta A., López de Ceráin A., Monge A., Rojas M. and Yaluff G. 2006. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(10):3467-3480.
119. Navarrete-Vazquez G.,Chávez-Silva F., Argotte-Ramos R., Rodríguez-Gutiérrez M.C., Chan-Bacab M. J., Cedillo-Rivera R., Moo-Puc R., Hernández-Nuñez E. 2011. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(10):3168–3171.
120. Bourdin Trunz B., Jedrysiak R., Tweats D., Brun R., Kaiser M., Suwinski J., Torreele E. 2011. 1-Aryl-4-nitro-1H-imidazoles, a new promising series for the treatment of human African trypanosomiasis. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(12):1524-1535.
121. Aguilera-Venegas B., Olea-Azar C., Norambuena E., Arán V. J., Mendizabal F., Lapiere M., Maya J. D., Kemmerling U., López-Muñoz R. 2011. ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1,4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-Trypanosoma cruzi agents. *Spectrochimica Acta Part A*, 78(3):1004–1012.
122. Carvalho S., Lopes F, Salomao K., Romeiro N., Wardell S. , de Castro S., da Silva E.and Fraga C. 2008. “Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(1): 413–21.
123. Man-Chin Chung, Carvalho R., Favarato T., Ferreira M., Carneiro M., Alves K., Varanda E., Colli W., Miranda M. and Ferreira E. 2003. Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11(22):4779–4783.
124. Barbosa T. P., Suervy C., Sousa O., Amorim F. M., K. Yara, S. Rodrigues P., Assis C. de, Caldas J. P., Oliveira M. R., Vasconcellos M. A. 2011. Design, synthesis and

- antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19:4250-4256.
125. Nicholson R. S. 1966. Semiempirical Procedure for Measuring with Stationary Electrode Polarography Rates of Chemical Reactions Involving the Product of Electron Transfer. *Analytical Chemistry* 38:1406.
 126. José Vidal Gancedo. 2004. Cuarta Escuela de Resonancia Paramagnética Electrónica, Spin Trapping y Spin Labelling, Apl. 7.
 127. Sueishi, Y.; Yoshioka, C.; Olea-Azar, C.; Reinke, L. A.; Kotake, Y. 2002. Substituent Effect on the Rate of the Hydroxyl and Phenyl Radical Spin Trapping with Nitrones. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 75(9):2043-2047.
 128. S.T. Epstein. 1974. *The Variation Method in Quantum Chemistry*. Academic Press, 6ta edition. New York.
 129. Bader R. F. W. 1990. *Atoms in Molecules*. Oxford University press U.K.
 130. R. G. Parr and W. Yang. 1989. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. *International Journal of Quantum Chemistry* 47(1):101.
 131. R. M. Dreizier and E. K. U. Gross. 1990. *Density Functional Theory*. Springer-Verlag, Berlin.
 132. W. Koch, M.C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. 2001. Wiley-VCH Verlag GMBH, 2nd edition., Germany.
 133. A. D. Becke. 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Reviews A* 38 (6): 3098-3100.
 134. C. Lee, W. Yang and R. G. Parr. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Reviews B* 37(2): 785-789.
 135. McConnell H. M. 1964. Indirect Hyperfine Interactions in the Paramagnetic Resonance Spectra of Aromatic Free Radicals. *Journal of Chemical Physics* 24(4): 764-766.
 136. Szabo A. and Ostlund N. S. 1989. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. McGraw-Hill, New York.

137. Parr, R. G.; Yang, W. 1984. Density Functional Approach to the Frontier-Electron theory of Chemical Reactivity. *Journal of the American Chemical Society* 106(14): 4049-4050.
138. W. Yang, W. J. Mortier. 1986. The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. *Journal of the American Chemical Society* 108(19): 5708-5711.
139. John D. Landua, Adriana P. Visbal, and Michael T. Lewis. 2009 .Methods for preparing fluorescent and neutral red-stained whole mounts of mouse mammary glands. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14(4): 411–415.
140. Carolina Rigol, C. Olea-Azar, Fernando Mendizábal, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Mercedes González, Hugo Cerecetto. 2005. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicabazones antiprotozoal drugs. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61:2933-2938.
141. Reinecke S, Helling B. 2002. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(5):1026-1031.
142. Rigol C., Olea-Azar C., Mendizábal F., Briones R., Cerecetto H. and González M. 2006. Theoretical Study on 5-Nitrofuryl Thiosemicarbazone Radicals Electronic Properties. *Journal of Molecular Structure: TEOCHEM* 770(1-3):125-129.
143. Aravena M., Olea-Azar C., Cerecetto H., González M., Maya J. D., Rodríguez-Becerra J. 2011. Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Electrochemical, Spectroscopic and Biological studies. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 79(2):312-319.
144. Nicholson R.S. and Shain I. 1964. Theory of Stationary Electrode Polarography Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical Chemistry* 36: 706–23.
145. J. A. Squella, S. Bollo, L. J. Núñez-Vergara. 2005. Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance. *Current Organic Chemistry*. 9(6): 565-581.

146. Bollo S., Núñez-Vergara L.J. and Squella J.A. 2004. Cyclic voltammetric determination of free radical species from nitroimidazopyran: A new antituberculosis agent. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 562 (1):9-14.
147. Olmstead L., Robert G., Milton H. and Nicholson R. S. 1969. Theory of cyclic voltammetry for a dimerization reaction initiated electrochemically. *Analytical Chemistry* 41(2):260-267.
148. Madej E., Wardman P. 2006. Pulse radiolysis and cyclic voltammetry studies of redox properties of phenothiazine radicals. *Radiation Physics and Chemistry* 75 (9):990-1000.
149. Guissani A., Henry Y., Lougmani N. and Hickel B. 1990. Kinetics studies of four types of nitroheterocyclic radicals by pulse radiolysis. Correlation of pharmacological properties to decay rates. *Free Radicals Biology and Medicine* 8 (2):173-189.
150. Arguello J., Núñez-Vergara L., Bollo S., Aquella J. 2006. Nitro radical anion formation from nitrofuryl substituted 1,4-dihydropyridine derivatives in mixed and non-aqueous media. *Bioelectrochemistry* 69: 104-112.
151. C.J. De Ranter, T. A. Olszak, O. M. Peeters, N. M. Blaton. 1994. Trans-5-nitro-2-furanacrylic acid. *Acta Crystallographica Section C* 50: 1930-1931.
152. N. Sampath, S. M. Malathy Sony, M. N. Ponnuswamy, M. Nethaji. 2003. t-3-Isopropyl-1-methyl-r-2,c-6-diphenylpiperidin-4-one thiosemicarbazone *Acta Crystallographica Section C* 59: 346-348.
153. Dewar M.J.S., Zebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. 1985. The development and use of quantum mechanical molecular models. *Journal of the American Chemical Society* 107:3902-9.
154. Roothaan C. J. 1951. New developments in molecular orbital theory. *Reviews of Modern Physics* 23:69-89.
155. A. Koopman's. 1934. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica* 1(1-6) 104-113:
156. José L. Gázquez. 2008. Perspectives on the Density Functional Theory of Chemical Reactivity. *Journal of the Mexican Chemical Society* 52(1):3-10.

157. Fávero R. P., Trossini G. H. G. Ferreira. E.I., Serrano S. H. P., Menezes C. M., Tavares S. L. C. 2010. Theoretical and Voltammetric Studies of 5-Nitro-heterocyclic Derivatives with Potential Trypanocidal Activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21(4): 740-749.
158. Brian Ganley, Goutam Chowdhury, Jennifer Bhansali, J. Scott Daniels and Kent S. Gates. 2001. Redox-Activated, Hypoxia-Selective DNA Cleavage by Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9:2395-2401.
159. Allan Covens, John Blessing, David Bender, Robert Mannel, Mark Morgan. 2006. A phase II evaluation of tirapazamine plus cisplatin in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology* 100 (3): 586-590.
160. Christophe Morell, André´ Grand and Alejandro Toro-Labbe. 2005. New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *Journal of Physical Chemistry A*.109:205-212
161. Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. 2006. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146:601–620.
162. Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R. 2008. Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Current Drug Targets* 9:957-965.
163. Jose Cazzulo J, Stoka V, Turk V. 2001. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design* 7:1143-1156
164. Urbina J. A. 2009. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1(104):311-318.
165. Naula C, Parsons M, Mottram JC. 2005. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1754:151-159.