



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

**ESTUDIO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DE COMPLEJOS
METÁLICOS DE PLATINO Y PALADIO CON LIGANTES
BIOACTIVOS CONTRA *Trypanosoma cruzi***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

JOSÉ FRANCISCO ORTEGA CAMPOS

PATROCINANTE

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

DR. MAURICIO MONCADA-BASUALTO

SANTIAGO - CHILE

2020

**Este estudio fue financiado por el
proyecto Fondecyt Regular N°1190430**

Esta tesis la dedico con inmenso amor a mis padres, abuelos, hermanos, familia, y a mi gran compañera de vida durante estos 6 años. A todos, por entregarme su amor, apoyo y compañía en todo momento y de manera incondicional.

“La unión de dos almas sinceras no admite impedimentos. El amor no se transforma con el cambio ni se aleja con la distancia”

William Shakespeare

“Nuestra mayor debilidad radica en darse por vencido. La forma más segura de tener éxito, es intentarlo una vez más”

Thomas Edison

“La próxima vez que alguien se queje de que ha cometido un error, dígame que puede ser algo bueno. Porque sin imperfección, ni usted ni yo existiríamos”

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

Me resulta muy difícil expresar sentimientos, y sobre todo si algunos son de una vida entera, pero intentaré ser concreto al expresar mis ideas. Y para comenzar, agradecer a mi mamá, Patricia, y a mi papá, José Luis, por confiar en mí, por enseñarme, por amarme, por orientarme y por apoyarme en todo momento, junto con darme el ejemplo para ser alguien mejor cada día, responsable y honesto.

Infinitas gracias a mi abuelita, Gladys, y a mi tata, Francisco, por todo el amor con el que me han apoyado toda la vida, por todo el sacrificio que han hecho por ayudarme en todo proceso y por orientarme para ser una mejor persona día a día, como lo son ellos. Ellos son un gran ejemplo de vida para mí, y estoy inmensamente agradecido de la vida por tenerlos.

A Benjamín y Martín, mis hermanitos, gracias por llegar a mi vida. Benjamín, gracias por apoyarme especialmente durante estos seis años, y por acompañarme pese a que te ponías a jugar a la pelota al lado mío mientras yo estudiaba y me hacías rabiar; siempre serás un pilar fundamental en mi vida.

A mi gran amor, Javiera, mi compañera de vida desde que era mechón de la carrera de Química, gracias por llegar a mi vida y por estar aún en ella. Gracias por acompañarme y por permitirme acompañarte en tu vida. Gracias por ayudarme y ser un pilar indispensable durante estos seis años. Gracias por confiar en mí, por motivarme a dar lo mejor y por ayudarme a superar mis debilidades.

A mi tío, Eduardo, y a mi prima, Martina, gracias por hacerme reír, por apoyarme y por entregarme siempre vuestra simpatía y buena onda, sobre todo cuando tenía mucho que estudiar o hacer. A David, gracias por el apoyo y buena onda.

Gracias a todos mis familiares que siempre han estado conmigo (Ricardo, Soledad, Graciela, entre otros), y gracias a una nueva familia que me ha acogido estos seis años, la de Javiera (María Antonia, Carlos, Gabriel y María Paz).

Al proyecto FONDECYT N°1190430, gracias por financiar este estudio.

A la Universidad de Chile, gracias por permitirme formar parte de esta prestigiosa casa de estudios, y por permitirme desarrollar habilidades y competencias extra curriculares.

De manera muy especial, quisiera agradecer al querido Dr. Claudio Olea, por confiar en mí durante la carrera de pregrado, por ayudarme cuando tuve dilemas académicos y personales, por siempre entregar la frase adecuada en el momento correcto, por ayudarme a crecer profesionalmente y como persona. Por supuesto, el positivismo que irradia se agradece enormemente. Gracias por ayudarme a mejorar mis debilidades y por destacar mis fortalezas.

Al Dr. Mauricio Moncada, gracias por enseñarme a trabajar en química, por el conocimiento entregado, por su nobleza, por la ayuda brindada durante este periodo de aprendizaje, por la simpatía y por todo lo exigido. Gracias por los consejos para siempre hacer un buen trabajo.

A la Dra. Lucía Otero y a Santiago Rostán, gracias por permitirme trabajar con sus compuestos.

Al Dr. Michel Lapier, gracias por enseñarme a trabajar en un área totalmente desconocida para mí, la biología, gracias por la ayuda y la compañía cuando tenía que hacer ensayos hasta muy tarde. Gracias por la paciencia, por la disposición y por orientarme en mi tesis.

A la Dra. M. Carolina Zúñiga, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, a orientarme y a guiarme en mi proceso de enseñanza y aprendizaje, tanto académica como profesionalmente durante todo el pregrado. Infinitas gracias por su simpatía y buena onda en el laboratorio.

A Josué Pozo, Francisco Salgado, Alejandra Herrera, Gabriela Maturana y Helena Quintero, gracias por su enorme compañerismo con el que me ayudaron en distintas etapas del desarrollo de esta tesis y trabajos previos. Junto a Fredys

Sánchez, Antonio Ramos, Diego Rodríguez, Sandy Farfan, Javiera Órdenes, entre otros, gracias por el agradable ambiente que generan en el laboratorio y por el compañerismo.

A la Dra. Loreto Ascar, Jefa de la Carrera de Química, gracias por la atención prestada cuando fue necesario y por lo enseñado en la Unidad de Investigación.

Al Dr. Pablo Richter, gracias por la ayuda brindada durante la práctica profesional y por su entrega como docente.

A la Dra. Natalia Henríquez y al prof. Sergio Bustamante, profesores con los que trabajé haciendo ayudantías durante 4 años, gracias por confiar en mí y por ayudarme a crecer profesionalmente en un área que me apasiona quizás tanto como la química, la docencia.

A la Dra. M. Angélica Vega, gracias por permitirme y ayudarme a crecer profesional y académicamente en temas de docencia y aprendizaje.

A Sandra Liberona, gracias por ayudarme y orientarme cuando lo necesité.

A mis compañeros de carrera, Matías Palma, Claudia Carrasco, Daniela Benavides y Alejandra Molina, gracias por compartir conmigo esta hermosa carrera y por el trabajo realizado juntos.

A los compañeros que tuve en la práctica profesional (Joselyn Ochoa, Silvana Sánchez y Eric Moreno), y a mis jefaturas (Daniel Sanhueza y Ángela Rifo), gracias por la oportunidad, por la confianza y por lo enseñado.

A tanta gente que ha sido parte de esta etapa, gracias por estar en ella.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS, ECUACIONES Y TABLAS.....	9
RESUMEN.....	12
SUMMARY.....	14
INTRODUCCIÓN.....	16
Enfermedad de Chagas.....	16
Complejos metálicos generadores de radicales libres.....	23
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
METODOLOGÍAS.....	28
Caracterización electroquímica por Voltametría Cíclica (VC).....	28
Espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico (REE).....	29
Actividad biológica en células VERO y <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c.....	30

Citotoxicidad en modelo de célula de mamífero (VERO).....	31
Citotoxicidad en parásitos.....	32
Determinación de especies radicalarias en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a través de <i>Spin Trapping</i>	33
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
Estudio electroquímico mediante Voltametría Cíclica.....	34
Estudio de espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico.....	42
Evaluación de la viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio.....	47
Estudio mediante <i>Spin Trapping</i>	52
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS, ECUACIONES Y TABLAS

Figura 1. Estructura del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
Figura 2. Ciclo de vida del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> .	17
Figura 3. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox y Benznidazol.	20
Figura 4. 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA).	21
Figura 5. Esqueleto básico de tiosemicarbazona.	22
Ecuación 1. Generación del anión radical superóxido.	24
Figura 6. Esquema general de complejos de estudio.	26
Ecuación 2. Cociente I_{pa}/I_{pc} .	29
Ecuación 3. Reducción de MTT a Formazán, dentro de la célula.	31
Figura 7. Ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.	34
Figura 8. Voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a diferentes velocidades de barrido.	35
Figura 9. Influencia de adición de NaOH en el voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a velocidad de barrido de 2000 mV/s	36

Figura 10. Voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a velocidad de barrido de 2000 mV/s.	37
Tabla 1. Parámetros electroquímicos para los complejos.	38
Tabla 2. Parámetros electroquímicos para la cupla de generación del radical nitro anión, para los cuatro complejos.	39
Figura 11. Mecanismo electroquímico propuesto para los complejos estudiados.	41
Figura 12. Esquema general para complejos estudiados mediante REE.	42
Figura 13. Espectro de REE del complejo 2': (a) espectro experimental; (b) espectro simulado; (c) superposición de ambos espectros.	43
Tabla 3. Constantes de acoplamiento hiperfino [G] para los complejos estudiados.	44
Figura 14. Reacción de generación de radicales libres en medio biológico.	46
Figura 15. (a) Curva dosis-respuesta de viabilidad celular versus logaritmo de la concentración molar para las drogas estudiadas frente a células de mamífero (VERO). (b) Viabilidad celular versus concentración micromolar para las drogas estudiadas frente a células de mamífero (VERO).	48

- Figura 16. (a)** Curva dosis-respuesta de viabilidad celular versus logaritmo de la concentración molar para las drogas estudiadas frente a *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). **(b)** Viabilidad celular versus concentración micromolar para las drogas estudiadas frente a *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). 49
- Tabla 4.** Valores de IC₅₀ en cultivos celulares de *Trypanosoma cruzi* y células de mamífero. Los valores son representados como el promedio y su desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3). 50
- Figura 17.** Ejemplos de *spin trap* para radicales centrado en oxígeno y carbono atrapados con DMPO, generados de manera química. 52
- Figura 18.** Espectro de REE de Menadiona (blanco positivo) generado en epimastigotes Dm28c. en el espectro se simboliza a los aductos de espín: DMPO-CH₃ (*), DMPO-OH (+) y DMPOX (#). 54
- Figura 19. (a)** Control: parásitos en *buffer* fosfato, NADPH, DMPO y DMSO. **(b)** Parásitos con *buffer* fosfato, NADPH, DMPO, DMSO y complejo 1', donde (+) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-CH₃, (#) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPOX, y (*) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-OH. 55
- Figura 20.** Reacción entre el radical hidroxilo con el vehículo DMSO. 56
- Figura 21.** Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo. 56

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, provocada por *Trypanosoma cruzi*, presenta un problema de salud pública en América Latina, abarcando alrededor de veintiún países. El proceso de globalización ha llevado a que la enfermedad se propague a otras áreas no endémicas, convirtiéndola en un problema de salud global.

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se han utilizado fármacos como Nifurtimox y Benznidazol, pero pese a tener cierta eficacia en la etapa aguda de la enfermedad, son ineficaces en la erradicación del parásito. Por este motivo se han investigado nuevas alternativas farmacológicas; tales como 5-nitrofuril derivados de tiosemicarbazona, que han mostrado ser potentes antiparasitarios.

Una estrategia desarrollada en conjunto con el Laboratorio de Bioinorgánica de la Universidad de la República, Uruguay, es sintetizar complejos metálicos de paladio, platino y rutenio con ligantes bioactivos como los nitrofuril derivados de tiosemicarbazona para ver la sinergia metal-ligante y su actividad biológica.

En este trabajo se proponen variaciones a compuestos ya estudiados anteriormente, complejos de coordinación de platino y paladio con ligantes: 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano o PTA, trifenilfosfina o PPh₃, ioduro y 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

Se determinó el mecanismo de reducción de los complejos mediante voltametría cíclica y se caracterizó las especies radicalarias generadas por espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE). Asimismo, se evaluó la actividad citotóxica en células de mamífero (VERO) y actividad tripanocida en epimastigotes Dm28c. El mecanismo de acción potencial se evaluó a través de la técnica de atrapamiento de espín.

Se encontró, por REE, la formación de una especie radicalaria cuyo espectro indicó que el electrón desapareado fue capaz de deslocalizarse a través de casi en la totalidad del ligante derivado de tiosemicarbazona. Los resultados de actividad citotóxica indicaron que el complejo de paladio con ligante PTA es el mejor candidato de la serie como agente tripanocida potencial con una actividad mayor a la descrita para el fármaco Nifurtimox.

Además, el estudio por *Spin Trapping* determinó la formación de radical hidroxilo en el parásito *T. cruzi*, evidencia que puede explicar la actividad antiparasitaria a través de un mecanismo de estrés oxidativo.

SUMMARY

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, presents a public health problem in Latin America, covering around twenty-one countries. The globalization process has led disease to spread to other non-endemic areas, making it a global health problem.

Drugs such as Nifurtimox and Benznidazole have been used to treat Chagas disease, but despite having some efficacy in acute stage of disease, they are ineffective in eradicating parasite. For this reason, new pharmacological alternatives have been investigated; such as 5-nitrofuryl thiosemicarbazone derivatives, which have been shown to be potent dewormers.

A strategy developed in conjunction with Bioinorganic Laboratory of University of the Republic, Uruguay, is to synthesize palladium, platinum and ruthenium metal complexes with bioactive binders such as thiosemicarbazone-derived nitrofuryl to see the metal-binder synergy and its biological activity.

In this work, variations to previously studied compounds are proposed, coordination complexes of platinum and palladium with ligand: 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane or PTA, triphenylphosphine or PPh₃, iodide and 5-nitrofuryl derived from thiosemicarbazone.

The mechanism of reduction of complexes was determined by cyclical voltammetry and radical species generated by electron spin resonance spectroscopy (REE) were characterized. Likewise, the cytotoxic activity in mammalian cells (VERO) and trypanocidal activity in Dm28c epimastigotes were evaluated. The potential mechanism of action was evaluated through spin trapping technique.

It was found by REE, the formation of a radical species whose spectrum indicated that unpaired electron was able to delocalize through almost all of the thiosemicarbazone-derived binder. The cytotoxic activity results indicated that

palladium complex with PTA ligand was best candidate in series as a potential trypanocidal agent with a higher activity than that described for drug Nifurtimox.

Furthermore, study by Spin Trapping determined formation of hydroxyl radical in *T. cruzi* parasite, evidence that can explain antiparasitic activity through an oxidative stress mechanism.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), se calcula que en el mundo afecta entre 6 y 7 millones de personas. La enfermedad de Chagas se encuentra en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con muchos otros nombres, según la zona geográfica [1; 3].

Este parásito es un protozoo caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria (ver Figura 1), dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada kinetoplasto (cinetoplasto), que contiene casi el 30% del ADN del parásito.

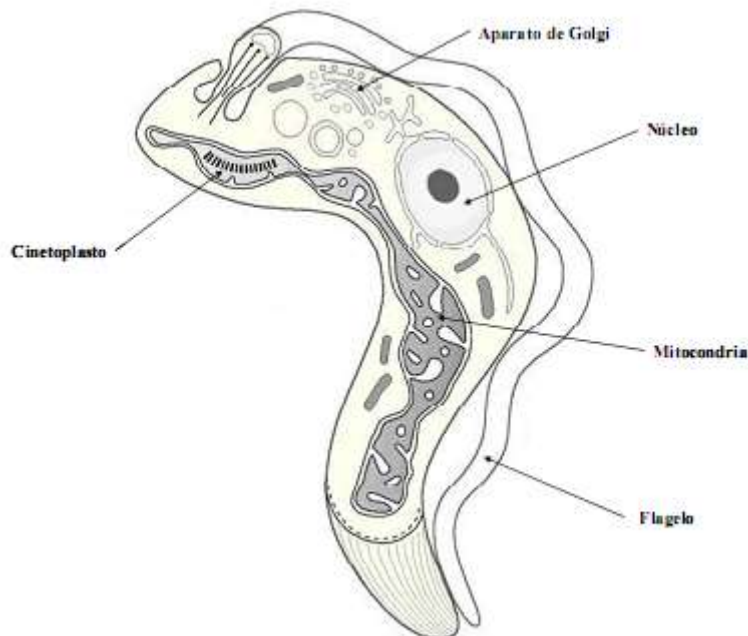


Figura 1. Estructura del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Esta enfermedad ha estado presente en el continente americano por más de 9000 años, encontrándose indicios de la 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 [1; 3].

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 2) involucra tres estadios morfológicos que dependen del hospedero (mamífero o insecto) en el cual se encuentre el parásito. Las distintas formas del parásito se diferencian por la posición relativa del flagelo, kinetoplasto y núcleo; estas formas son: tripomastigotes (forma infectiva no replicativa del parásito, presente en sangre de mamíferos infectados), epimastigotes (forma replicativa no infectiva, presente en el vector) y amastigotes (forma replicativa infectiva dentro de las células de mamífero).

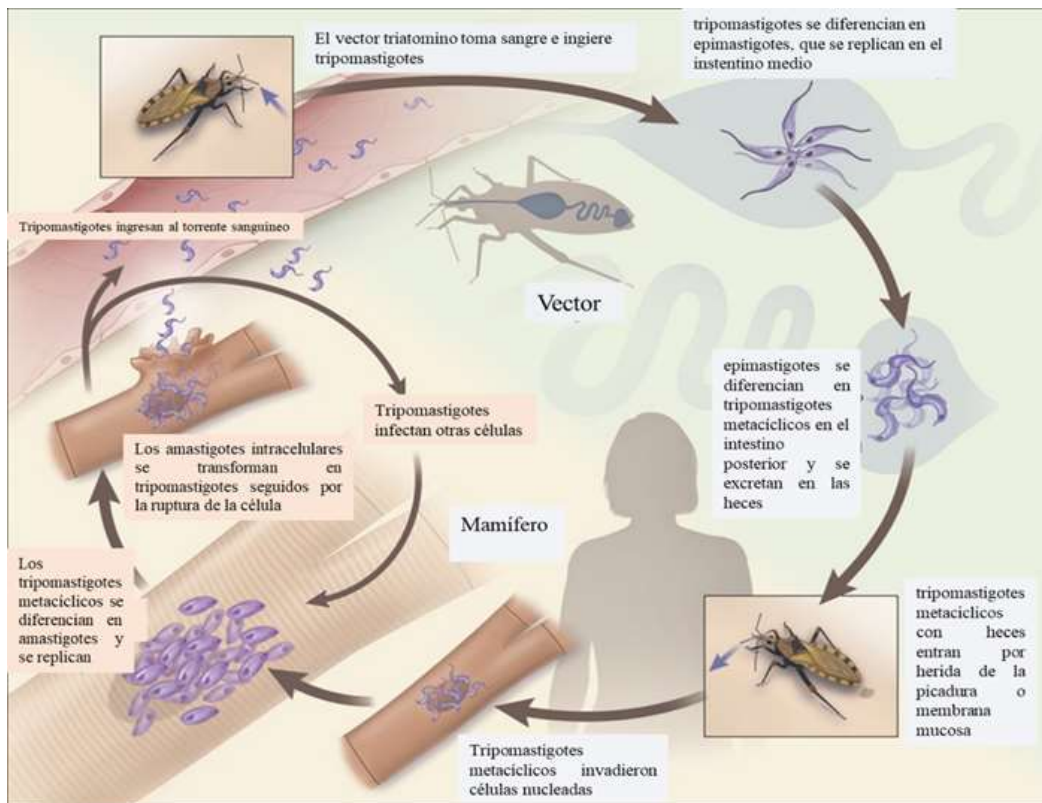


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo comienza cuando el vector (vinchuca, *triatoma infestans*) se alimenta de la sangre de un mamífero y libera a los tripomastigotes en las heces cerca del sitio de mordedura del insecto. Los tripomastigotes penetran al huésped a través de la herida o de la membrana mucosa. En el mamífero este parásito puede ser fagocitado por macrófagos que son parte de la primera defensa en este hospedero. En su interior, el tripomastigote es capaz de evitar la acción oxidativa del macrófago y así logra evitar las defensas del hospedero humano. Dentro de este, los tripomastigotes invaden a las células, donde se diferencian en amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, se diferencian en tripomastigotes y se liberan a la circulación sanguínea. Los tripomastigotes infectan una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección. En su recorrido por el torrente sanguíneo del hospedero mamífero, el parásito es capaz de infectar a cualquier tipo de célula nucleada, iniciando un nuevo ciclo [8; 9].

El vector es capaz de ingerir el parásito en su forma tripomastigote succionando sangre de un mamífero infectado. En el intestino del vector infectado, el parásito en su forma tripomastigote es capaz de diferenciarse a epimastigote y dividirse aumentando su número. Posteriormente el epimastigote migra al intestino grueso y se transforma en la forma metacíclica de tripomastigote, completándose así el ciclo biológico de *T. cruzi* [8; 9].

T. cruzi se puede transmitir a través de las transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, transplacentariamente y en accidentes de laboratorio [8; 9]. La enfermedad lleva el nombre de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e investigador brasileiro que la descubrió en 1909 [9].

La enfermedad de Chagas, presenta dos fases: (a) fase aguda (primeras semanas desde la infección), y, (b) fase crónica. Pese a ser dos fases distintas, ambas podrían ser asintomáticas y mortales. Los síntomas que podría desarrollar la enfermedad pueden ser fiebre, urticaria, dolor corporal, dolor de cabeza, pérdida de apetito, entre otros [3; 8; 9].

Se ha calculado que el costo de la atención médica a los pacientes con formas crónicas de la enfermedad (alteración cardiaca, digestiva, neurológica o mixta) supera en más de un 80% el costo de la fumigación con insecticidas de acción residual para controlar los vectores y prevenir la infección [8; 9].

En menos del 50% de las personas picadas por un triatomíneo, se ha observado un signo característico inicial, como una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado. Asimismo, pueden presentar fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico [1; 2].

Durante la fase crónica de la enfermedad, es característica una baja parasitemia (concentración de parásitos en sangre), ya que los parásitos permanecen principalmente en el músculo cardiaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardiacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento de esófago o colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardiacas o insuficiencia cardiaca progresiva por destrucción del músculo cardiaco y sus inervaciones [2; 8; 9].

Hoy en día no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad crónica de Chagas y la migración de personas ha ocasionado la expansión a zonas no endémicas, no obstante, para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan dos fármacos: Nifurtimox (Bayer, Lampit[®]) y Benznidazol (Roche, Radanil[®]), que son los únicos que poseen eficacia clínica pero que están lejos de ser óptimos debido a sus efectos adversos, principalmente daño hepático [11].

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

Asimismo, la reducción intracelular del grupo nitro y su interacción con el oxígeno molecular induce la formación de un ciclo redox, lo que aumenta la formación de especies altamente reactivas y la formación de intermediarios electrofílicos que causan daño oxidativo por reacción con biomacromoléculas o indirectamente por generación de radicales libres [8; 9; 28].

Nifurtimox es un profármaco que forma parte de una terapia combinada que dirige sus esfuerzos hacia el tratamiento de la tripanosomiasis 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 conduce a la propuesta de que esta droga induce estrés oxidativo a nivel celular [11].

El mecanismo de acción más aceptado para Nifurtimox y Benznidazol es mediado por el grupo nitro de ambas drogas, el cual es reducido a un radical nitro anión mediante la acción de nitrorreductasas. Esto induce la formación de numerosos radicales libres y metabolitos electrofílicos, tal como se indica en la Figura 3.

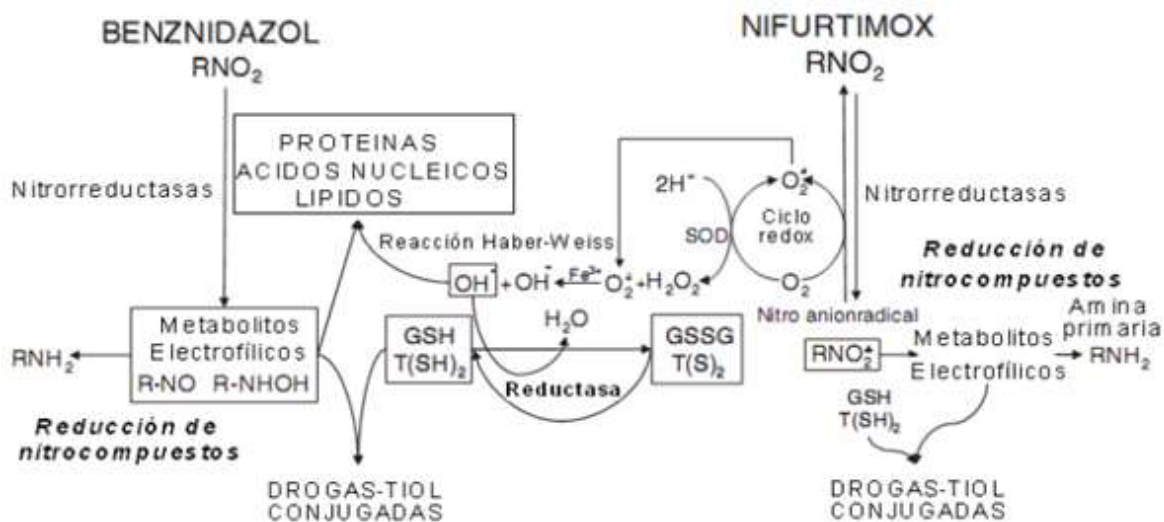


Figura 3. Mecanismos de acción propuestos para los fármacos Nifurtimox y Benznidazol.

En función a lo anterior, resulta interesante estudiar compuestos con actividad tripanocida como agentes potenciales para ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Es por esto que el grupo de radicales libres y antioxidantes de la Universidad de Chile ha estudiado diversos tipos de compuestos con actividad anti-*T. cruzi*. Dentro de estos compuestos destacan los complejos metálicos.

En el área de la química médica inorgánica, se conoce que cisplatino es uno de los fármacos más importante utilizado en la terapia anticancerígena; este fármaco posee un núcleo metálico. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones ya que provoca reacciones adversas como náuseas y nefrotoxicidad, lo cual provoca que la dosis de administración deba ser baja, y por lo tanto que se quiera sustituir por opciones menos tóxicas [2; 4].

Es por esto que se sintetizan y estudian compuestos nuevos con centros metálicos (metales de transición), ya que producen cambios en las propiedades fisicoquímicas en el ADN. Un ejemplo de este estudio son los complejos de paladio (II) con tiocarboxamida como ligante, que demostraron una alta interacción intercalante con el ADN, teniendo una citotoxicidad mayor que el cisplatino sobre células neoplásica [21]. Asimismo, se ha descrito también un compuesto que posee la capacidad de protonarse en condiciones fisiológicas, el 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) (Figura 4).

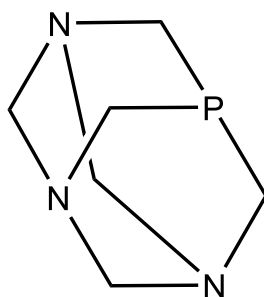


Figura 4. 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA).

Esta molécula es una fosfina hidrófila que tiene la capacidad de aumentar la solubilidad en agua de los complejos de los que forma parte. Se ha descrito que varios complejos metálicos (cobre, plata, oro y rutenio), mostraron actividad antineoplásica, por interacción con el ADN e inhibición de la proliferación celular mediante apoptosis [5; 6; 7; 9; 10; 11].

Un ejemplo de este tipo de compuestos son los complejos organometálicos de paladio (II) que presentan actividad antineoplásica debido a la inhibición de la glutatión-S-transferasa, así como también complejos de otros metales [2; 10].

Por otra parte, según lo investigado por el grupo de bioinorgánica de la Dra. Lucía Otero, los complejos metálicos con ligante de tiosemicarbazona han demostrado tener actividad contra diversas enzimas incluyendo tioredoxina reductasa, glutatión reductasa, ribonucleótido reductasa, involucradas en la fisiopatología de las neoplasias y también, contra cisteína proteasas como la cruzipaína del *T. cruzi*. Así, los complejos metálicos podrían estar involucrados en acciones antiproliferativas y antiparasitarias [10; 11; 24].

Se ha descrito que la tiosemicarbazona (Figura 5), es capaz de inhibir la cruzipaína, al unirse al sitio activo de la enzima, por una parte, formando un enlace covalente entre el residuo Cys25 y el carbono del tiocarbonilo, y, mediante una transferencia de un protón desde el residuo His19 al azufre del tiocarbonilo [10].

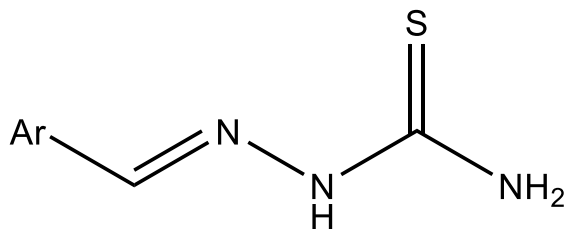


Figura 5. Esqueleto básico de tiosemicarbazona.

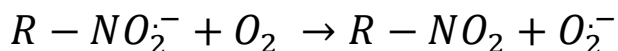
Así es que estudios previos mencionan que los derivados de tiosemicarbazona son prometedores inhibidores de cruzipaína, con una baja toxicidad y propiedades fisicoquímicas favorables, tales como la lipofilia adecuada y bajo peso molecular. Además, el hecho de ser un compuesto no peptídico mejoraría la biodisponibilidad de este tipo de compuestos, en relación a otro tipo de compuestos con actividad biológica [10].

Complejos metálicos generadores de radicales libres

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Es por esto que en los últimos años estudiar la formación de radicales libres a nivel fisiológico ha resultado importante en la descripción de mecanismos de acción de algunos fármacos.

Los complejos metálicos solo requieren ser moléculas electroquímicamente activas con al menos un grupo que se pueda oxidar o reducir con la transferencia de electrones. Con esta condición encontramos familias de compuestos que contienen grupos N-óxidos, nitroderivados, etc.

En este trabajo se estudiará un nitrocompuesto como ligante en los complejos metálicos, en el que el grupo nitro puede reducirse y generar una variedad de intermediarios reactivos dependiendo del medio en que ocurra la reducción, pudiendo generarse en condiciones aeróbicas el radical nitro anión mediante la acción de nitrorreductasas al interior del parásito (*T. cruzi*). Luego, el radical nitro anión formado puede ser re-oxidado para generar el nitro compuesto y producir el radical superóxido (ver Ecuación 1), llegando incluso al radical hidroxilo [29].



Ecuación 1. Generación del anión radical superóxido.

La adición de un electrón al radical superóxido conduce a la formación de uno de los radicales libres más reactivos que existen: el radical hidroxilo (OH \cdot), mediante la descomposición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado. Este radical tiene la capacidad de reaccionar con la mayoría de las moléculas a nivel fisiológico [29].

Se han utilizado diferentes centros metálicos en complejos con actividad biológica, siendo platino y paladio dos de estos [10; 15; 20; 24; 37; 38; 39].

El platino es un elemento químico perteneciente al grupo 10 de la tabla periódica y posee una configuración electrónica [Xe] 4f¹⁴ 5d⁹ 6s¹. Puede tener los estados de oxidación II, IV, V y VI. Los compuestos de platino con estados de oxidación II estabilizan una geometría plana cuadrada (d⁸) mientras que los con estados de oxidación IV presentan una geometría octaédrica (d⁶). El platino (II) es un ácido de Lewis y un metal blando, por lo que tiende a coordinarse con ligantes que contienen azufre y fósforo (bases blandas); así como también, con ligantes nitrogenados, que son de gran importancia en la química bioinorgánica, como por ejemplo el cisplatino.

Los complejos de platino, han sido estudiados contra la tripanosomiasis americana, entregando prometedores resultados, como por ejemplo los compuestos de platino con ligantes de 1-indanona derivados de tiosemicarbazona que mostraron efectos tóxicos en el parásito en un rango micromolar y fueron más activos que Nifurtimox y que el respectivo ligante libre, en tripomastigotes de *T. cruzi* [31]. También, los complejos de platino con ligantes de 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona exhibieron actividad tripanocida, la que se atribuyó a dos posibles mecanismos de acción, por una parte producción intraparasitaria de radicales libres y por otra, interacción con el ADN del parásito [20]. Asimismo,

existen trabajos que mencionan una cierta relación entre la actividad antiparasitaria de complejos de platino y la lipofilia [31; 33].

Por otra parte, también se ha descrito el uso de paladio en complejos metálicos de interés biológico. El paladio pertenece al grupo 10 de la tabla periódica y posee una configuración electrónica $[\text{Kr}] 4d^{10}$. Al igual que platino, forma complejos de importancia biológica con estado de oxidación II y IV, de geometría cuadrada planar (d^8) y octaédrica (d^6), respectivamente. Es un ácido de Lewis y un metal blando.

Diversos estudios han demostrado que este metal forma complejos muy lábiles, lo que es contraproducente debido a que aumenta la toxicidad y disminuye la biodisponibilidad del fármaco [31]; por ello, el diseño de este tipo de complejos requiere ligantes que posean un grupo N y S donador, con el fin de garantizar la integridad estructural [15].

Estudios previos han descrito que la geometría cuadrada planar, típica del Pd(II), se distorsiona ligeramente según la naturaleza de los ligantes. Así, cuando el complejo posee como ligante una cadena etilénica, el enlace N-Pd-N es menor a 90° . Cabe destacar que la actividad biológica no se basa únicamente en sus propiedades químicas, siendo dependiente en gran medida de su estructura. Es importante mencionar que una ligera modificación puede afectar drásticamente la absorción, solubilidad, perfil reactivo, comportamiento farmacocinético, lipofilia, propiedades ácido-base, biodistribución y a su vez también la toxicidad, excreción y metabolización del complejo [31].

C. Olea y col. [42], han descrito un mecanismo de autoprotónación en nitrocompuestos a bajos potenciales de reducción mediante el cual la molécula con un grupo nitro cede un hidrógeno lábil, el que es aceptado por el grupo nitro quedando un radical nitro protonado. Estudios posteriores, han observado este mecanismo para complejos con nitrocompuestos derivados de tiosemicarbazona, proponiendo además que complejos de paladio y platino mejoran la actividad

biológica de derivados de tiosemicarbazona sustancialmente [19; 21; 24; 25; 31; 33; 34; 37; 38; 39].

C. Rigol y col. [19], identificaron parámetros característicos mediante voltametría cíclica asociados a procesos de reducción del grupo nitro del ligante derivado de tiosemicarbazona libre [19]. En dicho estudio caracterizaron la transferencia reversible de un electrón correspondiente a la cupla de generación del radical nitro anión alrededor de -0,80 V [19]. También observaron una señal correspondiente a la generación de la hidroxilamina y una cupla correspondiente a la reducción del grupo imino [19]. Además, se observó la autoprotonación del grupo nitro a potenciales bajos [19; 42]. Esto ocurre porque el grupo nitro aumenta la acidez de la tiosemicarbazona, facilitando así la autoprotonación.

M. Cipriani, J. Toloza y col. [33], evidenciaron que al formar complejos de platino o paladio con ligante cloruro, PTA y el derivado de tiosemicarbazona descrito, se favorece la reducción del grupo nitro, lo cual puede explicarse por una sinergia metal-ligante y por la polarizabilidad del ligante cloruro.

En este proyecto se estudió cuatro derivados nuevos de una familia de complejos metálicos de paladio y platino que fue estudiada con anterioridad por el grupo [10], los cuales fueron sintetizados por el grupo de la Dra. Lucía Otero. Estos tienen como ligante: 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona (bidentado) como ligante bioactivo, 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) o trifenilfosfina (PPh₃) que tienen como objetivo modular la lipofilia, e ioduro que aumentaría la polarizabilidad del complejo (Figura 6). Estos complejos se presentan a continuación.

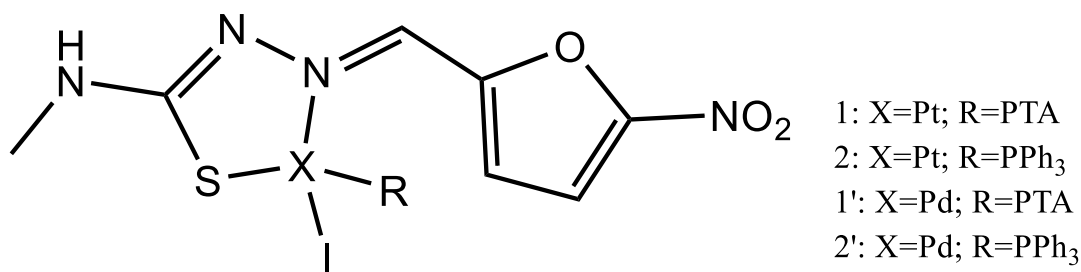


Figura 6. Esquema general de complejos de estudio.

HIPÓTESIS

Los complejos de coordinación de paladio y platino tienen actividad biológica contra el parásito *Trypanosoma cruzi*, asociada a la formación de especies radicalarias generadas por la reducción del grupo nitro del ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad tripanocida de nuevos complejos de coordinación de paladio y platino, asociada a la reducción de grupo nitro del ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el mecanismo de reducción de los complejos de paladio y platino mediante voltametría cíclica.
2. Detectar las especies radicalarias generadas electroquímicamente y obtener la densidad de espín en la molécula, mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico.
3. Identificar especies radicalarias producidas en medio parasitario por acción de los complejos, a través de espectroscopía de resonancia de espín electrónico mediante la técnica *spin trapping*.
4. Determinar la citotoxicidad de estos compuestos en células VERO (modelo de célula de mamífero) y parásitos (*Trypanosoma cruzi*).

METODOLOGÍAS

Caracterización electroquímica por Voltametría Cíclica (VC)

El estudio se realizó en un equipo *Metrohm 797 VA*, en medio aprótico, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, perclorato de tetrabutilamonio (PTBA 0,1 M) como electrolito de soporte, un alambre de platino como electrodo auxiliar, Ag/AgCl (KCl 3 M) como electrodo de referencia y gota colgante de mercurio como electrodo de trabajo; los complejos fueron estudiados a una concentración 25 mM en celda. Antes de cada medición se purgó con nitrógeno gaseoso durante 5 minutos. Se obtuvieron voltamogramas a distintas velocidades de barrido desde los 0,5 a los 2,5 V/s para observar si hay o no desplazamiento de los potenciales redox, lo que entregaría información acerca de la reversibilidad de las cuplas. Los registros se realizaron a temperatura ambiente y las señales obtenidas fueron procesadas en el programa *Origin 8*.

La voltametría cíclica tiene la ventaja de permitir el análisis de mecanismos de reducción de compuestos electroactivos empleando parámetros obtenidos de los voltamogramas. Así como también, esta técnica es una de las más usadas para obtener información cualitativa de sistemas que involucran reacciones electroquímicas.

Esta técnica consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario primero en el sentido de la reducción de los complejos tornando más negativo el electrodo hasta alcanzar un potencial determinado, seguido de la oxidación donde el electrodo se torna más positivo hasta volver al valor inicial. Durante el barrido del potencial, el potencióstato del equipo registra la corriente resultante al potencial aplicado, así, se obtiene un gráfico conocido como voltamograma cíclico.

Los parámetros que se obtienen a partir de un voltamograma cíclico son los potenciales de pico anódico y catódico (simbolizado E_{pa} y E_{pc} , respectivamente),

la diferencia entre dichos potenciales (ΔE) y el cociente entre la corriente anódica y catódica (I_{pa}/I_{pc}). Tanto la diferencia de potenciales como el cociente entre la corriente anódica y catódica, son índices que indican si la reacción es cuasi-reversible, reversible o irreversible.

En 1966, R. S. Nicholson estableció una manera de calcular el cociente I_{pa}/I_{pc} refiriendo los valores de las corrientes al eje de valor cero, haciéndolas independientes de la línea base. Esto se logra introduciendo las corrientes obtenidas de un determinado voltamograma en la Ecuación 2, utilizando los valores absolutos de dichas corrientes [22].

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{(i_{pc})_0} + 0,485 \frac{(i_{ps})_0}{(i_{pc})_0} + 0,086$$

Ecuación 2. Cociente I_{pa}/I_{pc} .

Donde $(i_{pa})_0$ es la corriente de pico anódico medida desde el eje $Y=0$, $(i_{ps})_0$ es la corriente de viraje en el barrido de ida y barrido de vuelta medido desde el eje $Y=0$, e $(i_{pc})_0$ es la corriente de pico catódico medida desde el eje $Y=0$.

Espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico (REE)

La espectroscopía de resonancia de espín electrónico es una técnica que permite detectar y cuantificar especies paramagnéticas, es decir, compuestos con electrones desapareados, como por ejemplo los radicales libres. Esta técnica es muy útil para investigar concentraciones de radicales muy bajas, pero tiene como limitante el hecho de que dichos radicales sean lo suficientemente estables como para ser detectados.

La REE involucra el desdoblamiento de estados de espín electrónicos, inducido con un campo magnético. La muestra de estudio es inmersa en un fuerte campo magnético externo y expuesta a radiación de frecuencia del orden de las microondas, 9,85 GHz, banda X.

Para electrones desapareados, como es el caso de los radicales libres, los momentos de espín angular pueden tener dos orientaciones posibles y por lo tanto dar lugar a dos estados de espín con polaridades opuestas. Mientras que en ausencia de un campo magnético externo estos estados son degenerados, en presencia de un campo magnético externo la degeneración se pierde, obteniendo así dos estados de diferente energía. Este desdoblamiento es conocido como efecto *Zeeman*.

El conocimiento de las interacciones hiperfinas permite identificar las especies radicalarias, obteniendo información incluso sobre la distribución del electrón en la molécula.

Para detectar las especies radicalarias generadas por reducción electroquímica de los complejos estudiados se realizó la reducción *in situ*, utilizando como electrodo de trabajo un alambre de platino, como electrolito soporte perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) y como solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Todos los compuestos fueron estudiados a una concentración 1 mM y aplicando el potencial determinado mediante VC, correspondiente al proceso de formación del radical nitro anión, RNO_2^- .

Los espectros de REE fueron registrados utilizando un espectrómetro *Bruker ECS 106* de banda X (9,85 GHz), el cual está equipado con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

Las constantes de acoplamiento hiperfino experimentales fueron obtenidas mediante la simulación de espectros, utilizando el programa *WINEPR-SimFonia 1.25* y estimadas con una precisión de 0,05 G.

Actividad biológica en células VERO y *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c

Los cultivos celulares de *Trypanosoma cruzi* en el estadio epimastigote y células de mamífero VERO (fibroblasto de mono verde africano), se obtuvieron en el

Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.

Existen diversas metodologías para cuantificar el número de células, aunque las más empleadas son las colorimétricas o fotométricas, una de ellas es la reducción de sales de tetrazolio (MTT). El MTT es un reactivo amarillo, soluble en agua y que difunde fácilmente la membrana plasmática y se incorpora en las células.

Las células viables, tienen la capacidad de reducir al MTT a un compuesto insoluble en medio acuoso denominado azul de formazán, que se acumula en las células (ver Ecuación 3). La producción de azul de formazán en un cultivo celular es proporcional al número de células viables; por lo que, tras lisar a las células y solubilizar el colorante, es posible cuantificar la cantidad de células mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.



Ecuación 3. Reducción de MTT a Formazán, dentro de la célula.

Citotoxicidad en modelo de célula de mamífero (VERO)

Las células VERO fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 con rojo fenol, suplementado con 5% de suero fetal bovino a 37°C y humidificado a un 5% de CO₂.

Luego, las células fueron cosechadas y resuspendidas a una densidad final de 5x10⁵ células/mL, fueron sembradas e incubadas con los compuestos en estudio,

durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂, se utilizó Nifurtimox como control positivo. Los complejos se solubilizaron en DMSO y se alcanzó una concentración final de este solvente de 0,5% v/v.

Al terminar el periodo de incubación se agregó 5 mg/mL de MTT y se incubó durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, el formazán producido fue solubilizado con SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% en HCl (ácido clorhídrico) 0,01 N y se incubó por 12 horas a 37°C.

Luego, se registró la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas *Asys Expert Plus*[®]. La absorbancia es directamente proporcional al número de células viables al momento de agregar el MTT. Las células a las que no se adicionó ningún compuesto fueron utilizadas como control negativo, correspondiente al 100% de viabilidad. Los resultados obtenidos fueron procesados en el programa *Prism 6*.

Citotoxicidad en parásitos

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Dm28c fueron cultivados en medio *Diamond* (triptosa 6,25 g, triptona 6,25 g, extracto de levadura 6,25 g, NaCl 6,25 g, KH₂PO₄ 4 g, por litro de agua), suplementado con hemina 4 μM, 5% de suero fetal bovino y una mezcla de penicilina sódica 100 μg/mL y estreptomycin 100 μg/mL. La cantidad de 80x10⁶ epimastigotes equivalen a 12 mg de peso fresco y a 1 mg de proteína fresca [17].

Luego, los parásitos cosechados, a densidad 3x10⁶ epimastigotes/mL, fueron sembrados con cada uno de los compuestos en estudio, e incubados durante 24 horas a 28°C y 5% CO₂, se utilizó Nifurtimox como control positivo. Los complejos fueron disueltos en DMSO y se alcanzó una concentración final de este solvente de 0,5% v/v.

Al terminar este periodo de incubación se agregó 5 mg/mL de MTT y 0,22 mg/mL de fenacina y se incubó durante 4 horas a 28°C y 5% CO₂. Finalmente, el formazán producido fue solubilizado con SDS al 10% en HCl 0,01 N y se incubó por 12 horas a 28°C.

Luego, se registró la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas *Asys Expert Plus*[®]. La absorbancia es directamente proporcional al número de parásitos viables al momento de agregar el MTT. Los parásitos a los que no se adicionó ningún compuesto fueron utilizados como control negativo, correspondiente al 100% de viabilidad. Se procesaron los resultados en el programa *Prism 6*.

Determinación de especies radicalarias en epimastigotes de *T. cruzi* a través de *Spin Trapping*

Para detectar las especies radicalarias generadas en el parásito por los complejos, se utilizó la técnica de atrapamiento de espín (*spin trapping*), que consiste en utilizar un atrapador de espín (*spin trap*), que es una molécula diamagnética que reacciona con un radical libre, formando un aducto de espín radicalario de mayor tiempo de vida media que el radical de origen y que presenta un espectro de REE que permite su identificación. Para el ensayo se utilizó 8×10⁷ epimastigotes/mL de *T. cruzi*, suspendidos en *buffer* fosfato salino pH 7,4 y 100 mM de DMPO (5,5-dimetil-1-pirrol-N-óxido) como atrapador de espín, 1mM de NADPH que favorece la biorreducción del grupo nitro. Se añadió 1 mM de cada complejo a estudiar en DMSO.

Los espectros de REE fueron registrados utilizando un espectrómetro *Bruker ECS 106* de banda X (9,85 GHz), el cual está equipado con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo.

Las constantes de acoplamiento hiperfino experimentales fueron obtenidas mediante la simulación de espectros, utilizando el programa *WINEPR-SimFonia 1.25* y estimadas con una precisión de 0,05 G.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estudio electroquímico mediante Voltametría Cíclica

Se realizó el estudio electroquímico de la serie de complejos para evaluar la influencia de la variación de los ligantes y del metal central en la capacidad oxidante de los complejos. De acuerdo a la literatura un posible mecanismo de acción tripanocida de los derivados de tiosemicarbazona implicaría la generación de estrés oxidativo en el parásito de *T. cruzi*, que es deficiente en mecanismos antioxidantes en comparación a las células humanas [19; 20; 21; 23; 24; 25; 26; 31; 32; 33; 34; 35; 37].

El potencial de reducción es un parámetro fisicoquímico que determina la energía necesaria para que un compuesto capte electrones. La caracterización electroquímica mediante voltametría cíclica permite obtener información acerca de la reversibilidad del proceso de reducción y en conjunto con otras técnicas obtener información del mecanismo de acción [32].

Se realizó este estudio electroquímico de los complejos mediante voltametría cíclica con el objetivo de determinar principalmente los potenciales de reducción del grupo nitro; grupo que ha demostrado ser de interés biológico [19].

En la Figura 7 se muestra la estructura del ligante libre, 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona, utilizado como estructura base.

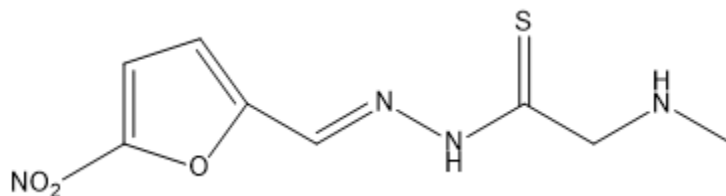


Figura 7. Ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

En la Figura 8 se muestra el voltamograma del complejo 2 (Pt; PPh₃), registrado en una ventana de potencial de -0,2 a -1,1 V, a diferentes velocidades de barrido y representativo de todos los complejos, en donde se aprecia una dependencia entre la velocidad de barrido y la intensidad de corriente.

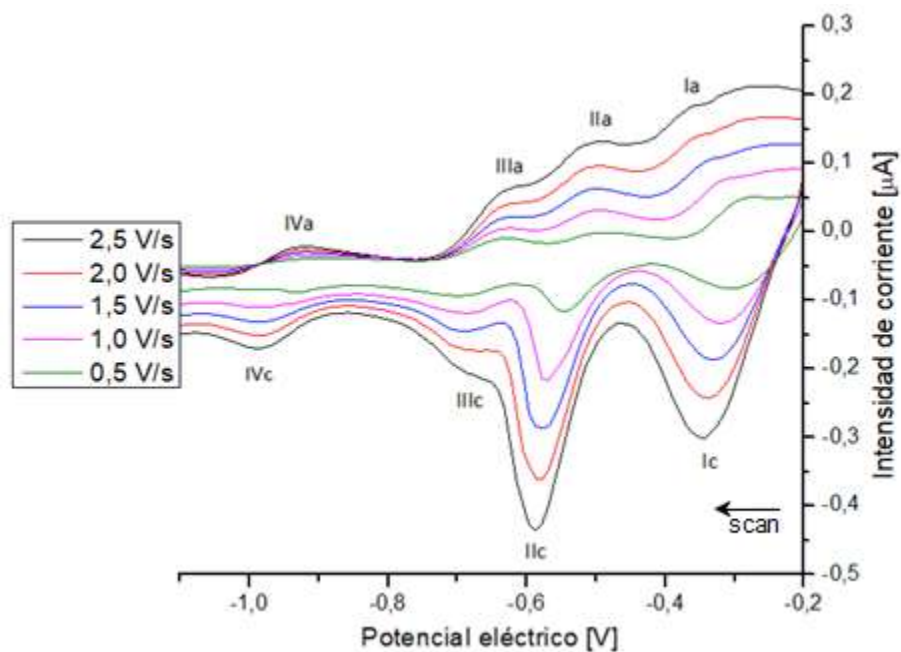


Figura 8. Voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a diferentes velocidades de barrido.

Por otra parte, mediante la adición de hidróxido de sodio se observó la disminución de intensidad de la señal I_c , por lo cual se comprueba que hay una reacción química asociada al mecanismo de reducción, la cual podría indicar que hay un mecanismo de autoprotonación [19; 33; 42]. Este ensayo no alteró las demás señales del voltamograma (ver Figura 9), por lo que son atribuidas a reacciones electroquímicas puras.

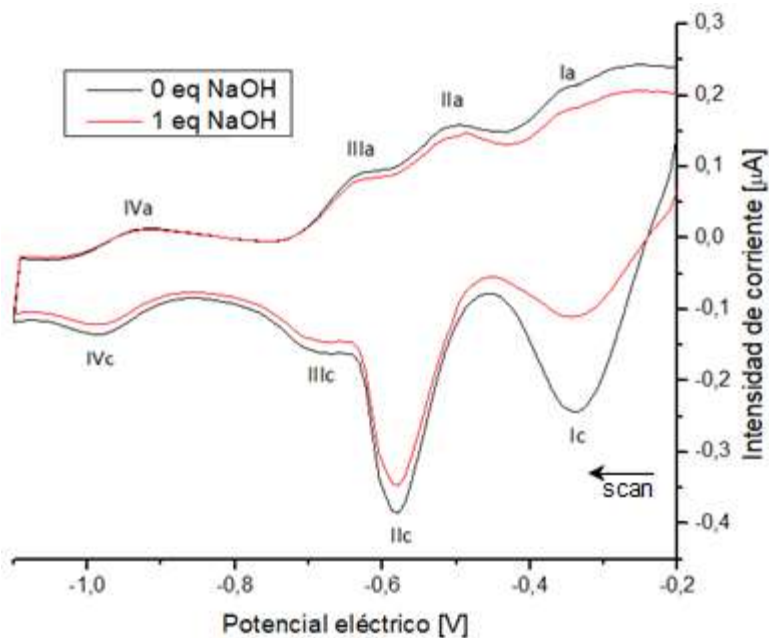


Figura 9. Influencia de adición de NaOH en el voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a velocidad de barrido de 2000 mV/s.

Para el voltamograma del complejo 2 (Figura 10) es posible apreciar cuatro cuplas. La primera correspondiente a la autoprotonación del grupo nitro junto a su respectiva oxidación al nitroso derivado alrededor de -340 mV (Ic/Ia), la segunda correspondiente a la generación del radical nitro anión alrededor de -560 mV (IIc/IIa), la tercera correspondiente a la generación de la hidroxilamina alrededor de -660 mV (IIIc/IIIa), y la cuarta correspondiente a la reducción del grupo imino alrededor de -950 mV (IVc/IVa) [19; 32].

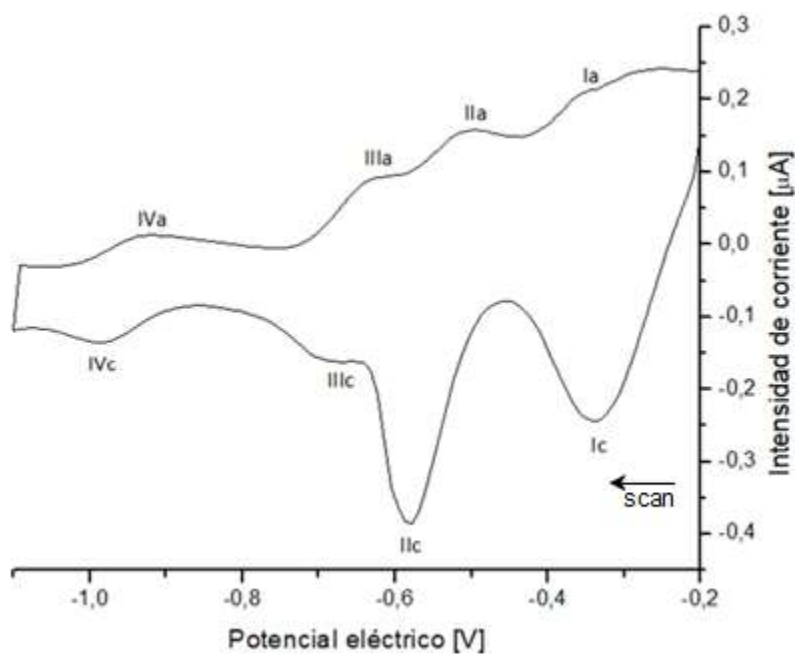


Figura 10. Voltamograma cíclico del complejo 2; PTBA 100 mM en DMSO; a velocidad de barrido de 2000 mV/s.

En la Tabla 1 se presentan los parámetros obtenidos del voltamograma de la Figura 8, que caracterizan las cuplas detectadas a una velocidad de barrido de 2000 mV/s.

Tabla 1. Parámetros electroquímicos para los complejos.

Complejo	Ep Ic [V]	Ep Ia [V]	Ep IIc [V]	Ep IIa [V]	Ep IIIc [V]	Ep IIIa [V]	Ep IVc [V]	Ep IVa [V]
1	-0,37	-0,36	-0,58	-0,51	-0,72	-0,65	-0,97	-0,93
2	-0,33	-0,34	-0,57	-0,49	-0,66	-0,61	-0,98	-0,92
1'	-0,34	*	-0,58	-0,48	-0,69	-0,66	-0,97	-0,91
2'	-0,34	-0,32	-0,56	-0,47	-0,70	-0,65	-0,96	-0,90

*: No fue posible determinar este valor debido a la poca definición del pico anódico.

En los voltamogramas registrados se pudo apreciar cuatro cuplas, a potenciales menos negativos que los descritos por Rigol y col. para 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona [19]. Esto sugiere la mayor facilidad de reducir al ligante en estos complejos versus el ligante libre.

Es de relevancia destacar que el potencial donde aparece la cupla del radical nitro anión (IIc/IIa) en estos complejos (alrededor de -0,56 V) es menor, en valor absoluto, que el valor descrito para el ligante libre (alrededor de -0,80 V) [19]. Esto denota la mayor factibilidad de generar el radical libre por estos complejos. Siendo así, se postula que tanto paladio como platino podrían aumentar la actividad biológica en relación al ligante libre.

Los valores de la Tabla 2 fueron obtenidos aislando la cupla de generación del radical nitro anión, por lo que pueden aparecer ciertas diferencias con respecto de

los voltamogramas mostrados anteriormente, donde E_p IIc corresponde al potencial catódico, E_p IIa corresponde al potencial anódico, ΔE corresponde a la diferencia entre los potenciales catódico y anódico, E_p $\frac{1}{2}$ corresponde al potencial medio e I_{pa}/I_{pc} corresponde a la razón entre la corriente anódica y catódica. El valor del potencial medio de la cupla IIc/IIa está relacionado con la factibilidad de generar el radical nitro anión, con relevante importancia biológica.

Tabla 2. Parámetros electroquímicos para la cupla de generación del radical nitro anión, para los cuatro complejos.

Complejo	E_p IIc [V]	E_p IIa [V]	ΔE [V]	E_p $\frac{1}{2}$ [V]	I_{pa}/I_{pc}
1	-0,597	-0,555	0,042	-0,576	1,079
2	-0,578	-0,542	0,036	-0,560	1,040
1'	-0,588	-0,543	0,045	-0,565	1,029
2'	-0,570	-0,518	0,052	-0,544	1,011

Un criterio para determinar si una cupla es reversible es analizar el parámetro ΔE , donde para una cupla reversible ΔE es igual que 60 mV, y el parámetro I_{pa}/I_{pc} es igual a 1. Para una cupla cuasi-reversible, ΔE debe ser aproximado a 60 mV a bajas velocidades de barrido e I_{pa}/I_{pc} distinto de 1. Para una cupla irreversible ΔE debe ser mayor a 60 mV e I_{pa}/I_{pc} distinto de 1.

Se observa que para los cuatro complejos se cumple con el criterio definido anteriormente, por lo que la generación del radical nitro anión es mediante un

proceso cuasi-reversible de transferencia de un solo electrón. El potencial medio determinado para Nifurtimox es -1,14 V y todos los complejos estudiados poseen valores absolutos menores de potencial de reducción, por lo que se propone que estos complejos generan el radical nitro anión con menor dificultad que Nifurtimox.

Un estudio reciente del grupo de investigación, menciona que cuando el complejo en vez de tener un yoduro como ligante, tiene un cloruro, el potencial medio es -0,67 V [17], lo que sugiere que al reemplazar como ligante cloruro por yoduro se facilita la formación del radical nitro anión dado que su potencial de reducción disminuye a -0,56 V, considerando valores absolutos. Esto puede ser explicado ya que yoduro tiene una mayor polarizabilidad ($7,1 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$) que cloruro ($3,66 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$), lo que otorga una mayor polarizabilidad a estos complejos [41], que al parecer tiene mayor influencia que la electronegatividad de estos halógenos.

Considerando los voltamogramas obtenidos y en concordancia con lo descrito anteriormente [20; 23; 24], se propone el siguiente mecanismo de reducción para los complejos estudiados (Figura 11).

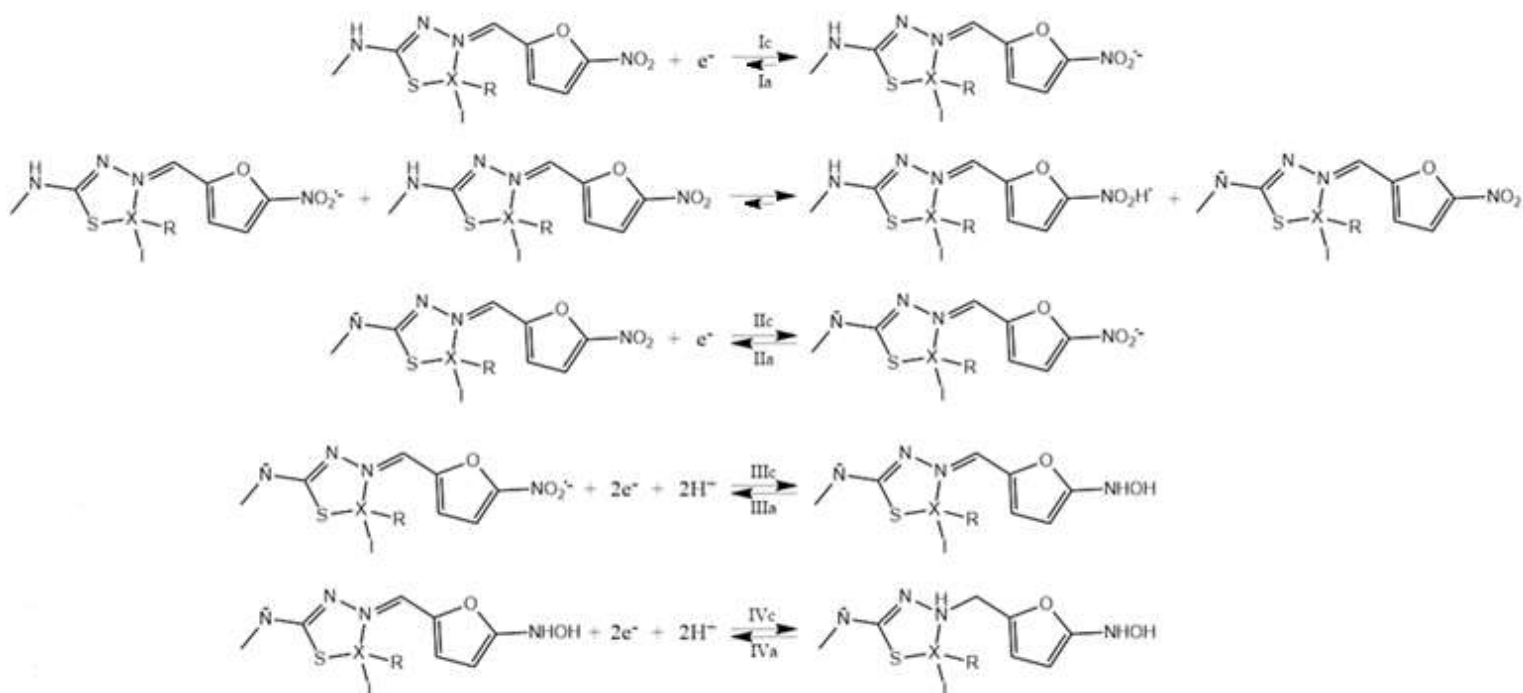


Figura 11. Mecanismo electroquímico propuesto para los complejos estudiados.

El efecto que proporcionan los metales platino y paladio complejados con el ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona, es evidenciado en el desplazamiento del potencial medio de reducción hacia valores menos negativos, y puede ser explicado mediante un modelo electrostático en que ambos núcleos metálicos ejercerían un efecto atractor.

Mediante el estudio electroquímico (VC) se propuso un mecanismo de reducción, en los cuales todos los complejos experimentan un proceso de autoprotónación independiente de la reducción del grupo nitro que genera el radical nitro anión. Además, se determinó un valor de potencial medio menos negativo que para la referencia reportada, correspondiente al ligante derivado de tiosemicarbazona solo y en formación de complejo con cloruro como ligante.

Estudio de espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico

Para obtener mayor información acerca del mecanismo de reducción de los complejos se realizó la generación electroquímica de especies radicalarias a los potenciales obtenidos por voltametría cíclica. La reducción electroquímica de los complejos se realizó bajo las mismas condiciones que en voltametría cíclica.

Los espectros de REE fueron simulados utilizando constantes de acoplamiento hiperfinas descritas previamente para los ligantes y complejos [17; 20; 25; 26].

Generalmente, los radicales libres formados en compuestos nitro heterocíclicos deslocalizan el electrón desapareado mayoritariamente en el nitrógeno del grupo nitro, formando así un radical nitro anión [25]. En particular, los ligantes libres de nitrofuril derivados de tiosemicarbazona, exhiben un comportamiento diferente centrando la densidad de espín alrededor de los núcleos N² y H³ (ver Figura 12), al igual que en formación de complejos, debido a que adoptan una conformación plegada [25].



Figura 12. Esquema general para complejos estudiados mediante REE.

La Figura 13 muestra el espectro de REE del radical obtenido mediante una reducción electroquímica *in situ*, representativo para los cuatro complejos, ya que presentaron patrón hiperfino similar, cuyas constantes de acoplamiento hiperfino están en la Tabla 3.

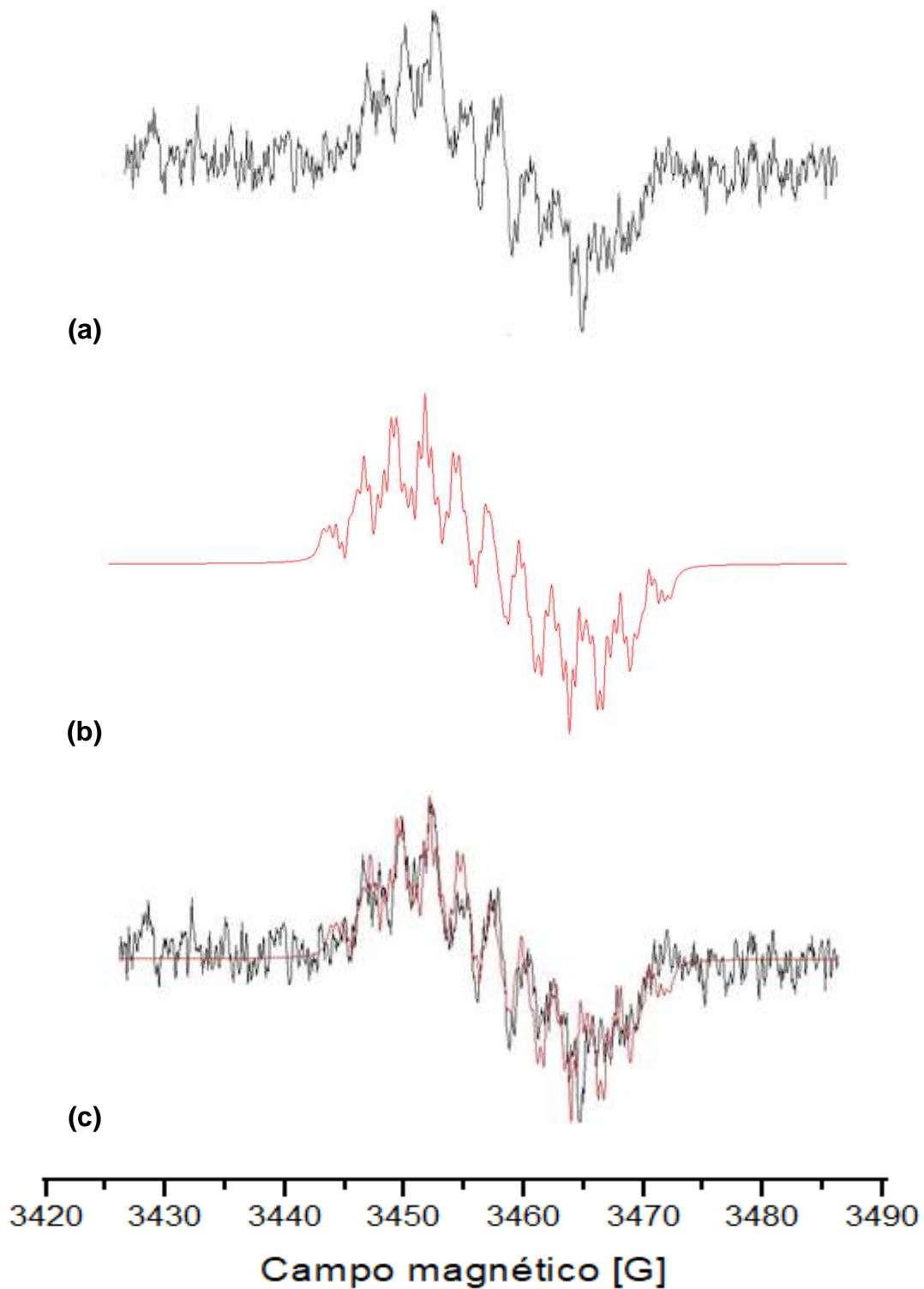


Figura 13. Espectro de REE del complejo 2': **(a)** espectro experimental; **(b)** espectro simulado; **(c)** superposición de ambos espectros.

El espectro simulado fue obtenido utilizando el programa *WINEPR-SimFonia 1.25* y estimado con una precisión de 0,05 G. La modificación del ancho de línea, la modulación de amplitud y la componente lorentziana/gaussiana fueron modificadas hasta alcanzar la mayor similitud con el espectro experimental.

Se realizó la interpretación de los espectros de REE considerando cálculos teóricos y experimentales previamente descritos [17; 20; 25; 26]. En la Tabla 3 se adjuntan las constantes de acoplamiento hiperfino obtenidas para cada complejo estudiado.

Tabla 3. Constantes de acoplamiento hiperfino [G] para los complejos estudiados.

Complejo	aN ¹	aN ²	aN ³	aN ⁴	aH ¹	aH ²	aH ³	aH ^R
1	2,18	5,67	2,07	1,53	3,28	0,72	2,23	0,59
2	3,70	5,36	1,56	0,94	3,64	0,35	2,74	*
1'	2,68	6,29	2,41	0,84	3,61	0,25	2,86	1,13
2'	3,38	6,03	2,80	0,58	4,39	1,32	2,91	0,55

*: No fue posible determinar este valor.

Los complejos 1, 1' y 2' presentan un espectro simulado con patrón hiperfino de 4 tripletes asignados al efecto que provocan los nitrógenos N¹ (nitro), N², N³ y N⁴ (tiosemicarbazona) y de 4 dobletes asignados al efecto provocado por los hidrógenos H¹ y H² (anillo furano), H³ y H^R (tiosemicarbazona).

El espectro simulado del complejo 2 presenta un patrón hiperfino de 4 tripletes asignados al efecto que provocan los nitrógenos N¹ (nitro), N², N³ y N⁴ (tiosemicarbazona) y de 3 dobletes asignados al efecto provocado por los hidrógenos H³ (tiosemicarbazona), H¹ y H² (anillo furano).

El patrón hiperfino y las constantes de acoplamiento determinadas tienen similitudes con el patrón hiperfino descrito para el ligante libre [25]. Es por esto que se sugiere que la conformación adoptada en los complejos estudiados, para el ligante derivado de tiosemicarbazona, es plegada.

Las constantes de acoplamiento registradas tanto para los complejos de paladio como para los de platino indican la existencia de una mayor deslocalización de la densidad de espín fundamentalmente en el N² del ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona, lo cual se explicaría mediante una transferencia de carga por espacio debido a la conformación plegada que tiene el ligante derivado de tiosemicarbazona.

Para los complejos con ligante PPh₃, se ha observado que las constantes de acoplamiento de N¹ aumentan con respecto de los complejos con ligante PTA, de lo que se infiere que hay una conformación menos distorsionada que para los complejos con ligante PTA, para ambos núcleos metálicos.

Dado que el complejo 2, con núcleo metálico de platino, presenta el mayor valor de constante de acoplamiento para N¹ podría ser el complejo con mejor actividad biológica. Esto debido a que la densidad electrónica estaría mayormente en el grupo nitro, lo que le daría una mayor reactividad. Lo anterior, se sustenta en que el grupo nitro es el encargado de entregar un electrón al oxígeno en medio biológico para generar de este modo las especies reactivas capaces de atacar proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, tal como se ejemplifica en la Figura 14 que esquematiza el caso de Nifurtimox, fármaco que posee en su estructura un grupo nitro.

En comparación con estudios realizados anteriormente para complejos con ligante cloruro en vez de yoduro [33], la deslocalización del electrón aumentó en el ligante derivado de tiosemicarbazona, a la vez que aumentaron significativamente los valores de las constantes de acoplamiento hiperfino para el grupo nitro. Esto puede ser explicado por el mayor tamaño que tiene el yoduro y por lo tanto la mayor polarizabilidad que ejerce sobre los complejos. Así, se propone que estos

complejos podrían tener una mayor actividad biológica porque el grupo nitro sería más reactivo, lo que facilitaría la generación del radical nitro anión.

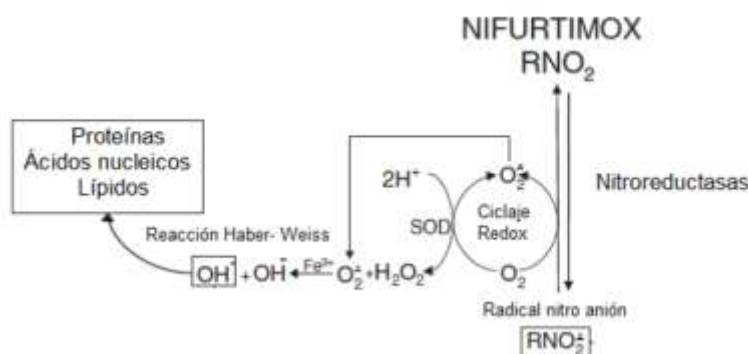


Figura 14. Reacción de generación de radicales libres en medio biológico.

De acuerdo a la teoría ácido-base duro-blando (ABDB) Pd(II) y Pt(II) son ambos ácidos de Lewis, blandos y por tanto fácilmente polarizables. Considerando sus radios, paladio es un metal más duro (o menos blando) que platino, por lo que tiene un mayor efecto atractor.

En cuanto a la conformación que adopta el derivado de tiosemicarbazona, es esperable que esté plegada para ambos núcleos metálicos, y considerando que paladio es más duro que platino, es esperable que esta conformación plegada esté más distorsionada para paladio. Esto último, facilita la deslocalización del radical mediante transferencia de carga por espacio, lo cual da cuenta del aumento de valor para las constantes de acoplamiento hiperfino para los núcleos N^2 y H^3 . Además, esto justifica que el potencial medio de la cupla IIc/IIa sea más negativo para los complejos de platino.

Mediante REE fue posible corroborar el mecanismo propuesto por VC, en el cual se postula la generación de especies radicalarias. En todos los complejos se evidenció una deslocalización del electrón en el ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

Evaluación de la viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio

Para evaluar el efecto de los complejos o drogas sobre la viabilidad celular de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron parásitos epimastigotes cepa Dm28c, y en el caso de células de mamífero se utilizaron células VERO, ambos cultivos proporcionados por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina.

Mediante la técnica de MTT, se determinó el número de células viables a diferentes concentraciones de droga o complejo. A partir de las curvas dosis-respuesta se determinó los valores de IC_{50} (concentración a la cual se inhibe el 50% de la viabilidad de células) para cada droga. Se utilizó como control positivo el fármaco Nifurtimox a una concentración de 75 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Las curvas dosis-respuesta se muestran en las Figuras 15 y 16 para células de mamífero y parásitos, respectivamente, junto a un gráfico de barras correspondiente a viabilidad celular para cada uno de estos modelos estudiados.

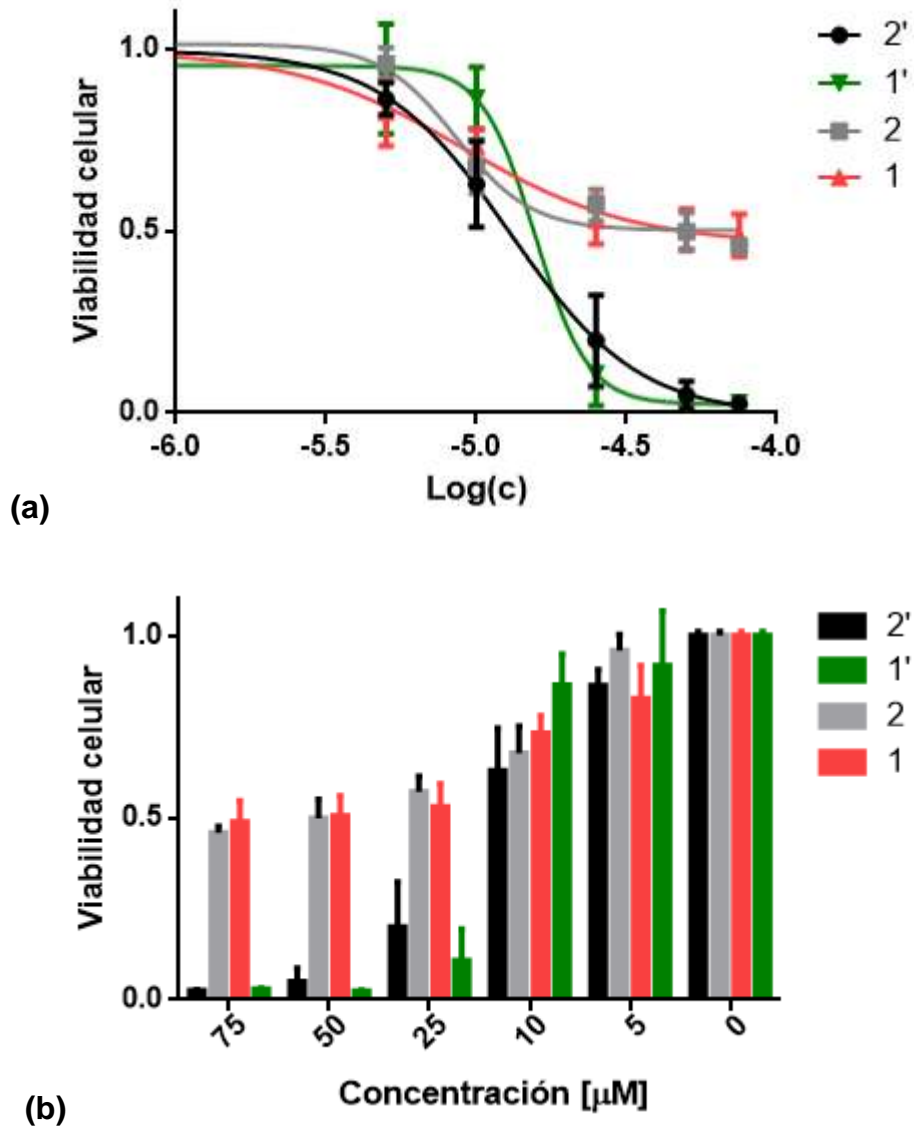
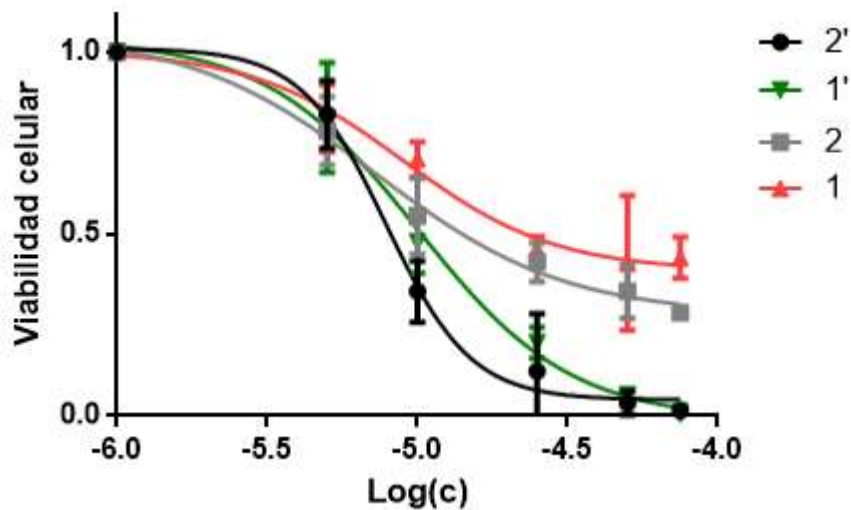
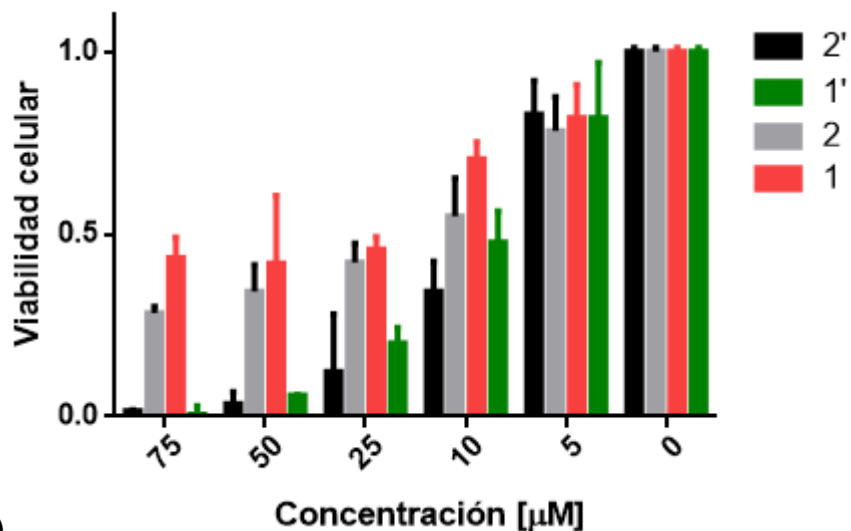


Figura 15. (a) Curva dosis-respuesta de viabilidad celular versus logaritmo de la concentración molar para las drogas estudiadas frente a células de mamífero (VERO). **(b)** Viabilidad celular versus concentración micromolar para las drogas estudiadas frente a células de mamífero (VERO).



(a)



(b)

Figura 16. (a) Curva dosis-respuesta de viabilidad celular versus logaritmo de la concentración molar para las drogas estudiadas frente a *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). **(b)** Viabilidad celular versus concentración micromolar para las drogas estudiadas frente a *Trypanosoma cruzi* (epimastigote).

Tabla 4. Valores de IC₅₀ en cultivos celulares de *Trypanosoma cruzi* y células de mamífero. Los valores son representados como el promedio y su desviación estándar de tres ensayos independientes (n=3).

Complejo	IC ₅₀ (μM) ¹		Índice de Selectividad: IC ₅₀ ^{VERO} /IC ₅₀ ^{TC}
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Células VERO	
1	10,01 ± 1,74	15,67 ± 0.76	1,56
2	8,98 ± 1,28	10,99 ± 1,05	1,22
1'	7,85 ± 2,51	12,95 ± 0,24	1,65
2'	7,28 ± 1,04	8,54 ± 1,87	1,17
Nifurtimox	17,52 ± 0,87	>100	6,05

¹ IC₅₀: concentración a la cual se inhibe el 50% de la viabilidad de células.

En términos generales se observa que la citotoxicidad sobre células de mamífero es elevada, al igual que la actividad tripanocida.

Considerando los valores de IC₅₀ obtenidos de las curvas dosis-respuesta se postula que las drogas con trifenilfosfina (PPh₃) como ligante, presentan una mayor potencia respecto de las drogas con 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) como ligante. Esto probablemente es debido a la lipofilia de estos complejos, ya que favorecería que atravesen la membrana celular.

Además, es posible establecer que las drogas con ligante PPh₃ presentan una eficacia máxima similar a las drogas con ligante PTA. Las pendientes son diferentes al mantener el ligante y cambiar el núcleo metálico, por lo que se observa una mayor diferencia al cambiar de metal que de ligante.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas para las drogas con paladio mostraron una mayor potencia y una mayor eficacia máxima en relación a las curvas de las drogas con platino. Asimismo, las drogas con paladio presentan una mayor pendiente, lo que da cuenta de un mayor cambio en la respuesta por dosis unitaria respecto de las drogas con platino.

Referido a los dos tipos de cultivos, es posible observar que para *T. cruzi* todas las drogas tienen una mayor potencia, y que las drogas de platino tienen una mayor eficacia máxima, respecto del cultivo de células VERO. Las drogas de paladio presentan una eficacia máxima similar en ambos cultivos, pero diferentes potencias.

Por lo tanto, se postula que para los complejos con mismos ligantes, el que posee el núcleo metálico de paladio presenta una mayor potencia, lo cual es concordante con el estudio electroquímico en que los complejos de paladio presentan un menor potencial de reducción del grupo nitro (menor valor absoluto) y una mayor deslocalización del electrón, según el estudio de REE, lo que les proporcionaría a estos complejos una mayor facilidad para biorreducirse.

En comparación con estudios realizados anteriormente para complejos con ligante cloruro en vez de ioduro [33], los valores obtenidos de IC_{50} , tanto para *T. cruzi* como para célula de mamífero, son inferiores a los reportados. Esto sugiere que los complejos con ioduro como ligante tienen una mayor potencia, lo cual podría explicarse por la mayor polarizabilidad que tiene ioduro respecto de cloruro.

El complejo 1', núcleo de paladio con ligante PTA, presentó una mayor diferencia entre los valores de IC_{50} , para epimastigotes igual a $7,85 \mu M$ y para VERO igual a $12,95 \mu M$, siendo esta droga la más selectiva hacia *Trypanosoma cruzi*, con un índice de selectividad igual a 1,65. En comparación con lo descrito para Nifurtimox (índice de selectividad = 6,05) es un menor valor de índice de selectividad, pero el más relevante dentro de estos complejos.

Estudio mediante *Spin Trapping*

Con el objetivo de analizar la capacidad de estos complejos para provocar la formación de especies radicalarias en medio biológico como posible mecanismo de acción tripanocida [29], se realizaron estudios de atrapamiento de radicales libres mediante REE en cultivos de epimastigotes Dm28c, para lo cual se utilizó la técnica de atrapamiento de espín; se usó como atrapador 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO).

DMPO es una nitrona que se utiliza como atrapador (*spin trap*) de radicales libres, capaz de diferenciar las especies radicalarias atrapadas mediante el patrón hiperfino que genera en REE (ver Figura 17), siendo esta una gran ventaja frente a otros atrapadores que solamente pueden detectar radicales y no identificarlos.

En sistemas biológicos, DMPO es capaz de atravesar membranas celulares y reaccionar con diferentes radicales libres centrados en carbono y oxígeno [28].

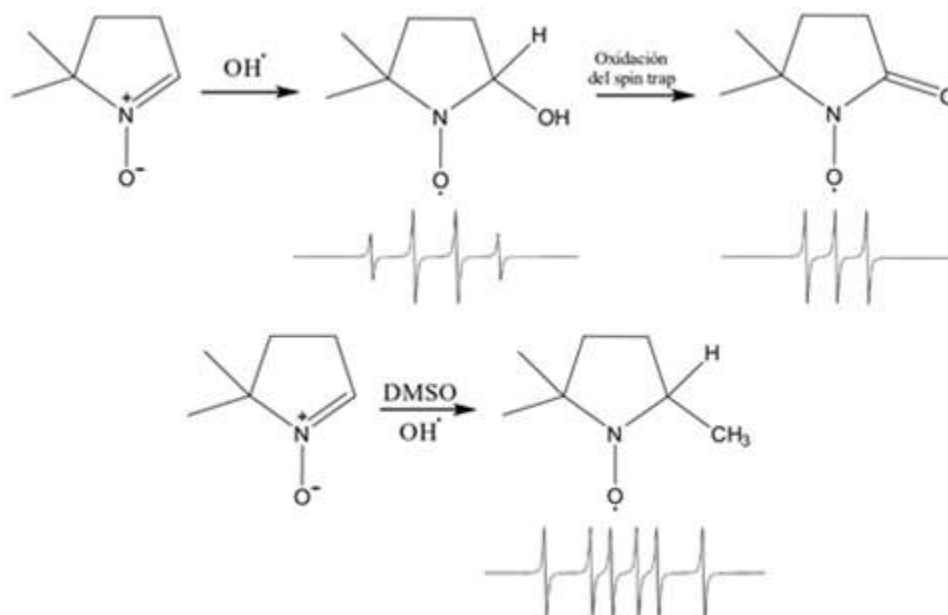


Figura 17. Ejemplos de *spin trap* para radicales centrado en oxígeno y carbono atrapados con DMPO, generados de manera química.

Los ensayos de atrapamiento de radicales fueron realizados en epimastigotes Dm28c, en los que se evaluaron los complejos y se registraron los espectros de REE, a partir de lo que se obtuvieron los patrones hiperfinos para cada complejo. Todos los espectros obtenidos presentaron patrones hiperfinos muy similares, pero con distintas intensidades lo cual da cuenta de la concentración de especies radicalarias que atrapa el DMPO.

Se ha descrito que la *menadiona* es un potente generador de estrés oxidativo (ver Figura 18) [25; 26; 27], por lo que se utiliza como blanco positivo. En dichos trabajos, se alude a la formación del aducto de espín DMPO-CH₃ que resulta de la reacción entre el radical hidroxilo (OH[•]) con DMSO, observándose un sexteto con constantes de acoplamiento hiperfino a_N=15,2 G y a_H=23,6 G.

Adicionalmente, se presenta un cuarteto correspondiente a la formación del aducto de espín DMPO-OH con constantes de acoplamiento a_H=a_N=14,9 G; el radical hidroxilo es generado a partir de la interacción del radical nitro anión (RNO₂^{•-}) con el oxígeno molecular en el interior del parásito (reacción de Haber-Weiss).

También, se evidencia un triplete que corresponde a la oxidación del DMPO a DMPOX con constante de acoplamiento a_N=14,7 G. Esto se debe en primera instancia a la formación del aducto de espín DMPO-OH, el que luego evoluciona rápidamente a DMPOX a través del mecanismo propuesto por Burkitt (Figura 21) [29].

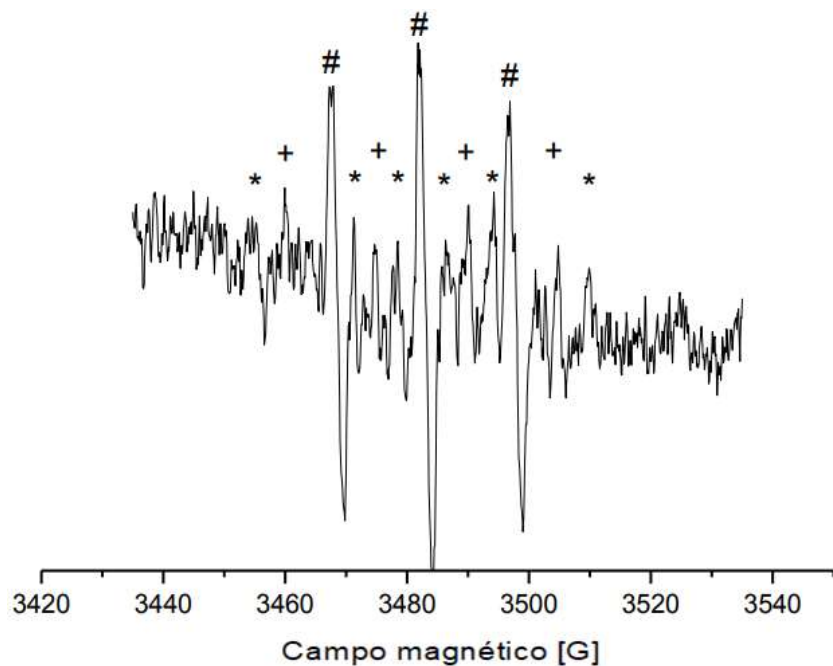


Figura 18. Espectro de REE de Menadiona (blanco positivo) generado en epimastigotes Dm28c. En el espectro se simboliza a los aductos de espín: DMPO-CH₃ (*), DMPO-OH (+) y DMPOX (#).

Adicionalmente, en la Figura 19 se presenta el espectro de REE para el complejo 1' que generó la mayor actividad en el sistema celular de *T. cruzi*, de manera selectiva. El espectro es representativo de los cuatro complejos de este estudio.

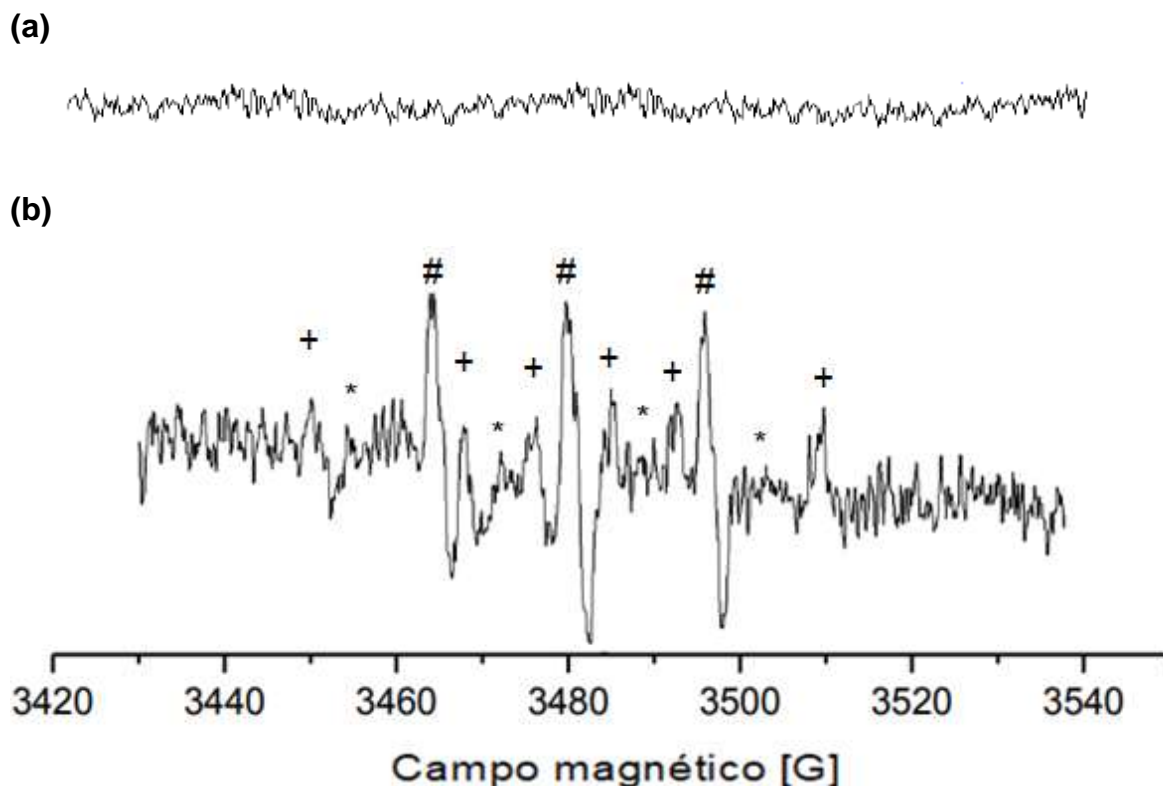


Figura 19. (a) Control: parásitos en *buffer* fosfato, NADPH, DMPO y DMSO. **(b)** Parásitos con *buffer* fosfato, NADPH, DMPO, DMSO y complejo 1', donde (+) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-CH₃, (#) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPOX, y (*) corresponde al patrón hiperfino para el aducto de espín DMPO-OH.

En la Figura 19 se muestra el espectro con 3 patrones característicos: un sexteto (+), un cuarteto (*) y un triplete (#). Referido al sexteto, este patrón corresponde al atrapamiento del radical metilo, DMPO-CH₃ ($a_N=15,7$ G; $a_H=23,3$ G), el cual es producto de la reacción del radical hidroxilo con el vehículo, representado en la Figura 20.

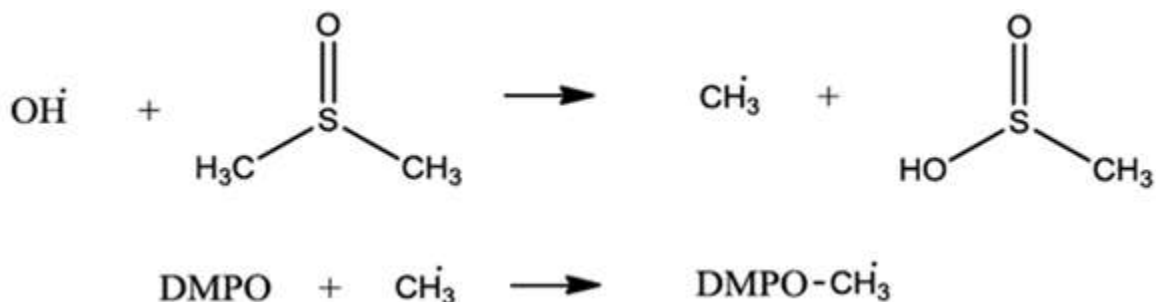


Figura 20. Reacción entre el radical hidroxilo con el vehículo DMSO.

Por esto, se puede postular que los complejos de este estudio generan radical $\text{OH}\cdot$; como posible mecanismo para la acción tripanocida mediante estrés oxidativo.

El triplete, en la Figura 19, corresponde a la descomposición del atrapador DMPO en su forma oxidada, DMPOX, con una constante de acoplamiento $a_N=14,9$ G. Esta descomposición no es natural, tal como se demuestra en el espectro (a) de la Figura 19, sino que se debe a la previa formación del aducto de espín DMPO-OH, que luego evoluciona rápidamente a DMPOX (Figura 21) a través del mecanismo ya mencionado.

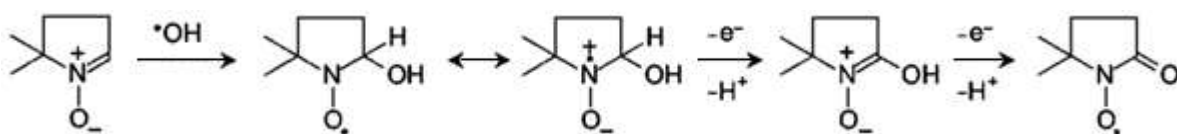


Figura 21. Mecanismo de descomposición del atrapador DMPO debido al radical hidroxilo.

Adicionalmente, en la Figura 19, el cuarteto se relaciona con el atrapamiento del radical hidroxilo, formando DMPO-OH, con constantes de acoplamiento $a_N=a_H=14,6$ G. La baja intensidad de la señal se debe a que parte del radical

hidroxilo reacciona con el atrapador, el cual se descompone formando DMPOX, o bien, reacciona con otras moléculas, generando radical metilo que explica la formación del aducto DMPO-CH₃.

Como los parásitos estaban enteros al momento de realizar este ensayo, es posible demostrar que estos compuestos logran atravesar la membrana celular y tener contacto con la nitrorreductasa para biorreducirse y generar por lo tanto, los metabolitos radicalarios tóxicos iniciadores del estrés oxidativo dentro de los parásitos.

Se postula que los complejos de paladio presentan una mayor actividad tripanocida (de manera más selectiva), lo cual es concordante con el estudio electroquímico y de REE realizados, en que estos presentan un menor potencial de reducción del grupo nitro lo que favorecería su biorreducción. De esta manera se puede proponer un mecanismo de estrés oxidativo por el cual interaccionan estos complejos, mediante la generación intraparasitaria del radical hidroxilo como se mostró mediante la técnica *spin trapping*.

CONCLUSIONES

Los complejos estudiados tienen actividad biológica contra el parásito *Trypanosoma cruzi*, asociada a la formación de especies radicalarias generadas por la biorreducción del grupo nitro en el ligante 5-nitrofuril derivado de tiosemicarbazona.

La actividad tripanocida de los complejos indicaría que la inclusión del grupo trifenilfosfina favorecería que los complejos atravesen la membrana celular. Sin embargo, la alta citotoxicidad en células de mamífero impediría su uso como agentes tripanocidas potenciales. Por lo que, pequeñas variaciones en los sustituyentes permitiría generar complejos con potencial aplicación en biomedicina.

El paladio como núcleo metálico favorecería la sinergia metal-ligante e ioduro como ligante favorecería la polarizabilidad del complejo, mejorando su actividad tripanocida.

Utilizando la técnica de *spin trapping* fue posible identificar y caracterizar las especies radicalarias producidas dentro del parásito, junto con corroborar un posible mecanismo de estrés oxidativo.

REFERENCIAS

- [1] Korolkovas, A., et al. Compendio esencial de química farmacéutica. *Ed Reverté*, 1983.
- [2] Bray, F., et al. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* **13**, 790-801.
- [3] Conteh, L., et al. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 2010. **375**(9710): 239-247.
- [4] Sychrova, H. Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res*, 2004. **53 Suppl 1**: S91-8.
- [5] Guo, Z. & Sadler, P. J. Metals in Medicine. *Ang Che Int*, 1999. **38**: 1512-1531.
- [6] Chabner, B. A. Barnett Rosenberg: In Memoriam (1924–2009). *Cancer Research*, 2010. **70**: 428.
- [7] Oscar Aguilar Cuevas, R. C. R., et al. Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro. *Educación Química*, 2012. **23**: 33-40.
- [8] Lee, BY., et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*, 2013. **12**: 342–48.
- [9] Pérez Molina, J., et al. Chagas disease. *Lancet*, 2018. **391**: 82–94.
- [10] Toloza González, J., et al. (2016) Estudio Físicoquímico y Biológico de una serie de complejos metálicos con ligandos bioactivos contra *Trypanosoma cruzi* y células neoplásicas.
- [11] Organization, W.H. Chagas disease (american tripanosomiasis). Updated march 2015. **Fact sheet N°340**.

- [12] Olea-Azar, C., et al. ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridin pyridil ketones and dipyriddy ketones derivates. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2008. **71**(2): 703-709.
- [13] Olea-Azar, C., et al. ESR and electrochemical studies of 2-acylpyridines and 6,6'-diacyl-2,2'-bypiridines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2005. **61**(9): 2261-2266.
- [14] Evans, D.H., et al. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 1983. **60**(4): 290-295.
- [15] Marques, M.P.M. Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor. *International Scholarly Research Notices*, 2012. 2013, 29.
- [16] Olea-Azar, C., et al. Applications of electros spin resonance and spin trapping in tropical parasitic disease. *Mini Rev Med Chem*, 2006. **6**(2): 211-20.
- [17] Aguilera-Venegas, B. and H. Speisky. Identification of the transition state for fast reactions: the trapping of hydroxyl and methyl radicals by DMPO-A DFT approach. *J Mol Graph Model*, 2014. **52**: 57-70.
- [18] Díaz-Urrutia, C.A., et al. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012. **95**: 9.670-8.
- [19] Rigol, C., et al. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2005. **61**(13-14): 2933-8.
- [20] Vieites, M., et al. Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *J Inorg Biochem*, 2008. **102**: 1033-43.

- [21] Aguirre, G., et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem*, 2004. **12**: 4885-4883.
- [22] Nicholson, R. S. Semiempirical procedure for measuring with stationary electrode polarography rates of chemical reactions involving the product of electron transfer. *Analytical Chemistry*, 1966. **38**: 1406-1406.
- [23] Aguilera-Venegas, B., et al. Electrochemical, ESR and theoretical insights into the free radical generation by 1,1'-hydrocarbylenebisindazoles and its evaluation as potential bio-active compound. *Future Med Chem*, 2012. **5**(15): 1843-1859.
- [24] Otero, L., et al. ESR, electrochemical and reactivity studies of antitrypanosomal palladium thiosemicarbazone complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2008. **70**: 519-23.
- [25] Rigol, C., et al. Theoretical study on 5-nitrofuryl thiosemicarbazone radicals electronic properties. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2006. **770**: 125-129.
- [26] Aravena, C.M., et al. Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011. **79**: 312-9.
- [27] Moreno, S.N., et al. Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Trichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Bio Chem*, 1984. **259**: 8252-9.
- [28] Finkelstein, E., et al. Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol*, 1979. **16**: 676-85.
- [29] Burkitt, M.J., et al. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH. Ascorbate. And dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Bio Chem*, 2003. **278**: 29410-9.

- [30] Nicholson, R.S. and I. Shain. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetics Systems. *Analytical Chemistry*, 1964. **36**(4): 706-723.
- [31] Santos, D., et al. Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones. *Eur J Inorg Chem*, 2012. **117**: 270-276.
- [32] Olea, C., et al. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochim Acta A* 2005. **63**: 36-42.
- [33] Cipriani, M., et al. Effect of the Metal Ion on the anti *T. cruzi* Activity and Mechanism of Action of 5-Nitrofuryl-Containing Thiosemicarbazone Metal Complexes. *Eur J Inorg Chem*, 2014. p. 4677-4689.
- [34] Demoro, B., et al. Potential Mechanism of the Anti-trypanosomal Activity of Organoruthenium Complexes with Bioactive Thiosemicarbazones. *Biol Trace Elem Res*, 2013. **153**: 371–381.
- [35] Folch-Cano, C., et al. 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*, 2010. **75**: 375–380.
- [36] Rodríguez, J., et al. Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *Eur J Med Chem*, 2009. **44**: 1545–1553.
- [37] Vietes, M., et al. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem*, 2009. **103**: 411–418.

[38] Otero, L., et al. Novel Antitrypanosomal Agents Based on Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone Complexes: DNA and Redox Metabolism as Potential Therapeutic Targets. *J Med Chem*, 2006. **49**: 3322-3331.

[39] Merlino, Al., et al. In search of patterns over physicochemical properties and pharmacological activities for a set of $[MCl_2(\text{thiosemicarbazone})]$ complexes (M 1/4 Pt/Pd): Support for multiple mechanisms of antichagasic action excluding DNA-bonding in vivo? *Eur J Med Chem*, 2011. **46**: 2639-2651.

[40] Pearson, Ralph G. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc*, 1963. **85**(22): 3533-3539.

[41] Haynes, W.M. Polarizabilities of Atoms and Ions in Solids. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2011. **91**: 12-13.