

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LA SERIE 3-
ARIL CUMARINAS Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON β -
CICLODEXTRINA EN COMBINACIÓN CON BENZNIDAZOL***

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

Josué Santiago Pozo Martínez

Directores de Tesis: Dr. Claudio Olea Azar

Dra. Ulrike Kemmerling

Santiago-CHILE

Abril/2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Josué Santiago Pozo Martínez

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

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Co-director de Tesis:

Dra. Ulrike Kemmerling

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Cecilia Rojas

Dr. Juan Diego Maya

Dr. Carlos Areche

Dr. Miguel Reyes

*“ No satisface el saber mucho,
sino el sentir y gustar internamente
de las cosas ”*
San Ignacio de Loyola

Se agradece en forma especial a las siguientes Instituciones por los aportes financieros recibidos para el desarrollo y término de esta Tesis:

- Universidad de Chile específicamente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por la Beca de Internacionalización (Programa de Doctorados, 2018 – 2019) y la Beca Facultad (2020-2021).
- Proyectos FONDECYT: 1190340 Dr. Claudio Olea Azar y 1190341 Dra. Ulrike Kemmerling.
- Proyecto ERANet17/HLH-0142 Dra. Ulrike Kemmerling.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme realizar y culminar este proceso de formación doctoral. A mi familia, que siempre supo apoyarme con su cariño y sabiduría en esta etapa de formación profesional.

A mi padre y madre, por ser el pedestal en que me he apoyado para seguir adelante, por su entrega y perseverancia que ha permitido culminar con éxito esta etapa de la vida. A mi hermana, quien con su cariño y apoyo fue un motivo más, para seguir siempre adelante. En fin, un gracias a los tres porque a pesar de la distancia (Ecuador – Chile) nunca dejaron de estar pendientes de mí.

A mis tutores profe Dr. Claudio Olea y Dra. Ulrike Kemmerling, quiero agradecerles por aceptar ser directores de tesis, aportando con su conocimiento, experiencia, dedicación y confianza entregada en el desarrollo de esta tesis. Asimismo, quiero agradecerles porque más allá de ser tutores son grandes amigos quienes supieron darme consejos de vida para poder ser mejor persona. No cabe duda, que más allá de ser científicos y académicos son grandes personas.

Al profe Claudio Olea quiero extenderle un agradecimiento especial, porque a pesar de mis falencias al inicio del doctorado, creyó en mí. A su vez, le agradezco por estar siempre pendiente de mi bienestar y mi formación como investigador y como persona. Profe, gracias por su amistad pura y sincera, para mí es un ejemplo a seguir.

Al pekeñin Mauri, quien llegó a ser más que mi amigo, mi hermano, quiero agradecerle por todo su apoyo entregado durante esta etapa con sus consejos científicos, humanos y sobre todo por siempre extenderme la mano sin esperar nada a cambio, hermanito de verdad muchas gracias por como has sido conmigo y que esta amistad que se ha forjado por casi 5 años no se queda aquí seguirá para siempre.

A Anita, quiero extenderle mis agradecimientos por siempre estar aguantándome en la sala de cultivo con los cálculos matemáticos, para la realización de los experimentos. No cabe duda de que fueron momentos maravillosos llenos de risas, enojos y estrés, pero sobre todo siempre perduró la amistad. Muchas gracias, Anita seguiremos tomando cafecito.

A la comisión evaluadora por su disposición y sus críticas constructivas, comentarios y sugerencias con el fin de enriquecer este trabajo y que llegue a su final.

A la profesora Dra. Ma. Carolina Zúñiga, por sus consejos y opiniones en el desarrollo de la tesis. A los chicos del laboratorio de radicales libres y antioxidantes: Pancho Salgado, Gaby, Michel, Antonio, con quienes compartimos momentos de risas, conversaciones, almuerzos en modo pandemia y sobre todo con quienes se generó un vínculo de amistad. También quiero agradecer a los compañeros del laboratorio de mecanismos de infección parasitaria: Lis, Jesús, Christian con quienes pase gratos momentos tomando café, instalando destiladores (Jesús), haciendo trabajos de construcción (Christian). En fin, momentos que supieron sacarme de todo el estrés que conllevaba la realización de experimentos. Chicos no queda más que decirles muchas gracias por aceptar a este personaje extranjero.

Por último y muy importante, mi agradecimiento imperecedero a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por otorgarme el financiamiento total durante el periodo de la realización de este trabajo. Sin su apoyo no hubiese sido posible todo esto que hoy estoy culminando.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- **J. Pozo-Martínez**, F. Salgado, A. Liempi, U. Kemmerling, R. Mera-Adasme, C. Olea-Azar*, M. Moncada-Basualto, F. Borges, E. Uriarte, M. Joao Matos*. Synthesis and study of the trypanocidal activity of catechol-containing 3-arylcoumarins, inclusion in β -cyclodextrin complexes and combination with benzimidazole. *Arabian Journal of Chemistry*, 2022, 15(3), p. 103641.

CONTRIBUCIONES EN OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DOCTORAL

- F. Pilaquinga*, D. Amaguaña, J. Morey, M. Moncada-Basualto, **J. Pozo-Martínez**, C. Olea-Azar, L. Fernández, P. Espinoza-Montero, E. Jara-Navarrete, L. Meneses, F. López, A. Debut, N. Piña. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of *Mimosa albida* (Mimosoideae): Characterization and Antioxidant Activity. *Materials*, 2020, 13(3), p. 503.
- F. Pilaquinga*, C. Granja, E. Jara-Navarrete, M. Moncada-Basualto, **J. Pozo-Martínez**, L. Fernández, P. Espinoza-Montero, F. López, A. Debut, C. Olea-Azar. Total Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Silver Nanoparticles using Aqueous Extract of *Chilca Leaves* (*Baccharis latifolia*). *Americal Journal of Applied Sciences*, 2021, 18(1), p. 79-91.
- F. Salgado, M. Moncada-Basualto, **J. Pozo-Martínez**, A. Liempi, U. Kemmerling, J. Maya, P. Jaque, F. Borges, E. Uriarte, M. Matos*, C. Olea-Azar*. Chemical and biological analysis of 4-acyloxy-3-nitrocoumarins as trypanocidal agents. *Arabian Journal of Chemistry*, 2021, 14(3), p. 102975.
- D. Soto-Madrid, M. Gutiérrez-Cutiño, **J. Pozo-Martínez**, M. Zúñiga-López, C. Olea-Azar, S. Matiacevich*. Dependence of the Ripeness Stage on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Walnut (*Juglans regia L.*) Green Husk Extracts from Industrial By-Products. *Materials*, 2021, 26(10), p. 2878.
- F. Pilaquinga*, J. Morey, L. Fernández, P. Espinoza-Montero, M. Moncada-Basualto, **J. Pozo-Martínez**, C. Olea-Azar, R. Bosch, L. Meneses, A. Debut, M. Piña. Determination

of Antioxidant Activity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-FL), Cellular Antioxidant Activity (CAA), Electrochemical and Microbiological Analyses of Silver Nanoparticles Using the Aqueous Leaf Extract of *Solanum mammosum L.* International Journal of Nanomedicine, 2021, 26(16), p. 5879-5894.

- A. Giordano, P. Morales-Tapia, M. Moncada-Basualto, **J. Pozo-Martínez**, C. Olea-Azar, A. Nestic, G. Cabrera-Barjas*. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity (ORAC, EPR and Cellular) of Different Extracts of *Argylia radiata* Vitroplants and Natural Roots. Molecules, 2022, 27(3), p. 610.

ÍNDICE

RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Enfermedad de Chagas y su tratamiento.....	1
1.2.- Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	3
1.3.- Cumarinas con actividad tripanocida.....	4
1.4.- Combinación de fármacos tripanocidas convencionales y compuestos bioactivos....	8
1.5.- Formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas.....	10
2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	13
2.1.- Hipótesis.....	13
2.2.- Objetivo general.....	13
2.2.1.- Objetivos específicos.....	13
3.- METODOLOGÍA.....	15
3.1.- Materiales y equipos.....	15
3.2.- Cultivo celular y obtención de las formas infectivas de <i>T. cruzi</i>	16
3.3.- Determinación de la viabilidad celular en tripomastigote y células de mamífero.....	16
3.4.- Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC-FL).....	18
3.5.- Cálculos teóricos de los Índices de Fukui Radicalario (f_k^0).....	18
3.6.- Formación de complejos de inclusión.....	19
3.7.- Determinación de la constante de asociación (K_c) de los complejos de inclusión y porcentaje de compuesto incluido.....	19
3.8.- Determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión.....	20
3.9.- Determinación de la geometría de inclusión de los complejos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Modelamiento Molecular.....	21
3.10.- Determinación de la permeabilidad paralela en membrana artificial (PAMPA).....	21
3.11. Efecto tripanocida intracelular sobre <i>T. cruzi</i>	22
3.12.- Determinación de la carga de ADN parasitario mediante PCR en tiempo real.....	23
3.13.- Determinación de la generación de especies radicalarias en medio parasitario mediante Resonancia de Espín Electrónico (REE).....	23

3.14.- Determinación de la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	24
3.15.- Análisis estadístico.....	24
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1.- Evaluación de la capacidad antioxidante de la serie 3-aril cumarinas mediante la metodología ORAC fluorescencia (ORAC-FL).....	25
4.2.- Determinación del porcentaje del efecto tripanocida de la serie 3-aril cumarinas.....	29
4.3.- Determinación de la difusión pasiva de la serie 3-aril cumarinas mediante la permeabilidad paralela en membrana artificial (PAMPA).....	32
4.4.- Determinación de la generación de especies radicalarias en medio parasitario por Resonancia de Espín Electrónico (REE).....	37
4.5.- Formación de los complejos de inclusión con β -CDs y la determinación de la geometría de inclusión.....	39
4.6.- Determinación de PAMPA en los complejos de inclusión.....	49
4.7.- Determinación de la actividad tripanocida sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad en células mamíferas VERO® de los complejos de inclusión.....	50
4.8.- Determinación de la actividad tripanocida del compuesto 8 combinado con Benznidazol.....	52
4.9.- Determinación de la actividad tripanocida sobre la forma intracelular (amastigote) de <i>T. cruzi</i> del compuesto 8, complejo de inclusión en β -CDs y la combinación con BZN.....	56
4.10.- Determinación del efecto tripanocida posterior a las 96 hrs de tratamiento con los compuestos 8, BZN, complejo de inclusión en ciclodextrina y combinaciones.....	60
4.11.- Discusión general.....	65
5.- CONCLUSIONES.....	67
6.- ANEXO.....	68
6.1.- Análisis de docking molecular de la nueva serie de cumarinas.....	68
6.1.1.- Acoplamiento molecular e identificación de las principales interacciones de la serie 3-aril cumarinas sustituidas con AK de <i>T. cruzi</i>	70
6.1.2.- Acoplamiento molecular e identificación de las interacciones con la gGAPDH <i>T. cruzi</i>	75
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.- Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxígeno.....	18
Ecuación 2.- Índices de Fukui Radicalarios (f_k^0).....	19
Ecuación 3.- Ecuación de Connors.....	20
Ecuación 4.- Cálculo del porcentaje de cumarina no incluida.....	20
Ecuación 5.- Cálculo del porcentaje de cumarina incluida.....	20
Ecuación 6.- Cálculo de la estequiometría de los complejos de inclusión.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Actividad tripanocida e índice de selectividad de derivados de 3-amido cumarinas.....	7
Tabla 2.- Citotoxicidad <i>in vitro</i> en macrófagos RAW 264.7 murinos (IC ₅₀) y actividad tripanocida en epimastigote.....	8
Tabla 3.- Índice ORAC-FL de la serie 3-aril cumarina.....	26
Tabla 4.- Índice de Fukui radicalario (f_k^0) de la serie 3-aril cumarinas.....	27
Tabla 5.- Porcentaje del efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad en células de mamífero VERO® de la serie 3-aril cumarinas a 100 µM.....	31
Tabla 6.- Determinación de la difusión pasiva de la serie 3-aril cumarinas.....	33
Tabla 7.- Valores de IC ₅₀ sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y células de mamífero VERO®...	35
Tabla 8.- Determinación de las constantes de asociación de la serie 3-aril cumarinas en β-CDs.....	40
Tabla 9.- Determinación de las constantes de asociación de la serie 3-aril cumarinas en HP-β-CDs.....	41
Tabla 10.- Desplazamientos químicos de BZN y compuesto 8 libre y en complejo de inclusión con β-CDs.....	46
Tabla 11.- Determinación de la permeabilidad paralela en membrana artificial de los compuestos de inclusión comparados con los compuestos libres.....	49
Tabla 12.- Porcentaje de actividad tripanocida de los complejos de inclusión de 6 y 8 en β-CDs sobre la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	51
Tabla 13.- Porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® de la combinación del compuesto 8 y BZN.....	54
Tabla 14.- Porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® de la combinación del complejo de inclusión del compuesto 8 en β-CDs y BZN.....	55
Tabla 15.- Determinación del efecto tripanocida y citotóxico del compuesto 8, BZN, complejo de inclusión y combinación con BZN sobre la forma intracelular amastigote de <i>T. cruzi</i>	58
Tabla 16.- Determinación de la actividad tripanocida posterior a las 96 hrs de tratamiento...	60

Tabla 17.- Energías de unión de los compuestos con las enzimas AK y gGAPDH.....	69
Tabla 18.- Interacciones de la serie de cumarinas sustituidas con los residuos de aminoácidos principales de la AK.....	71
Tabla 19.- Análisis de los compuestos 8 y 6.....	72
Tabla 20.- Análisis de las distancias de interacción de los compuestos con la enzima AK....	74
Tabla 21.- Compuestos derivados de cumarina con las mejores interacciones con la AK.....	75
Tabla 22.- Interacciones de la serie de cumarinas sustituidas con los residuos de aminoácidos principales de la gGAPDH.....	76
Tabla 23.- Análisis de los compuestos 1 y 6.....	78
Tabla 24.- Compuestos que cumplieron con el primer filtro.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo biológico de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2.- Estructura de A) Nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno) amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dioxido) y B) Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida)..	3
Figura 3.- Estructura de la cumarina.....	5
Figura 4.- Derivados sintetizados de 3-amido cumarinas con actividad tripanocida.....	6
Figura 5.- Estructura general de la serie hidroxí-3-arilcumarinas.....	7
Figura 6.- Estructura y representación 3D de las α -, β -, γ -CDs.....	10
Figura 7.- Serie 3-aril cumarinas en estudio.....	12
Figura 8.- A) Perfil cinético ORAC-FL del compuesto 5 y B) Área bajo la curva (ABC) en función de la concentración del compuesto 3.....	25
Figura 9.- Porcentaje del efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> (Dm28) a concentración de 100 μ M de la serie 3-aril cumarinas y benznidazol.....	29
Figura 10.- Porcentaje de citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® a concentración de 100 μ M de la serie 3-aril cumarinas y nifurtimox.....	30
Figura 11.- Tendencia entre la capacidad antioxidante y el porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	32
Figura 12.- Tendencia entre el porcentaje de efecto tripanocida y compuesto retenido en la membrana artificial.....	34
Figura 13.- Estudio estructura – actividad de los compuestos más activos de la serie 3-aril cumarinas.....	36
Figura 14.- Espectros REE de los aductos de espín generados sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> a temperatura ambiente. A) Espectro registrado de control sin compuesto, B) Espectro registrado al Nfx incubado con tripomastigote, C) Espectro registrado al compuesto 2 incubado con tripomastigote, D) Espectro registrado al compuesto 6 incubado con tripomastigote y E) Espectro registrado al compuesto 8 incubado con tripomastigote.....	38
Figura 15.- Esquema de generación de especies radicalarias sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> , generación de metabolitos y su interacción con el atrapador de espín DMPO.....	38
Figura 16.- A) Espectro de fluorescencia del compuesto 8 con distintas concentraciones de β -CDs a 25 °C y B) Representación gráfica de la ecuación de Benesi – Hildebrand para el complejo de inclusión del compuesto 8 con β -CDs a 25 °C.....	39

Figura 17.- Comparación entre los espectros de RMN ¹ H del benznidazol, β-ciclodextrina, compuesto 8 y complejos de inclusión formados. A) Espectro RMN ¹ H del BZN 400 MHz, B) Espectro RMN ¹ H de β-ciclodextrina 400 MHz, C) Espectro de RMN ¹ H del BZN-β-CDs 400 MHz, D) Espectro de RMN ¹ H compuesto 8 400 MHz y E) Espectro RMN ¹ H compuesto 8-β-CDs 400 MHz.....	43
Figura 18.- Espectro bidimensional COSY ¹ H- ¹ H de la β-ciclodextrina (400 MHz).....	44
Figura 19.- Geometría de los complejos de inclusión de los compuestos en β-CDs mediante modelamiento molecular. A) complejo de inclusión de 8-β-CDs, B) complejo de inclusión de 2-β-CDs y C) complejo de inclusión de 6-β-CDs.....	48
Figura 20.- A) Matriz de combinación de los datos reales obtenidos para BZN y compuesto 8 utilizando el modelo independiente de Bliss y B) Mapa de calor de sinergia que muestra la sinergia para cada combinación.....	53
Figura 21.- Efecto tripanocida intracelular sobre la forma amastigote de <i>T. cruzi</i> . Las células vero se expusieron a una proporción de 1:3 durante 24 hrs, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y las células se expusieron a los compuestos a concentración IC ₅₀ , y la concentración de la mejor combinación, durante 24 hrs. Cada imagen es representativa de A) células Vero infectadas (control), B) BZN, C) compuesto 8, D) 8-β-CDs, E) 8-BZN y F) 8-β-CDs-BZN.....	58
Figura 22.- Determinación de la concentración relativa de parásitos posterior a las 96 hrs de tratamiento con: BZN, compuesto 8, 8-β-CDs, 8-BZN y 8-β-CDs-BZN.....	61
Figura 23.- A) Espectros REE de los espín aductos generados a temperatura ambiente sobre la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i> . I) Espectro registrado del control, II) Espectro registrado para el compuesto 8, III) Espectro registrado para BZN, IV) Espectro registrado para 8-BZN, V) Espectro registrado del compuesto 8-β-CDs y VI) Espectro registrado para la combinación de 8-β-CDs-BZN. El patrón hiperfino del DMPOX está representado por (*). B) Determinación de la relación de áreas de los compuestos comparados con el blanco.....	62
Figura 24.- Porcentaje de incorporación de la sonda fluorescente TMRM por la variación del potencial de membrana mitocondrial sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	64

Figura 25.- Diseño de nuevas cumarinas con potencial actividad tripanocida, basados en los resultados obtenidos.....	65
Figura 26.- Análisis estructural de los compuestos A) 8 y B) 6.....	72
Figura 27.- Ángulo de torsión analizado en las estructuras de las cumarinas sustituidas.....	73
Figura 28.- Interacción con el sitio activo de la enzima AK: A) compuesto 8 y B) compuesto 6.....	73
Figura 29.- Análisis estructural de los compuestos A) 1 y B) 6.....	77
Figura 30.- Interacción con el sitio activo de la enzima gGAPDH A) 1 y B) 6.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Arginina Quinasa
ANOVA	Análisis de varianza
BZN	Benznidazol
CCCP	Carbonil-cianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMPOX	DMPO oxidado
EC	Enfermedad de Chagas
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
gGAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de <i>T. cruzi</i>
HP- β -CDs	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
Me- β -CDs	Metil- β -ciclodextrina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
NFX	Nifurtimox
ORAC-FL	Capacidad de atrapamiento de radicales centrados en oxígeno mediante fluorescencia
PBS	Buffer fosfato salino
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
REE	Resonancia de Espín Electrónico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPMI 1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TMRE	Éster metílico de tetrametilrodamina

Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
β -CDs	β -ciclodextrina
$\Delta\Psi_m$	Variación del potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* afectando aproximadamente a 18 millones de personas en todo el mundo, generando un problema importante de salud pública. Los fármacos utilizados para este tratamiento son nifurtimox (NFX) y benznidazol (BZN), siendo este último el fármaco de primera línea. Sin embargo, ambos presentan una eficacia limitada y efectos secundarios. Por lo que, el desarrollo de terapias y agentes tripanocidas nuevos es necesario. En este trabajo, se estudió la actividad tripanocida y citotoxicidad de una serie de 3-aril cumarinas con presencia de grupo catecol, un posible mecanismo de acción tripanocida mediante la Resonancia de Espín Electrónico (REE) y variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) del parásito. Asimismo, se evaluó el aumento de la actividad tripanocida de las cumarinas más activas por la formación de los complejos de inclusión con β -ciclodextrina (β -CDs). Además, se estudió la combinación de las cumarinas con BZN como estrategia nueva anti-*T. cruzi*.

Se determinó que toda la serie tiene actividad tripanocida moderada sobre la forma tripomastigote del parásito, siendo el compuesto 8 (3-(4'-bromofenil)-6,7-dihidroxicumarina) más activo ($IC_{50} = 34 \mu M$) y el más citotóxico en células VERO® ($IC_{50} = 162 \mu M$). Al formar el complejo de inclusión con la β -ciclodextrina aumentó la solubilidad, mientras que la actividad tripanocida y citotoxicidad disminuyeron. Se demostró que un posible mecanismo de acción del compuesto 8 es a través de la generación de estrés oxidativo. La combinación con BZN presentó un efecto sinérgico sobre la actividad tripanocida, reduciendo la dosis necesaria de BZN.

En conclusión, la presencia del grupo catecol en el andamio de la cumarina parece modular la actividad tripanocida, y la combinación de fármacos demostró ser una estrategia alternativa prometedora para el tratamiento de la enfermedad.

ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affecting approximately 18 million people worldwide, generating a significant public health problem. The drugs used for this treatment are nifurtimox (NFX) and benznidazole (BZN), the latter being the first-line drug. However, both have limited efficacy and cause severe side effects. Therefore, the development of new trypanocidal agents and therapies is necessary. In this work, the trypanocidal activity and cytotoxicity of a series of 3-aryl coumarins with the presence of a catechol group, a possible mechanism of trypanocidal action by Electron Spin Resonance (ESR), and variation of the parasite's mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were evaluated. Moreover, we formed inclusion complexes with β -cyclodextrin (β -CDs) of the most active coumarins and evaluated their trypanocidal activity. In addition, the combination of coumarins with BZN was studied as a new anti-*T.cruzi* strategy.

The entire series of 3-aryl coumarins have moderate trypanocidal activity on the trypomastigote form of the parasite, being compound 8 (3-(4'-bromophenyl)-6,7-dihydroxy coumarin) the most active ($IC_{50} = 34 \mu M$) and the most cytotoxic in VERO® cells ($IC_{50} = 162 \mu M$). The inclusion complex formation with β -cyclodextrin and compound 8 increases the solubility, but the trypanocidal activity and cytotoxicity were decreased. In addition, we determined that the generation of oxidative stress constitutes the possible mechanism of action of compound 8. The combination with BZN presented a synergistic effect on the trypanocidal activity, reducing the necessary dose of BZN.

In conclusion, the presence of the catechol group in the coumarin scaffold seems to modulate the trypanocidal activity; the combination with BZN proved to be a promising alternative strategy for the treatment of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas y su tratamiento

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (EC), es una infección parasitaria zoonótica, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La EC es endémica de América Latina¹. Fue descrita por primera vez en 1909, por el médico brasileño Carlos Chagas y es considerada una de las enfermedades tropicales más desatendidas del mundo². Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): “la enfermedad de Chagas es un indicador de pobreza y desventaja: afecta a poblaciones con baja visibilidad y poca voz política, causa estigma y discriminación, es relativamente descuidada por los investigadores, y tiene un considerable impacto en la morbilidad y mortalidad”^{3,4}. Se calcula que en todo el mundo hay entre 16 y 18 millones de personas infectadas, de las cuales cada año mueren 7.000. A pesar de que la EC es endémica de Latinoamérica, se ha reportado la presencia de esta enfermedad en otros lugares como Estados Unidos, Canadá, Japón y algunos países europeos, debido a la migración poblacional y formas de transmisión no vectorial^{5,6}.

La EC presenta dos formas clínicas: aguda y crónica. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la infección, se caracteriza por una elevada presencia de parásitos en la sangre del paciente. Sin embargo, aproximadamente el 95 % de los casos son asintomáticos. En los casos de los sintomáticos, las manifestaciones clínicas son: fiebre, dolores musculares y articulares, somnolencia, temblores, diarrea, edema, alteraciones respiratorias, cianosis y coma. Las muertes en la fase aguda de la enfermedad son causadas por miocarditis o meningoencefalitis con complicaciones concurrentes como bronconeumonía^{7,8}. Posteriormente, los casos de infección aguda tanto sintomática como asintomática pasan a la fase crónica, la que puede presentarse en cualquier grupo etario. Interesantemente, el 70 % de los infectados no muestran ninguna manifestación detectable de la enfermedad de Chagas^{9,10}. La fase crónica sintomática se desarrolla en aproximadamente un 20-30 % de los individuos, y se caracteriza por una baja parasitemia. Las principales manifestaciones clínicas son alteraciones en los órganos blanco como corazón, esófago, intestino, entre otros^{11,12}.

La principal forma de transmisión de *T. cruzi* es mediante insectos vectores del género triatomino siendo el más común *Triatoma infestas* o coloquialmente conocido como vinchuca. El ecosistema natural de los insectos vectores abarca desde el sur de Estados Unidos hasta la región central de Chile y Argentina. Adicionalmente existen otras formas de transmisión como la transfusión de sangre, trasplante de órgano, transmisión materno-fetal, vía oral por la ingesta de alimentos contaminados con el parásito, entre otros¹³.

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo (Figura 1) y presenta tres formas celulares básicas: tripomastigote (extracelular infectivo no replicativo) y amastigote (intracelular no infectivo replicativo) presente en el mamífero, así como una forma epimastigote (replicativo no infectivo) presente en el insecto vector. Cabe destacar, que los epimastigotes se pueden cultivar en medios axénicos mientras que los amastigotes crecen en células cultivadas de mamíferos, liberando tripomastigotes que se pueden cosechar para realizar ensayos *in vitro*¹⁴.

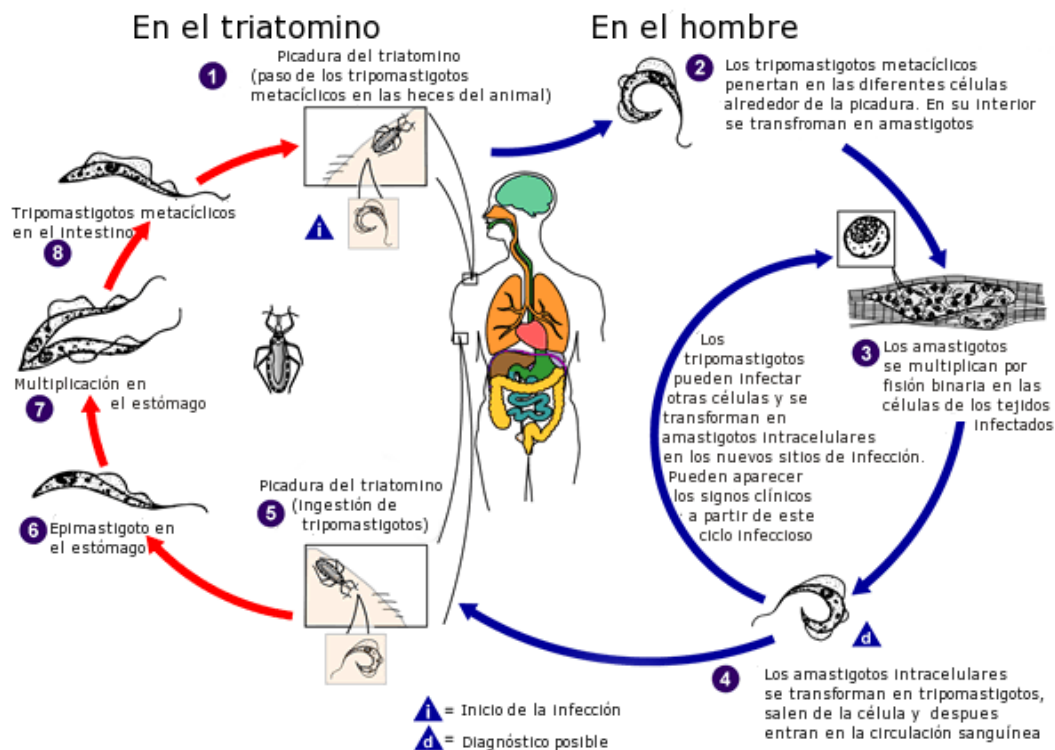


Figura 1. Ciclo biológico de vida del *Trypanosoma cruzi* (U.S. Department of Health & Human Services, 2015)

El ciclo de vida del parásito empieza cuando el insecto vector se alimenta de la sangre de un mamífero que se encuentra infectado con tripomastigotes sanguíneos circulantes, estos tripomastigotes se diferencian en el intestino medio del triatomino hacia la forma replicativa extracelular de epimastigote. En el intestino posterior se diferencia a la forma infectiva, no replicativa de tripomastigote metacíclico, que son depositados junto con las deyecciones del insecto en la piel o mucosa del hospedero mamífero. Los tripomastigotes metacíclicos penetran, por mecanismos aun no completamente dilucidados, al hospedero mamífero e infectan a células presentadores de antígenos como los macrófagos. En el citoplasma de las células del mamífero, los tripomastigotes se diferencian hacia amastigotes y como tales se dividen 3-5 veces para luego diferenciarse nuevamente a tripomastigotes. Los tripomastigotes lisan las células y entran al torrente sanguíneo y llegar a sus órganos blancos (particularmente miocardio y ganglios del sistema nervioso autónomo de tubo digestivo) donde pueden infectar a cualquier célula nucleada. Cuando otro insecto vector se alimenta de la sangre del mamífero se cierra el ciclo^{2,15,16}.

1.2. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Para el tratamiento de la enfermedad se utilizan dos fármacos desarrollados hace más de 40 años: benznidazol (BZN) y nifurtimox (NFX) (Figura 2), que son más efectivos en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, ambos fármacos presentan efectos secundarios adversos severos como: anorexia, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, depresión de la médula ósea, hipersensibilidad, entre otras^{8,17,18}.

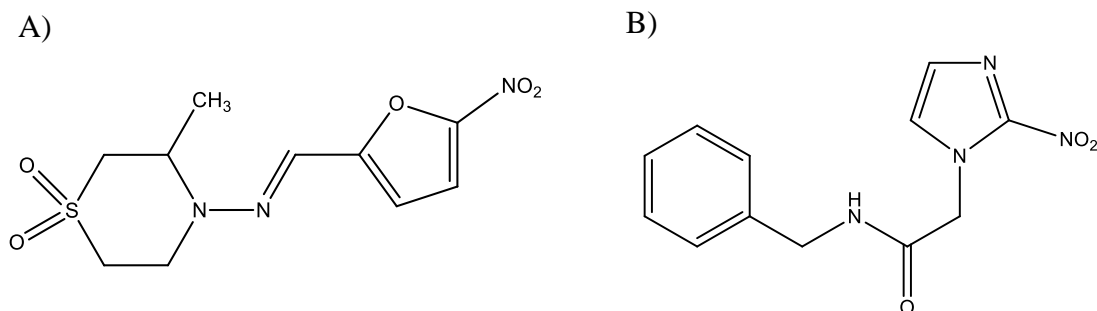


Figura 2. Estructura de A) Nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno) amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dióxido) y B) Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida)

Dada su baja efectividad y su uso limitado, se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas con el objeto de encontrar compuestos más eficaces y mejor tolerados. Las estrategias de búsqueda de nuevos blancos terapéuticos farmacológicos se han centrado en moléculas con las siguientes características: esenciales para la supervivencia del parásito y ausentes o son estructuralmente diferentes de los que están en el huésped del mamífero¹⁹. Así, se han investigado varios blancos terapéuticos extraídos del análisis del genoma de *T. cruzi*; entre estos se incluyen moléculas involucradas en la biosíntesis de poliisoprenoides, poliamina y ergosterol; varias proteasas (cruzipaína) y metabolismos redox dependientes del tiol (tripanotion sinteasa), entre otros²⁰⁻²⁵.

En este contexto nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de compuestos con actividad antiparasitaria utilizando estructuras moleculares similares a las usadas clínicamente, dentro de las cuales se destacan: triazoles, piridinas, complejos metálicos, nitroindazoles y cumarinas. Particularmente, se ha descrito que las cumarinas y sus derivados presentan actividad antiparasitaria²⁶⁻³⁰.

1.3. Cumarinas con actividad tripanocida

Las cumarinas o benzo- α -pironas pertenecen a los compuestos fenólicos, constituyen una familia de lactonas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y que poseen múltiples propiedades medicinales³¹. Su estructura base está conformada por un anillo de benceno fusionado a un anillo pirona con un grupo carbonilo en la posición 2 (Figura 3). Estos compuestos son reconocidos por su eficaz protección antioxidante en medios biológicos³². Además, presentan otros múltiples usos terapéuticos por sus actividades que incluyen: i) antiinflamatorios, ii) quimioterapéuticos, iii) neuroprotectores y iv) antibióticos. Asimismo, se utilizan para el etiquetado de proteínas unidas al ADN y como compuestos fotoactivos³³.

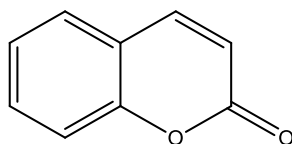


Figura 3. Estructura de la cumarina

Por otra parte, las cumarinas destacan por sus propiedades fluorescentes, y que son altamente sensibles cambios de polaridad y viscosidad del entorno, lo que ha permitido su aplicación como sonda fluorescente en una amplia gama de sistemas, incluyendo mezclas de solventes y materiales heterogéneos³⁴.

La similitud estructural entre las cumarinas y los flavonoides explicarían las diferentes actividades que presentan los derivados de cumarinas y que incluyen diferentes mecanismos moleculares. La naturaleza y posición de los grupos funcionales en la estructura básica de la cumarina tienen una gran influencia en las distintas propiedades farmacológicas. Es por ello, que varios estudios han evidenciado que la variación de la posición del sustituyente podría influir en las diferentes propiedades de los derivados de cumarina, incluidas las capacidades antioxidante y actividad antiparasitaria³⁵⁻³⁸.

Por otra parte, durante el curso de la infección y el desarrollo de la EC, se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) como consecuencia de la destrucción de los tejidos causada por acción del parásito, ya sea por acción directa o por reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente³⁹⁻⁴¹. Por lo que, el uso de cumarinas con actividad antioxidante podría ser una estrategia interesante para la eliminación de estas EROs nocivas. En relación con lo anterior, estudios realizados con resveratrol determinaron que a diferencia de BZN, no solo redujo la producción de EROs y la carga parasitaria en el corazón, sino que también aumentó la frecuencia cardiaca, revirtiendo la arritmia sinusal⁴². Por lo que, los polifenoles con actividad antioxidante serían capaces de disminuir la producción de EROs y contribuir así al tratamiento de la EC. Concordantemente con estos resultados, Figueroa, *et al*³⁹, sintetizaron una serie de 3-amino/carbamato cumarinas y determinaron que el compuesto 4-hidroxi-3-amino cumarina presentó la mejor actividad tripanocida sobre la forma epimastigote ($65,7 \pm 3,5$ %) y tripomastigote ($22,2 \pm 2,1$ %) de *T. cruzi*. Asimismo, indicaron que este compuesto

tuvo la mejor actividad antioxidante representada en el índice ORAC-FI ($4,36 \pm 0,12$), ya que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4 y amino en posición 3 aumenta tanto la actividad antioxidante como la tripanocida. Por ende, se concluyó que existe una relación entre la actividad tripanocida con la capacidad antioxidante, a mayor actividad tripanocida mayor capacidad antioxidante.

Con los resultados anteriores, se sintetizó una serie de 3-amido cumarinas con o sin grupo hidroxilo en posición 4 (Figura 4), encontrando que los compuestos no hidroxilados fueron más activos sobre la forma infectiva de *T. cruzi* (Tabla 1). Asimismo, se describió la actividad antioxidante celular, sin encontrar relación entre ambas actividades²¹. Con lo que, se postula que las propiedades antioxidantes de este tipo de cumarinas podrían ser útil en la reversión de los daños a órganos blanco en la fase crónica de la EC, en combinación con compuestos más potentes y potencialmente tóxicos por si solos.

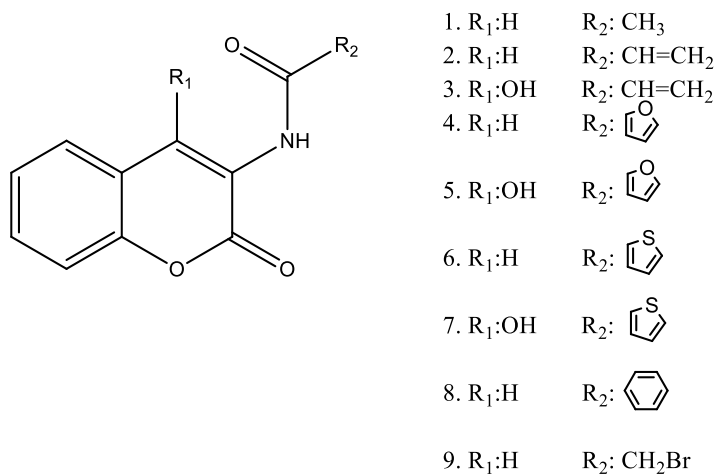


Figura 4. Derivados sintetizados de 3-amido cumarinas con actividad tripanocida

Tabla 1. Actividad tripanocida e índice de selectividad de derivados de 3-amido cumarinas

ACS	IC ₅₀ (RAW 264.7) μM	IC ₅₀		IS*	
		Epimastigote (Dm28c)	Tripomastigote (Dm28c)	Epimastigote (Dm 28c)	Tripomastigote (Dm28c)
2	80,12 ± 1,18	53,21 ± 1,45	21,53 ± 1,21	1,51	3,72
3	>100	64,58 ± 1,42	36,41 ± 2,11	> 1,55	> 2,75
6	>100	65,26 ± 2,15	52,12 ± 1,71	> 1,53	> 1,92
7	83,40 ± 2,26	>100	56,92 ± 1,53	> 0,83	1,47
NFX	>100	10,04 ± 1,18	22,56 ± 1,03	> 9,61	> 4,43

*índice de selectividad: $\frac{IC_{50} \text{ células RAW 264.7}}{IC_{50} \text{ epimastigote}}$

Estudios respecto a la relación estructura – actividad de cumarinas aisladas del extracto de hojas de *Calophyllum brasiliense* en cuanto al efecto anti-leishmania, indican que la presencia de un grupo fenólico en la estructura de la cumarina es importante tanto para la actividad como la selectividad del compuesto sobre⁴³.

En base a lo anterior, Robledo, *et al*⁴⁴, sintetizaron una serie de hidroxí-3-arilcumarinas (Figura 3) evaluando la actividad anti-*T. cruzi* sobre la forma epimastigote (no-infectiva), encontrando que la mitad de los derivados presentaban una baja citotoxicidad en macrófagos RAW 264.7 (Tabla 2). Así, la presencia del grupo catecol en la posición 7 y 8 cumarina mejoró la actividad tripanocida.

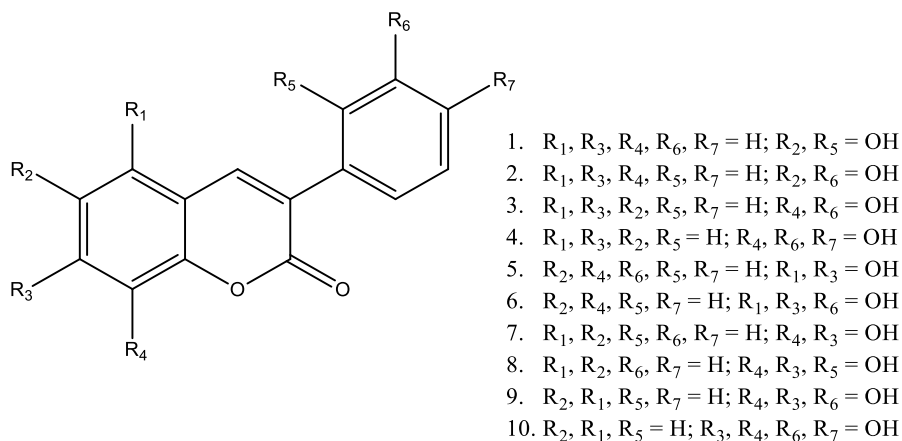
**Figura 5.** Estructura general de la serie hidroxí-3-arilcumarinas

Tabla 2. Citotoxicidad *in vitro* en macrófagos RAW 264.7 murinos (IC₅₀) y actividad tripanocida en epimastigote

Compuesto	IC ₅₀ μM		IS
	RAW 264.7	Epimastigote (Dm28c)	
1	>100**	>100**	-
2	>100**	>100**	-
3	>100**	>100**	-
4	115,30 ± 0,99	84,28 ± 7,38	1,37
5	>100**	6,15 ± 5,01	>16,26
6	>100**	>100**	-
7	26,10 ± 4,19	8,90 ± 5,25	2,93
8	68,85 ± 0,65	1,31 ± 2,03	52,56
9	397,60 ± 29,56	28,55 ± 5,07	13,93
10	97,48 ± 7,95	46,99 ± 3,41	2,07
NFX	263,44	17,4 ± 1,3	15,14

** 100 μM fue la concentración más alta evaluada. A concentraciones más elevadas, los compuestos precipitan

Pese a la aplicación potencial de las cumarinas con actividad tripanocida, ninguno de estos compuestos alcanzó análisis preclínico. Además, hoy en día, la industria farmacéutica ha restado el interés a la generación de nuevos fármacos para el tratamiento de la EC, por lo que se han planteado otras en la búsqueda de tratamientos nuevos para enfermedades causadas por parásitos protozoarios, siendo la combinación de fármacos tradicionales con compuestos bioactivos nuevos para potenciar la actividad terapéutica y reducir los efectos adversos de los fármacos convencionales^{45,46}.

1.4. Combinación de fármacos tripanocidas convencionales y compuestos bioactivos

La combinación de antioxidantes con BZN ha sido estudiada para el tratamiento de la fase aguda de la EC, ya que existe una alta proliferación de parásitos y respuesta inflamatoria que agrava la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs y ERNs)^{47,48}. Los fármacos convencionales (BZN y NFX) al ser compuestos nitroheterocícllos, aumentan el estrés nitrosativo y oxidativo. Este ambiente oxidativo, asociado a la multiplicación

intracelular de *T. cruzi*, conduce a la destrucción de los tejidos del hospedador, contribuyendo así a la etiopatogenia de la enfermedad. Además, el mecanismo tripanocida de BZN también implica: i) modificación covalente de macromoléculas mediante la formación de metabolitos citotóxicos como el glioxal; ii) aumento de la fagocitosis de *T. cruzi* por las células del hospedero con la siguiente producción de citosinas, y iii) inhibición de NADH-*fumarato* reductasa en el parásito⁴⁹⁻⁵¹, donde los primeros mecanismos son responsables de los efectos adversos en el hospedero. Así, la posibilidad de reducir la dosis de BZN en combinación con compuestos nuevos prometedores como los propuestos en este trabajo parece ser una estrategia atractiva en la búsqueda de tratamientos para pacientes crónicos. En este contexto, se han estudiado combinaciones de BZN con ácido ascórbico en modelos murinos *in vivo*, demostrando que la combinación de ambos compuestos reduce la parasitemia, las EROs y la peroxidación lipídica en el tejido cardíaco, de manera más efectiva que cada compuesto *per se*⁵². Asimismo, se ha observado un efecto antagónico de la pentamidina hacia el BZN al estar combinados, revirtiendo el efecto tóxico del BZN sobre células de mamífero⁴⁶. Además, el BZN y la *partenolida* tienen un efecto sinérgico contra el epimastigote de *T. cruzi*, reduciendo el IC₅₀ del BZN en 23 veces⁵³. Por tanto, el estudio de la combinación de 3-aril cumarinas que contienen catecol con BZN podría ser una doble estrategia para buscar terapias tripanocidas activas, con menos efectos secundarios.

Pese a lo anterior, muchos de los derivados cumarínicos no han podido superar la fase preclínica, debido a factores cruciales como: a) baja solubilidad en medio acuoso, b) alta citotoxicidad frente a células mamíferas y c) bajos índices de selectividad respecto a los fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de la enfermedad. Asimismo, los compuestos al ingresar al organismo pueden sufrir modificaciones por diversos factores como: cambios de pH, cambios de temperatura y degradación enzimática. Es por ello que, estudios realizados sugirieron la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CDs) como estrategia que permite aumentar la solubilidad y conservar las propiedades de los compuestos bioactivos en medios fisiológicos⁵⁴.

1.5. Formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos compuestos de unidades de glucopiranosas unidas mediante enlaces α -D-(1,4), pueden estar formadas por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades, dando lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico, y se representan como una estructura de cono truncado (Figura 6)⁵⁵. La β -CDs y sus derivados son los compuestos más utilizados para la formación de complejos de inclusión, debido al tamaño óptimo de su cavidad interna (7,8 Å).

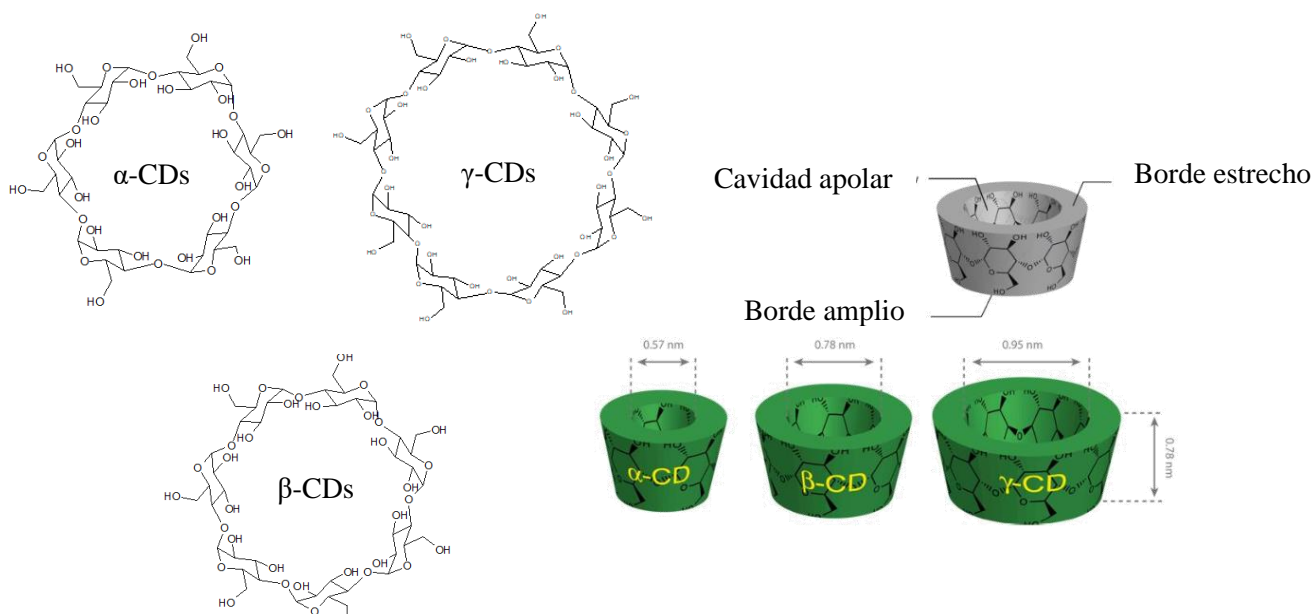


Figura 6. Estructura y representación 3D de las α -, β -, γ -CDs

La cavidad de la ciclodextrina es hidrofóbica, mientras que la cara externa es hidrofílica, ya que la conformación de cono truncado hace que los grupos hidroxilos queden orientados hacia el exterior de la cavidad, mientras que los hidroxilos secundarios se sitúan en el borde más amplio y los primarios en el borde más estrecho, otorgando de esta manera un carácter hidrofílico en la superficie. Mientras que en el interior de la cavidad es lipofílico, debido a la orientación del oxígeno del enlace glicosídico y grupos C-H^{56,57}.

Los complejos de inclusión se caracterizan por tener una estequiometría definida. Existen varios tipos de interacciones involucradas en la formación de complejos de inclusión y su contribución relativa depende del tipo de huésped. Dentro de estas interacciones tenemos:

hidrofóbicas, puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, electrostáticas, fuerza de Van der Waals, entre otras⁵⁸.

Al ser la cavidad interior de las CDs hidrófoba, permite que moléculas orgánicas más pequeñas puedan albergarse total o parcialmente en su interior, formando complejos de inclusión con estequiometría definida con las moléculas huésped. En consecuencia, moléculas insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles, sin que se produzca modificación química en la molécula huésped, ya que no hay la formación de ningún enlace covalente durante la interacción de la CDs y la molécula. De tal manera, se conserva las propiedades bioactivas de los compuestos en medios fisiológicos⁵⁹⁻⁶¹.

Las metodologías de evaluación de formación y caracterización de los complejos de inclusión son complejas, ya que la mayoría de las veces los resultados obtenidos tienen que ser combinados y examinados en conjunto ya que cada método evalúa una característica particular del complejo de inclusión. Los métodos se caracterizan generalmente por la detección de variaciones en las propiedades físicas o químicas del huésped como consecuencia de la formación del complejo. Entre las principales técnicas utilizadas tenemos: RMN (Resonancia Magnética Nuclear), fluorescencia, REE (Resonancia de Espín Electrónico), dicroísmo circular, voltamperometría, potenciometría, conductimetría, entre otras^{61,62}.

En base a lo anterior, Folch-Cano, *et al*⁶³ evaluó la capacidad antioxidante de la 3-fenil-4-hidroxi-7-metoxicumarina cuando forma el complejo de inclusión con β -CDs, hepta-2,6-di-O-metil- β -CDs (DM- β -CDs) e HP- β -CDs, determinando que las constantes de asociación para β -CDs e HP- β -CD fueron altas, lo que indica la inclusión del compuesto dentro de la cavidad de la ciclodextrina. Por otro lado, la DM- β -CDs presentó una constante de asociación mayor, atribuida a la ampliación de la región hidrófoba por la presencia de grupos metilo. A su vez, la capacidad de antioxidante del compuesto incluido fue levemente menor que el compuesto libre dado que el grupo hidroxilo de la cumarina se encuentra interactuando con la parte interna de la cavidad de la CDs causando un efecto protector del mismo.

Con lo que respecta a la actividad tripanocida, Leonardi, *et al*⁶⁴, estudiaron la formación de complejos de inclusión de BZN con Me- β -CDs, HP- β -CDs y β -CDs, indicando que el complejo de inclusión de BZN con CDs aumentó la solubilidad, así como también mejoró la biodisponibilidad con respecto a BZN libre. Moncada-Basualto, *et al*⁶⁵, determinaron que la formación de complejos de inclusión de la serie 3-amido cumarina no hidroxilada (Figura 4) con mono-6-amino-6-deoxi- β -CDs aumentaba la actividad tripanocida con respecto a las cumarinas libres, lo que podría estar relacionado a un aumento de la solubilidad de las cumarinas. Asimismo, observaron una variación del potencial de membrana mitocondrial del parásito de los complejos de inclusión, en comparación con los compuestos libres.

En base a lo anteriormente descrito, resulta estratégico el estudio de una serie de cumarinas con sustitución en la posición 3 de su esqueleto base de la cumarina. Toda la serie de compuestos presenta un sustituyente arilo en posición 3 y un grupo catecol en diferentes posiciones del andamio cumarínico. En donde, el grupo arilo debería incrementar la lipofilia de los compuestos, mientras que el grupo catecol modularía la actividad tripanocida, particularmente en combinación con BZN. Asimismo, el o los compuestos que presenten mayor actividad tripanocida serán incluidos en β -CD y se evaluará la citotoxicidad. Todos los compuestos fueron sintetizados por el grupo de Eugenio Uriarte de la Universidad de Santiago de Compostela-España (Figura 7).

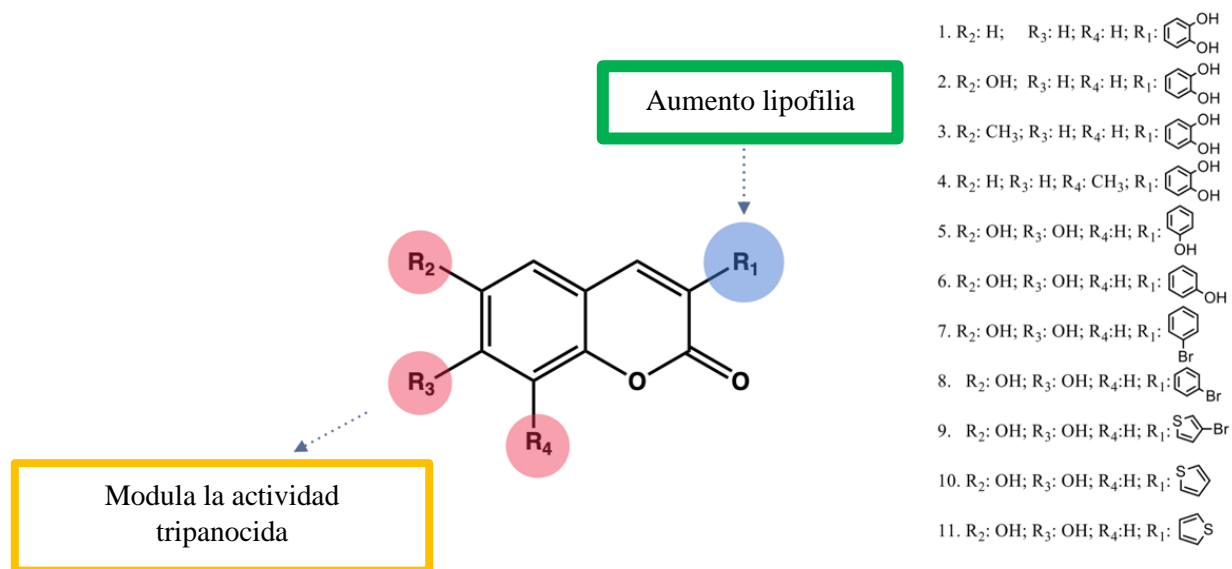


Figura 7. Serie 3-aryl cumarinas en estudio

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las 3-aril cumarinas poseen actividad tripanocida contra las formas infectivas de *T. cruzi* y potencian el efecto de Benznidazol. Asimismo, la formación de complejos de inclusión con β -ciclodextrina de las 3-aril cumarinas y la combinación con Benznidazol mejorará las propiedades biológicas de los compuestos en modelo *in vitro*.

2.2. Objetivo general

Evaluar la actividad tripanocida de la serie 3-aril cumarinas, sus complejos con β -ciclodextrina y la combinación de ambos con Benznidazol en modelo *in vitro*.

2.2.1. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto citotóxico de la serie 3-aril cumarinas sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* (cepa Dm28) y célula de mamífero (VERO®).
- Determinar la capacidad antioxidante de la serie 3-aril cumarinas mediante la técnica ORAC-FL e índices de Fukui radicalario de la serie 3-aril cumarinas.

En cuanto al o los compuesto(s) que presente(n) actividad tripanocida potencial y baja toxicidad tripanocida en células de mamífero de la serie 3-aril cumarinas, se procederá a:

- Determinar los parámetros y geometría de los complejos de inclusión con β -CD mediante espectroscopía de fluorescencia, RMN y modelamiento molecular. A su vez, estudiar la difusión pasiva del compuesto libre y en el complejo de inclusión mediante la técnica PAMPA.
- Estudiar la citotoxicidad sobre tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* (Dm28), células de mamífero (VERO®) y posibles mecanismos de acción tripanocida sobre la forma tripomastigote como: variación del potencial de membrana mitocondrial y generación de

especies radicalarias sobre tripomastigote del compuesto libre, en complejo de inclusión con β -CD y combinación con Benznidazol.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales y equipos

Las cumarinas utilizadas en este trabajo fueron sintetizadas y caracterizadas por el grupo del Dr. Eugenio Uriarte de la Universidad Santiago de Compostela, España.

Los reactivos dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP), bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), éster metílico de tetrametilrodamina (TMRE), nifurtimox (NFX), benznidazol (BZN), fluoresceína (Fl), 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), dimetil formamida (DMF), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), n-dodecano ($C_{12}H_{26}$), fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de sodio ($Na_2H_2PO_4$), dimetil sulfóxido ($(CH_3)_2SO$), β -ciclodextrina (β -CDs), 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes®), *kit* de purificación de ADN genómico Wizard (Promega®), se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Etanol (EtOH), agua ultrapura (H_2O), ácido clorhídrico fumante (HCl) se adquirieron en HES Ltda. (Santiago, Chile).

Los equipos utilizados para el desarrollo del trabajo experimental fueron: espectrofotómetro de placa BioTek modelo Synergy HT (Vermont, EUA), espectrofotómetro de placa PerkinElmer EnSpire (Shelton, CT, EUA), lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (ThermoFisher®), espectrómetro de resonancia magnética Bruker Advance 400 (Billerica, MA, USA), microscopio de epifluorescencia (Motic BA310®), cuantificador de ADN “ μ DropPlate DNA quantification system®” (Thermo Scientific®), espectrómetro ECS 106 de banda X (9.85 GHz) equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo (Bruker, Coventry, UK). Termociclador para PCR en tiempo real ABI Prism 7300 sequence detector (Applied Biosystems®), incubadora INC55 (Mettler®), gabinete de bioseguridad clase II (NuAire®).

Los cultivos celulares de *Trypanosoma cruzi* en la forma tripomastigote y amastigote, las células de mamífero tipo fibroblasto VERO®, se obtuvieron en el Programa de Biología Integrativa del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.

3.2. Cultivo celular y obtención de las formas infectivas de *T. cruzi*.

Células VERO® (fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) ATCC® CCL-81TM) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 250 mL con medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con NaHCO₃ (2 mg.mL⁻¹), estreptomicina (50 µg.mL⁻¹) y suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento, o al 5% para mantenimiento, 37 °C en un ambiente humedecido con CO₂ al 5%, reemplazando el medio cada 24 o 48 hrs⁶⁶. Para la obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*, células VERO® en semi-confluencia fueron infectadas con 1 mL de medio con tripomastigotes de la cepa Dm28c provenientes de un cultivo anterior. De esta forma, los tripomastigotes invadieron a las células VERO®, se diferenciaron intracelularmente a amastigotes, proliferaron y posteriormente (luego de 48-96 hrs) se diferenciaron nuevamente a tripomastigotes, que lisaron las células VERO® y fueron liberados al medio de cultivo. Este medio se recolectó y se centrifugó a 500 x g por 5 min para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 min a 37 °C de modo que los tripomastigotes asciendan hacia el sobrenadante. Este sobrenadante se recolectó y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min para obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Finalmente, los tripomastigotes fueron re-suspendidos en medio RPMI y contabilizados en una cámara de Neubauer⁶⁷.

3.3. Determinación de la viabilidad celular en tripomastigote y células de mamífero.

Tripomastigote: La acción tripanocida de compuestos sobre la viabilidad celular de tripomastigote fue evaluada mediante el ensayo de reducción de bromuro de tetrazolio MTT (SigmaAldrich®⁶⁸). 1x10⁶ tripomastigotes/mL fueron incubados en presencia y ausencia de concentración de 100 µM de la serie 3-aryl cumarinas, así como NFX y BZN a 50 µM (control con fármacos) en microplacas de 96 pocillos durante 24 hrs.

Alícuotas de 100 μL de suspensión de parásitos tratados con los compuestos de la serie 3-aril cumarinas fueron incubados con 10 μL de solución MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y fenazina (0,22 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 4 hrs. Luego, el precipitado de los cristales de formazán fueron solubilizados con 100 μL de una solución de SDS 10 % y HCl 0.01 N. la absorbancia del formazán se registró a 570 nm en un lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (ThermoFisher®). La viabilidad de los tripomastigotes se estimó como el porcentaje de absorbancia post tratamiento para cada extracto con relación a la absorbancia del control sin presencia de compuesto.

Los valores de IC_{50} se obtuvieron mediante el análisis de dosis – respuesta en el que se incubaron parásitos con diferentes concentraciones de BZN y 3-aril cumarina (20, 50, 80, 100, 200 μM).

Células de mamífero: Aquellos compuestos que presenten una actividad tripanocida inferior a 200 μM , fueron evaluados sobre las células de mamífero VERO® ara comprobar su acción citotóxica selectiva. En microplacas de 96 pocillos se sembró 50.000 células por pocillo e incubadas por 24 hrs. A continuación, se incubó en presencia y ausencia de las 3-aril cumarinas a la concentración de 100 μM , así mismo se incubó en presencia y ausencia de NFX y BZN (control con fármaco) durante 24 hrs a 37 °C. La viabilidad de células y la determinación del IC_{50} se realizó mediante el método MTT descrito anteriormente.

Para determinar el efecto sinérgico o antagónico del mejor compuesto de la serie 3-aril cumarinas y BZN sobre tripomastigotes y células de mamífero, 10^7 parásitos/mL ó 5×10^4 células VERO®/mL fueron tratados en ausencia y presencia del compuesto (5, 10, 20, 34, 50, 100, 200 μM) y en ausencia y presencia de BZN (5, 10, 20, 50, 100, 200 μM) durante 24 hrs. Se realizó un enfoque de matriz de dosis, los datos se analizaron utilizando el software libre Combenefit⁶⁹.

3.4. Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC-FL)

Los análisis ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de placas EnSpire multimodo de Perkin-Elmer utilizando placas de 96 pocillos de poliestireno blanco Nunc (Copenhague, Dinamarca). La fluorescencia se leyó desde la parte superior, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una emisión 528 nm. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4). Se adicionaron 150 μ L de solución de FL (40 nM, concentración final) y 25 μ L de la serie 3-aryl cumarinas (intervalo de concentraciones de 0,1 a 2,3 μ M) en cada pocillo de la placa. La mezcla se incubó durante 15 min a 37 °C, luego se añadió 25 μ L de una solución de dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis (2-metilpropionamida) (AAPH) (18 mM, concentración final). La fluorescencia se registró cada 1 min durante 180 min y se utilizó como control FL y AAPH usando solución tampón fosfato en lugar de la solución de las cumarinas en estudio^{37,70}.

Se preparó una curva de calibrado de Trolox (2,5 a 10 μ M) como antioxidante referencia. La capacidad antioxidante de inhibición se expresó como valores de ORAC-FL. Todas las mezclas de reacción se prepararon por triplicado y se realizaron al meos tres ensayos independientes para cada muestra. El área bajo la curva de decaimiento de fluorescencia (ABC) se calculó integrando la disminución de la fluorescencia. El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa Origin Pro 8.5 SR2 (Origin Lab Corporation, Washington, EUA). Los índices ORAC-FL se calcularon de acuerdo con la ecuación 1.

$$ORAC - FL = \frac{(ABC_{Cumarina} - ABC_{Control})}{(ABC_{Trolox} - ABC_{Control})} * \frac{[Trolox]}{[Cumarina]} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde: $ABC_{Cumarina}$ = área bajo la curva en presencia de la cumarina en estudio

$ABC_{Control}$ = área bajo la curva del control

$[Trolox]$ = concentración de trolox, $[Cumarina]$ = concentración de la cumarina en estudio

3.5. Cálculos teóricos de los Índices de Fukui Radicalarios (f_k^0)

Todos los cálculos relacionados con Fukui se realizaron con TURBOMOLE v7.5.0⁷¹. La optimización de las estructuras de los compuestos neutros se llevó a cabo en el nivel de densidad funcional B97-3c GGA⁷² que incluye el conjunto de bases triple-zeta def2-mTZVP

y la corrección de dispersión $D3^{73}$ con amortiguación Becke-Johnson⁷⁴. Se utilizó la aproximación RI⁷⁵ para acelerar los cálculos. Los descriptores se valoraron mediante la aproximación orbital condensada basada en cargas de análisis de población natural (NPA)⁷⁶. El radical Fukui es el promedio correspondiente a reacciones de ataque nucleofílico (f_k^-) y electrofílico (f_k^+) (ecuación 2)

$$f_k^0 = \frac{f_k^- + f_k^+}{2} \quad (\text{ecuación 2})$$

3.6. Formación de complejos de inclusión

Los complejos de inclusión de las 3-aryl cumarinas se obtuvieron mediante la adición de cantidades crecientes de β -ciclodextrina, manteniendo una concentración fija de cumarina, de acuerdo con lo descrito por Folch-Cano, *et al*⁶³.

Los complejos se prepararon mezclando una solución de las 3-aryl cumarinas en DMSO con una solución de β -ciclodextrina en tampón fosfato (pH 7.4), en una relación molar 1:3. La concentración de DMSO total en la mezcla no superó el 10 % en volumen. La mezcla se mantuvo a 37 °C en un baño termostático con agitación continua durante 24 hrs.

3.7. Determinación de la constante de asociación (K_c) de los complejos de inclusión y porcentaje de compuesto incluido

La determinación de la constante de asociación se realizó a través de mediciones de la intensidad de la fluorescencia de las 3-aryl cumarinas a 37 °C. Los espectros de emisión se registraron entre 300 y 550 nm a una longitud de onda de excitación fija comprendida entre 280 y 330 nm.

Los complejos de inclusión contenían 30 μ M de cumarina y concentraciones crecientes de β -CDs. La intensidad de la fluorescencia se relacionó con el aumento de la concentración de ciclodextrina en la formación de complejos de inclusión, a través de la ecuación de Connors (ecuación 3)⁷⁷.

$$F = F_o + \frac{(F_\infty - F_o)K_c[\beta CDs]_o}{1 + K_c[\beta CDs]_o} \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde F_∞ representa la fluorescencia de las moléculas incluidas en β -CDs y F_o la fluorescencia de los compuestos libres.

Para la determinación del porcentaje de compuesto incluido se utilizó la ecuación descrita por Lucas-Abellan (ecuación 4 y 5)⁷⁸.

$$[CUM_{no\ incluida}] = \frac{-([CDs]*Ki - [CUM]*Ki + 1) + \sqrt{([CDs]*Ki - [CUM]*Ki + 1)^2 + 4(Ki*[CUM])}}{2*Ki} \quad (\text{ecuación 4})$$

$$[CUM_{incluida}] = [CUM] - [CUM_{no\ incluida}] \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde $[CUM]$ representa la concentración inicial de la cumarina a incluir en β -CDs, $[CDs]$ concentración de la ciclodextrina, Ki es la constante de inclusión.

3.8. Determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión

La estequiometría de los complejos de inclusión se determinó por el método de variación continua de Job⁷⁹.

Se preparó complejos a 37 °C a razón molar (χ) entre 0,1 – 0,9; manteniendo la concentración constante (0,1 mM). Se determinó los máximos de absorbancia y se obtuvo las gráficas de ΔA vs [cumarina] en función a χ donde ΔA corresponde a la diferencia entre la absorbancia del complejo de inclusión y la absorbancia de la cumarina libre. La estequiometría del complejo está dada por la ecuación 6.

$$\eta = \frac{1}{1-\chi} \quad (\text{ecuación 6})$$

3.9. Determinación de la geometría de inclusión de los complejos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Modelamiento Molecular

La geometría de inclusión fue determinada mediante ^1H RMN y COSY (Espectroscopía Correlacionada) en un equipo Bruker Advance 400 (Billerica, MA, USA), equipado con una sonda inversa de banda ancha de 5 mm de diámetro de gradiente z, operada a una frecuencia de operación de 400,13 MHz (^1H). Las muestras se prepararon utilizando como disolvente DMSO deuterado para los compuestos libres y complejos de inclusión.

Las geometrías de inclusión se determinaron a nivel de química cuántica empleando el método semiempírico moderno GFN2-xTB⁸⁰ y un continuo dieléctrico para modelar la solvatación en agua. Se utilizó el programa xtb v6.3.3⁸¹ para todos los cálculos. Se optimizaron la estructura de la β -CDs, cada ligando y dos complejos por ligando (cada uno en una de las dos posibles orientaciones). A continuación, se realizó una simulación de dinámica molecular de 3ns Born-Oppenheimer en cada estructura optimizada. De los últimos 500 ps de cada simulación, se tomaron muestras instantáneas cada 0,1 ps. Cada fotograma se llevó a su mínimo más cercano mediante la optimización de la geometría, y las energías libres de Gibbs se obtuvieron a partir de cálculos de matriz de Hesse, excepto para aquellos con modos imaginarios después de la optimización.

3.10. Determinación de la permeabilidad paralela en membrana artificial (PAMPA)

Se determinó la difusión pasiva a través de membranas artificiales de la serie 3-aryl cumarinas mediante el ensayo de la permeabilidad paralela en membrana artificial (PAMPA)⁸².

La permeabilidad efectiva de los compuestos se midió a una concentración de 0,5 mM (solubilizados en 30 % DMSO: 70 % tampón fosfato). Este ensayo se llevó a cabo en una placa doble de 96 pocillos, donde la parte superior de la placa contenía las cumarinas en estudio. En la parte inferior se forma la membrana artificial tras la adición de 4 μL de una mezcla de fosfatidilcolina 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en n-dodecano hasta la completa volatilización del solvente. A continuación, la placa dadora se ajustó sobre la placa aceptora, asegurando que la parte inferior de la membrana estuviese en contacto con la solución tampón. La placa se

cubrió e incubó a 25 °C en ambiente húmedo durante 2 hrs bajo agitación constante⁸³. Terminado el tiempo de incubación se cuantificó el contenido de ambos compartimentos mediante medidas de absorbancia y sus concentraciones se determinaron usando el coeficiente de extinción molar de las serie 3-aril cumarinas. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

3.11. Efecto tripanocida intracelular sobre *T. cruzi*

Las células VERO® se separaron mediante tripsinización, se sedimentaron y se re-suspendieron en medio que contenía SFB al 10 %. Luego, se sembraron 5×10^4 células en placas de 24 pocillos durante 4 hrs, y luego se desafiaron con los parásitos en una proporción de células VERO: parásito de 1:3 durante 24 hrs, después de la infección, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) (NaCl [137 mM], KCl [2,7 mM], Na₂HPO₄ [10 mM] y KH₂PO₄ [1,8 mM]) pH 7.4 para eliminar los parásitos que no ingresaron a las células VERO®. Posteriormente, se agregó medio RPMI 1640 fresco y a las células fueron incubadas en presencia y ausencia de la cumarina más activa, complejo de inclusión y BZN a la concentración del IC₅₀, así como la combinación. A 24 hrs de post-incubación, se extrajo el medio de cultivo y las células fueron lavadas y fijadas con metanol 100 %. Se agregó el colorante nuclear DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes®) a una concentración de $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en buffer de tinción (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA) por 5 min, seguido de 3 lavados con PBS por 5 min para eliminar el exceso de DAPI. Los cubreobjetos fueron retirados y colocados sobre portaobjetos en presencia de una gota de medio de montaje acuoso para fluorescencia VECTASHIELD® para cada muestra. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia (Motic BA310®). Las imágenes fueron capturadas con la cámara acoplada al microscopio (Moticam 5®). La captura de imágenes fue realizada al azar en cada condición experimental. Los parásitos fueron reconocidos por su diferencia de tamaño, morfología nuclear, presencia de núcleo y kinetoplasto⁸⁴. Para contabilizar el número de células infectadas, así como la cantidad de parásitos intracelulares se utilizó el software MATLAB®⁸⁵. Se analizaron al menos 300 células por condición.

3.12. Determinación de la carga de ADN parasitario mediante PCR en tiempo real

Células VERO® fueron incubadas en presencia de parásitos, BZN, la cumarina más activa, su complejo de inclusión y la combinación con BZN según lo descrito en el punto anterior. Las células VERO® fueron cosechadas mediante tripsinización y el ADN genómico fue extraído mediante el *kit* de purificación de ADN genómico Wizard (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de ADN fue re-suspendida en agua estéril libre de endonucleasas y almacenada a 4 °C hasta su uso. La concentración de ADN fue cuantificada mediante “ μ DropPlate DNA quantification system®” (Thermo Scientific®) en un lector Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®). Para la detección del ADN del parásito *T. cruzi* se amplificó la secuencia de 182 pb correspondientes al ADN satélite del parásito mediante el uso de los partidores TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3') y TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3')⁸⁴. Cada mezcla de reacción contenía 200 nM de cada partidador (directo e inverso), 1 ng de ADN, 12,5 μ L la amplificación se realizó en un detector de secuencias ABI Prism 7300 (Applied Biosystem®, USA). El programa de ciclado fue el siguiente: una incubación inicial a 20 °C durante 2 min, un paso de desnaturalización a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de amplificación de 95 °C (15 s) y 72 °C (30 s). El paso final fue una etapa de disociación que osciló entre 60 y 95 °C (105 s). El análisis de cuantificación relativa de los resultados se expresó como un RQ⁸⁶.

3.13. Determinación de la generación de especies radicalarias en medio parasitario mediante Resonancia de Espín Electrónico (REE)

Como se informó anteriormente, se cultivaron tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) a 37 °C en medio RPMI 1640. La concentración de parásitos fue de 8×10^7 parásitos/mL correspondientes a 1 mg de proteína. Los espectros de REE se obtuvieron usando tripomastigotes, en un medio de reacción que contenía nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 1 mM y 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) 100 mM como atrapador de espín en tampón fosfato 20 mM a pH 7.4. La cumarina más activa, BZN, complejo de inclusión y la combinación a 5 mM. Todos los experimentos se realizaron después de 10 min de incubación a 37 °C.

3.14. Determinación de la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en tripomastigotes de *T. cruzi*.

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó mediante la incorporación de la sonda catiónica fluorescente TMRE (éster metílico de tetrametilrodamina)⁶⁵. Se sembraron tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^7 parásitos/mL en una placa de 96 pocillos, posteriormente se incubó por 40 min en ausencia y presencia de la cumarina más activa, BZN, complejo de inclusión, combinación y cianuro de carbonilo *m*-clorofenilhidrazona (CCCP 10 μ M) este último utilizado como control positivo. A continuación, se lavó la placa con PBS y se realizó una centrifugación para separar el compuesto que no logró interactuar con el parásito. El pellet fue re-suspendido en medio parasitario RPMI 1640 que contenía la sonda fluorescente TMRE (50 nM) y se dejó incubando durante 15 min, para culminar se realizó un lavado de la placa con PBS para eliminar el excedente de sonda TMRE y se registró la incorporación de la sonda mediante fluorometría a una $\lambda_{(exc)}$ 550 nm y $\lambda_{(emi)}$ 590 nm. Todos los experimentos se realizaron en un ambiente oscuro.

3.15. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante Graph Pad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los datos se expresaron como media \pm DS (desviación estándar) de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional con posprueba de Dunnett. Los datos son considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de la serie 3-aril cumarinas mediante la metodología ORAC fluorescencia (ORAC-FL)

Para evaluar la capacidad antioxidante de la serie en estudio se utilizó la metodología ORAC-FL. En el cual, se registra la capacidad de *scavenging* o apagamiento de radicales peroxilo utilizando una sonda fluorescente.

Esta metodología permitió evaluar la labilidad de los átomos de hidrógeno de los grupos catecol de las cumarinas en estudio. En la figura 8, se muestra el perfil cinético del ORAC-FL. Asimismo, en la tabla 3 se observa los valores del índice ORAC obtenidos para los compuestos de la serie 3-aril cumarinas.

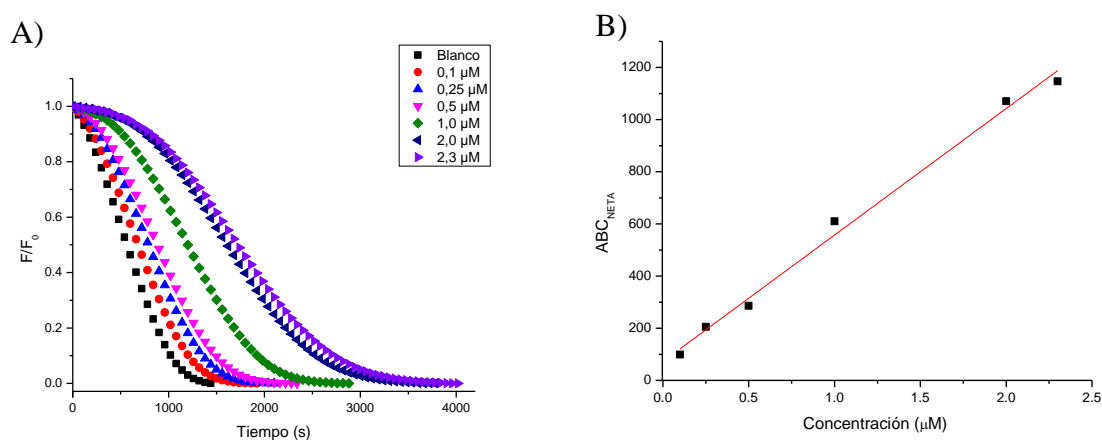


Figura 8. A) Perfil cinético ORAC-FL del compuesto 5 y B) Área bajo la curva (ABC) en función de la concentración del compuesto 3

Tabla 3. Índice ORAC-FL de la serie 3-aril cumarina

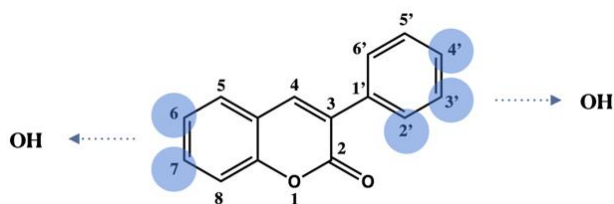
Compuesto	Índice ORAC-FL
1	1,3 ± 0,1
2	5,6 ± 0,3
3	0,4 ± 0,1
4	0,7 ± 0,1
5	1,6 ± 0,2
6	1,7 ± 0,4
7	0,9 ± 0,1
8	0,59 ± 0,02
9	0,8 ± 0,4
10	1,5 ± 0,7
11	1,2 ± 0,1
Trolox	1,0

Los compuestos 1, 2, 5, 6, 10 y 11 presentaron mayor capacidad antioxidante que el control Trolox. Los valores de índice ORAC permitió ordenar los compuestos de mayor a menor; en donde: **2 > 6 > 5 > 1 > 11 > 7 > 9 > 4 > 8 > 3.**

El compuesto 2 es el que tiene la mayor capacidad antioxidante de la serie, lo cual concuerda con Robledo-O'Rayn. N, *et al*⁴⁴, quienes estudiaron la capacidad antioxidante de una serie de hidroxi 3-aril cumarinas determinando que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 6 aumenta la capacidad antioxidante, ya que se encuentra en posición *para* respecto al grupo carbonilo de la cumarina, permitiendo la fácil transferencia del átomo de hidrógeno al radical peroxilo. Asimismo, determinaron que la posición del grupo catecol en la cumarina es importante, ya que si está formando parte del sustituyente arilo aumenta la capacidad antioxidante. Para los compuestos 1, 3 y 4 que tienen el grupo catecol en el sustituyente arilo, la presencia de grupos donantes de electrones como el metilo, como la ausencia de sustituyentes en el esqueleto base de la cumarina influye en la disminución de la capacidad antioxidante.

Para racionalizar el estudio realizado de la capacidad antioxidante mediante la metodología del ORAC-FL, se determinó el índice de Fukui f_k^0 relacionado con un ataque radicalario. Este índice evalúa teóricamente la reactividad local en los átomos de oxígeno que participan en las reacciones de los grupos catecol presentes en la serie estudiada⁸⁷. En la tabla 4, se observa los valores obtenidos de los índices de Fukui.

Tabla 4. Índice Fukui radicalario (f_k^0) de la serie 3-aryl cumarinas



Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Índice f_k^0											
O₄	-0,060	-0,052	-0,058	-0,059							
O₃	-0,046	-0,040	-0,044	-0,045		-0,029					
O₂					-0,050						
O₆		-0,060			-0,039	-0,040	-0,055	-0,047	-0,037	-0,038	-0,036
O₇					-0,051	-0,054	-0,066	-0,061	-0,050	-0,057	-0,050
C₄	-0,111	-0,102	-0,109	-0,113	-0,102	-0,096	-0,094	-0,093	-0,094	-0,101	-0,102

Los índices de Fukui muestran que la mayor reactividad del grupo catecol se tiene cuando forma parte del sustituyente arilo de la cumarina. Los valores de f_k^0 para los compuestos que tienen el grupo catecol en el sustituyente arilo son similares al O_4 y O_3 , respectivamente. En donde, el ataque radicalario ocurrirá primero en O_4 al ser más reactivo ($\sim -0,060$). Lo que, no ocurre para el compuesto 2, que al tener un grupo hidroxilo en posición 6 de la cumarina disminuye la reactividad del grupo catecol, siendo el grupo hidroxilo más propenso a un ataque radicalario; lo cual concuerda con lo descrito anteriormente.

Los compuestos 5 y 6, que presentan un grupo hidroxilo en posición 2' y 3' del sustituyente arilo respectivamente y el grupo catecol en 6 y 7, generan una disminución de la reactividad del grupo catecol similar a la del compuesto 2. Con diferencia, que las reactividades de los grupos hidroxilos (O_2 $-0,050$ y O_3 $-0,029$) son menores que la reactividad del grupo hidroxilo en el compuesto 2, debido a que podría existir una interacción entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con el oxígeno del carbonilo de la pirona.

Para los compuestos 7 y 8, la presencia de un sustituyente halogenado en el grupo arilo no afecta en la reactividad del grupo catecol. Los compuestos 9, 10 y 11, que tienen un sustituyente arilo de tipo tiofeno disminuyen la reactividad del grupo catecol. Adicionalmente, este estudio permitió observar que el sitio más probable para un ataque radicalario en los compuestos se centra en el carbono 4 (C_4), ya que la presencia del doble enlace podría estabilizar al radical libre^{39,88}.

En conclusión, los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante mediante la metodología ORAC-FL fueron relacionados correctamente con los índices de Fukui radicalario. En donde, el compuesto 2 es el que presenta mayor capacidad antioxidante.

A partir de estos ensayos se puede establecer que el grupo catecol no influye de manera significativa sobre la capacidad antioxidante. Por lo que, se esperaría que la 3-aryl cumarinas en estudio presenten actividad tripanocida, ya que un posible mecanismo de acción tripanocida es la generación de especies radicalarias en el parásito.

4.2. Determinación del porcentaje del efecto tripanocida de la serie 3-aril cumarinas

Para la determinación del porcentaje de actividad tripanocida se utilizó la metodología de reducción del MTT. Esto permitió realizar un estudio preliminar de la serie 3-aril cumarinas y seleccionar cual o cuales de los compuestos presentaron la mejor actividad sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* y proceder a generar los complejos de inclusión y el análisis de combinación con BZN⁸⁹. En la figura 9, se observa los porcentajes del efecto tripanocida de los compuestos sobre el parásito en donde, los compuestos 2, 6 y 8 son los que tienen la mejor actividad tripanocida. Siendo, esta actividad menor a la de BZN. Esta baja actividad puede ser causada por factores como: solubilidad, temperatura, pH, entre otros.

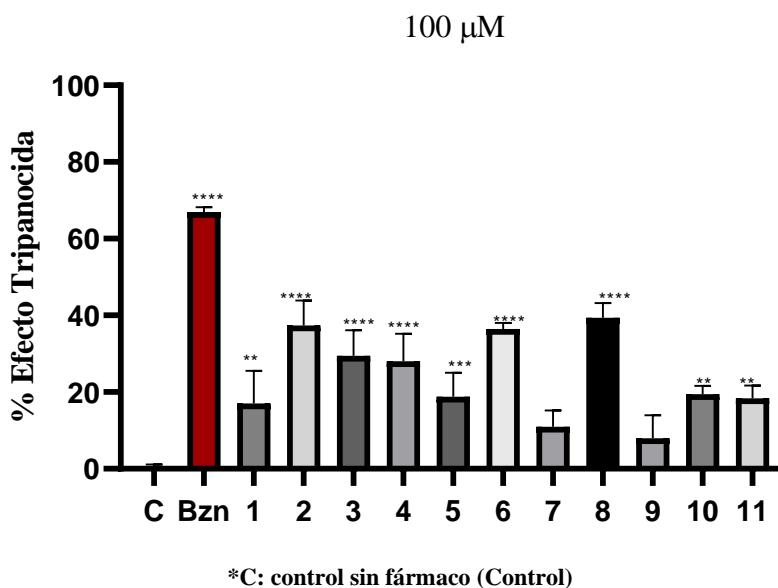


Figura 9. Porcentaje del efecto tripanocida sobre tripomastigote de *T. cruzi* (Dm28) a concentraciones de 100 μ M de la serie 3-aril cumarinas y benznidazol como control positivo. Diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA de una vía con post-prueba de Dunnett, **** $p < 0,0001$)

Asimismo, se determinó la citotoxicidad de los compuestos sobre las células de mamífero VERO® a una concentración de 100 μ M. Lo cual, se observa en la figura 10.

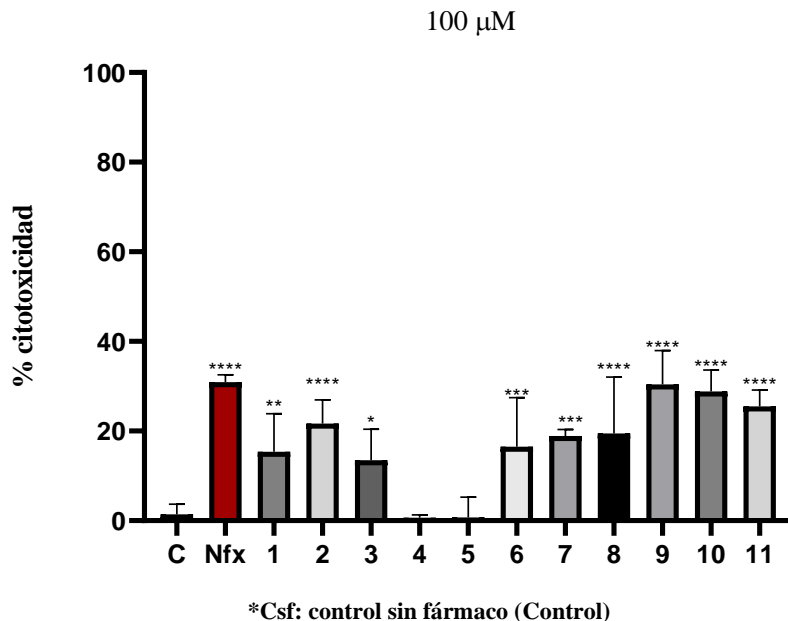


Figura 10. Porcentaje de citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® a concentración de 100 μ M de la serie 3-aril cumarinas y nifurtimox como control positivo. Diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA de una vía con post-prueba de Dunnett, **** $p < 0,0001$)

Al observar la figura 10, se determinó que la mayoría de los compuestos de la serie 3-aril cumarinas son tóxicos a excepción del compuesto 4 y 5. Asimismo, se observa que los compuestos 2, 6 y 8 que presentaron la mejor actividad tripanocida sobre tripomastigote son más citotóxicos que el fármaco convencional BZN en células de mamífero. Lo cual, limitaría su uso como candidatos anti-*T. cruzi* potenciales. En la tabla 5, se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* y el porcentaje de citotoxicidad de los compuestos sobre células VERO® a una concentración de 100 μ M para los dos ensayos.

Tabla 5. Porcentaje del efecto tripanocida sobre tripomastigote de *T. cruzi* y citotoxicidad en células de mamífero VERO® de la serie 3-aril cumarinas a 100 µM

Compuesto	% Efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i> (Dm28) a 100 µM	% Citotoxicidad en células de mamífero VERO® a 100 µM
1	17,0 ± 8,5	15,4 ± 5,0
2	37,3 ± 6,6	21,7 ± 3,1
3	29,5 ± 6,6	13,5 ± 4,1
4	28,1 ± 7,1	0,3 ± 3,5
5	21,5 ± 7,5	0,5 ± 2,3
6	36,5 ± 1,5	16,5 ± 6,5
7	11,0 ± 4,2	18,9 ± 0,8
8	39,4 ± 3,8	19,5 ± 7,4
9	7,9 ± 6,0	30,4 ± 4,4
10	19,5 ± 2,1	28,9 ± 2,8
11	18,4 ± 3,3	25,5 ± 2,2
CSF	0,0 ± 1,1	0 ± 5,0
BZN (100 µM)	67,1 ± 2,3	-

Mediante la evidencia experimental, se evaluó una posible tendencia entre las capacidades antioxidantes y las actividades tripanocidas (Figura 11). En donde, se observa una posible tendencia a mayor capacidad antioxidante mayor efecto tripanocida (círculo rojo). Asimismo, se determinó que los compuestos 8, 4 y 3 no pertenecen a esta tendencia. Esto puede ser debido, a que el mecanismo de acción tripanocida sea distinto al de los compuestos presentes dentro de la tendencia²¹. En conclusión, no se logró establecer una tendencia entre los dos parámetros evaluados. En este análisis, se eliminó al compuesto 2, ya que al tener una capacidad antioxidante alta impedía identificar la tendencia.

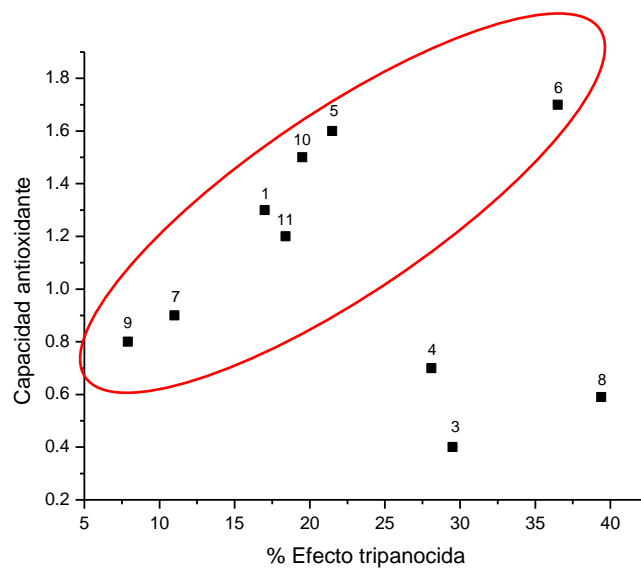


Figura 11. Tendencia entre la capacidad antioxidante y el porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* de la serie 3-aril cumarinas

4.3. Determinación de la difusión pasiva de la serie 3-aril cumarinas mediante la permeabilidad paralela de membrana artificial (PAMPA)

Posterior a la determinación de la actividad tripanocida de los compuestos en parásitos como en células de mamífero, se evaluó la difusión pasiva de toda la serie mediante la técnica PAMPA⁸². Para ello, se utilizó una monocapa lipídica formada por fosfatidilcolina en n-dodecano.

En la tabla 6, se muestra los porcentajes de compuesto que se retuvo y difundió la membrana artificial.

Tabla 6. Determinación de la difusión pasiva de la serie 3-aril cumarinas**Análisis PAMPA**

Compuesto	Coefficiente de absorptividad (ϵ) $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Difundió (%)	Retenido (%)
1	5,0	$0,90 \pm 0,08$	$89,7 \pm 1,0$
2	12,2	$23,6 \pm 3,9$	$29,2 \pm 4,1$
3	NS	NS	NS
4	NS	NS	NS
5	5,6	$0,12 \pm 0,05$	$44,0 \pm 1,0$
6	19,8	<LD	$77,1 \pm 2,1$
7	6,2	$0,73 \pm 0,01$	$52,3 \pm 2,4$
8	12,2	<LD	$78,8 \pm 0,8$
9	2,3	$0,94 \pm 0,09$	$49,1 \pm 0,9$
10	5,7	$0,6 \pm 0,1$	$59,0 \pm 1,2$
11	5,0	$0,5 \pm 0,1$	$39,6 \pm 2,9$
BZN	6,0	$37,7 \pm 0,1$	$42,5 \pm 0,3$
Azul de Evans	65,1	<LD	$49,6 \pm 5,2$

NS: No solubles en buffer pH 7.4; <LD: bajo el límite de detección.

Para este análisis se utilizó azul de Evans como compuesto control del método, ya que esta descrito que no logra atravesar la membrana artificial. Así, los porcentajes obtenidos de la serie en estudio indican que la mayoría de los compuestos quedan retenidos en un alto porcentaje en la membrana artificial. La retención de los compuestos en la membrana artificial es superior a BZN, por lo que el porcentaje de difusión es mínimo al compararlo con el fármaco, con la excepción del compuesto 2 que tiene un porcentaje cercano al BZN. A partir de estos resultados se realizó un análisis de tendencia entre el porcentaje de compuesto retenido en la membrana y el porcentaje de actividad tripanocida (Figura 12).

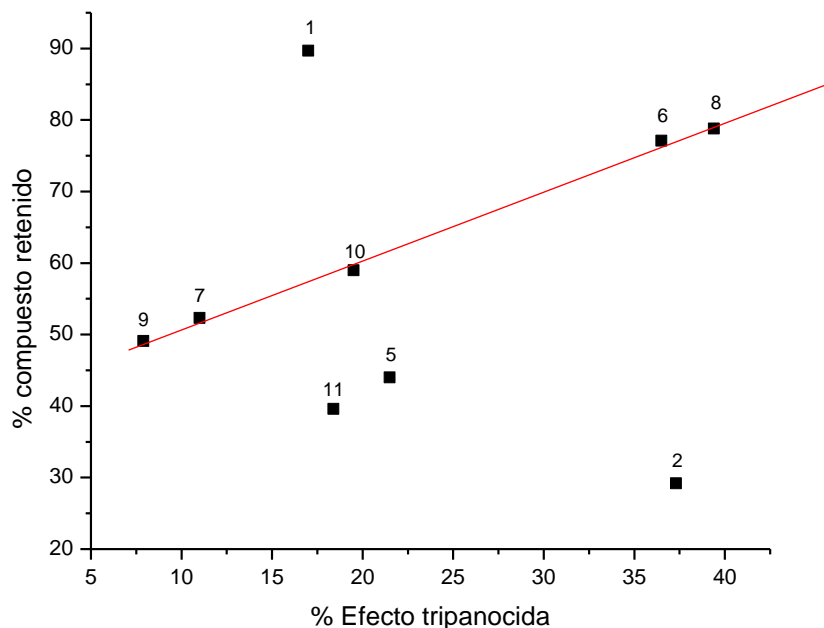


Figura 12. Tendencia entre el porcentaje de efecto tripanocida y compuesto retenido en la membrana artificial

En la figura 12, se observa la tendencia existente entre la actividad tripanocida y el porcentaje de compuesto retenido en la membrana. En donde, los compuestos 6 y 8 que presentan un mayor efecto tripanocida son mayormente retenidos en la membrana artificial. En cuanto, al compuesto 2 que presentó actividad similar no participa en la tendencia, pero tiene una alta difusión pasiva con respecto al resto de compuestos. Por lo que, el compuesto 2 podría tener un mecanismo de acción diferente a los compuestos 8 y 6. El cual, podría ser la despolarización de la membrana mitocondrial del parásito, inhibición enzimática, entre otros.

Cabe mencionar que, la metodología PAMPA es una prueba preliminar de cortos tiempos de análisis que permite indicar una posible difusión pasiva del compuesto en la membrana artificial y así determinar sus propiedades fisicoquímica. Por lo que, para complementar estos resultados se debería trabajar con el parásito, así como con las células de mamífero ya que se podría evaluar transporte y difusión activa^{90,91}.

Definido los compuestos que presentaron mayor actividad tripanocida se determinó los valores de IC₅₀ sobre tripomastigote de *T. cruzi* y células de mamífero VERO®. En la tabla 7, se observa los valores correspondientes al IC₅₀.

Tabla 7. Valores de IC₅₀ sobre tripomastigote de *T. cruzi* y células de mamífero VERO®

Compuesto	IC ₅₀ en tripomastigote de <i>T. cruzi</i> (Dm28) μM	IC ₅₀ en células de mamífero VERO® μM	Índice de Selectiva IS
2	186,2 ± 0,6	177,8 ± 0,3	0,9
6	185,1 ± 0,4	192,3 ± 0,3	1,0
8	33,6 ± 0,7	162,2 ± 0,3	4,8
BZN	18,8 ± 0,5	321,6 ± 0,5	17,1

El compuesto 8 presenta un valor de IC₅₀ menor que los compuestos 2 y 6. Asimismo, es el compuesto más tóxico sobre las células mamíferas VERO®, presentando un índice de selectividad (IS) 4,8; el cual es más bajo que el fármaco de control BZN.

Al realizar un análisis estructural de los compuestos 2, 6 y 8 se observa que los tres compuestos tienen un grupo catecol en su estructura. Por otra parte, los compuestos 2 y 6 presentan un sustituyente hidroxilo, mientras que el compuesto 8 un bromo. En el compuesto 2, el grupo catecol se encuentra en el sustituyente arilo y el grupo hidroxilo en la posición 6 del esqueleto base de la cumarina. En el compuesto 6 y 8, el grupo catecol se encuentra en la posición 6 y 7 de la cumarina. Por otro lado, el arilo tiene diferentes sustituyentes como: hidroxilo para el compuesto 6 y bromo para el compuesto 8. Los dos sustituyentes se encuentran en posición *meta* respecto al esqueleto base de la cumarina (Figura 13)

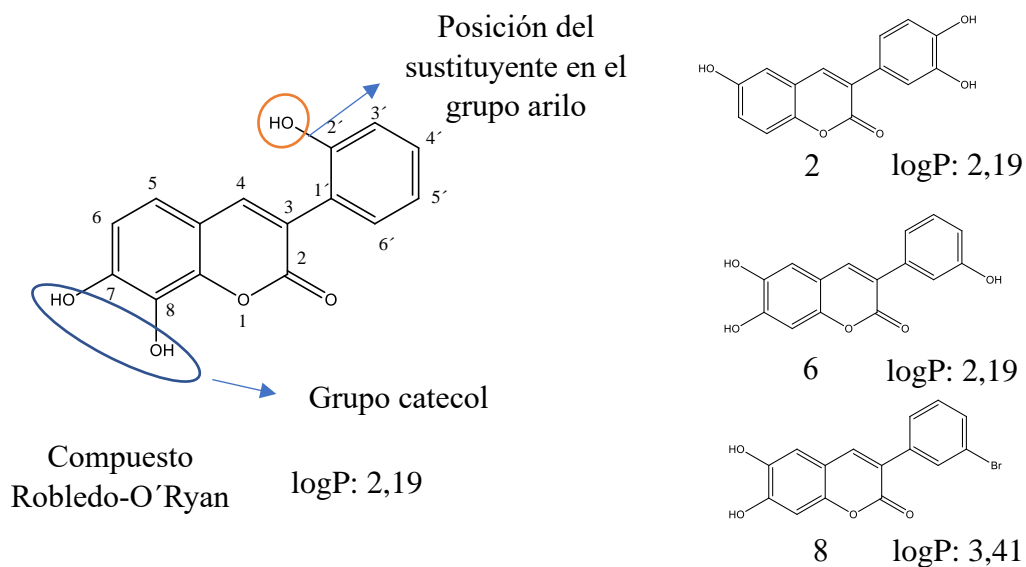


Figura 13. Estudio estructura – actividad de los compuestos más activos de la serie 3-aryl cumarinas.

Estudios realizados por Robledo-O'Ryan. N, *et al*⁴⁴, determinaron que de la serie hidroxi 3-aryl cumarinas el compuesto con mayor actividad tripanocida (IC_{50} 39,73 μ M) sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* presentaba un grupo catecol en el esqueleto base de la cumarina y un sustituyente hidroxilo en posición 2 del arilo (Figura 13). Asimismo, indicaron que la presencia del grupo catecol en el esqueleto de la cumarina aumentaría la actividad tripanocida, mientras que la posición del grupo hidroxilo en el arilo incrementa aún más dicha actividad. En base a lo mencionado anteriormente, se corroboraría que la presencia del grupo catecol modula la actividad tripanocida. Así se sugiere que la presencia de los sustituyentes en posición *meta* del grupo arilo en los compuestos 6 y 8 podría aumentar más la actividad tripanocida. A su vez, la presencia de un halógeno (compuesto 8) aumenta la lipofilia (LogP: 3,41) con respecto a 6 y 2 (LogP: 2,19), lo que le permite penetrar o retenerse en mayor cantidad en la membrana celular, lo cual fue evidenciado en el análisis de PAMPA.

4.4. Determinación de la generación de especies radicalarias en medio parasitario por Resonancia de Espín Electrónico (REE)

Definido los compuestos que presentaron mejor actividad tripanocida, se evaluó un posible mecanismo de acción mediante la generación de estrés oxidativo. Para ello, se determinó las especies radicalarias en cultivos de tripomastigote de *T. cruzi*, utilizando como atrapador de espín DMPO (óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina), ya que no genera especies radicalarias en medio parasitario, penetra la membrana celular y reacciona con radicales libres centrados en carbono y oxígeno^{44,91,92}. La concentración de los compuestos a evaluar fue de 2 mM en DMSO.

Se observó que los compuestos 6 y 8 presentaron el mismo patrón de acoplamiento hiperfino, luego de 10 min de incubación a 28 °C. En cambio, el compuesto 2 no presenta ningún patrón hiperfino. En la figura 14, se observa la generación de una señal triplete intensa con constantes de acoplamiento hiperfino (aN ~ 14,62 G) correspondiente al compuesto paramagnético DMPOX (5,5-dimetil-2-oxo-pirrolin-1-óxido), lo que concuerda con lo descrito por Salgado. F, *et al*⁹¹.

Asimismo, se registró el espectro del fármaco NFX, ya que se conoce que su mecanismo de acción tripanocida está mediado por la generación de estrés oxidativo. El espectro mostró un triplete correspondiente al aducto de espín DMPOX, que se genera por la oxidación del aducto DMPO-OH. Para mejor comprensión de las especies radicalarias generadas se muestra un esquema en la figura 15.

Estos resultados permiten concluir que el mecanismo de acción de los compuestos 6 y 8 está mediado por la generación de estrés oxidativo; mientras que el compuesto 2, dada su elevada capacidad antioxidante, presentaría otro mecanismo de acción.

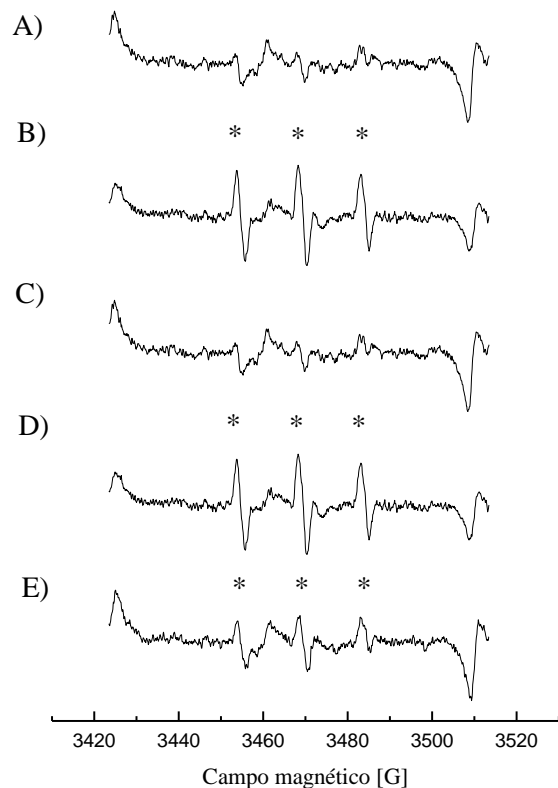


Figura 14. Espectros REE de los aductos de espín generados sobre tripomastigote de *T. cruzi* a temperatura ambiente. A) Espectro registrado de control sin compuesto, B) Espectro registrado al Nfx incubado con tripomastigote, C) Espectro registrado al compuesto 2 incubado con tripomastigote, D) Espectro registrado al compuesto 6 incubado con tripomastigote y E) Espectro registrado al compuesto 8 incubado con tripomastigote. El patrón hiperfino de DMPOX está representado por (*)

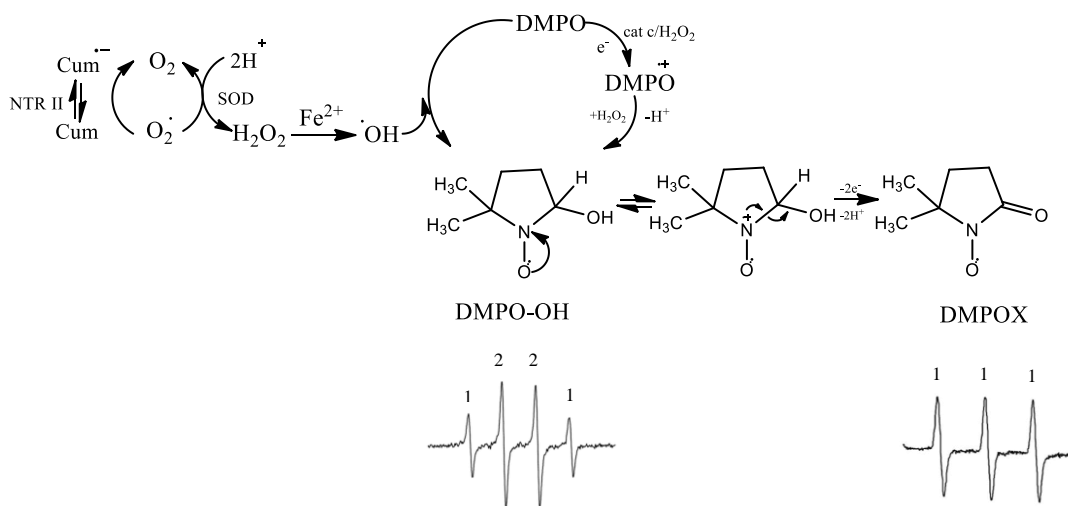


Figura 15. Esquema de generación de especies radicalarias sobre tripomastigote de *T. cruzi*, generación de metabolitos y su interacción con el atrapador de espín DMPO.

4.5. Formación de los complejos de inclusión con β -CDs y la determinación de la geometría de inclusión

Posteriormente, se realizó la formación de los complejos de inclusión de los compuestos 2, 6 y 8 así como BZN con β -CDs, ya que presentaron la mejor actividad tripanocida.

Los complejos de inclusión se realizaron mediante la adición de cantidades crecientes de β -ciclodextrina, manteniendo una concentración constante del compuesto en estudio en medio acuoso⁶³. La figura 16, presenta la variación de la fluorescencia en función a la concentración de ciclodextrina.

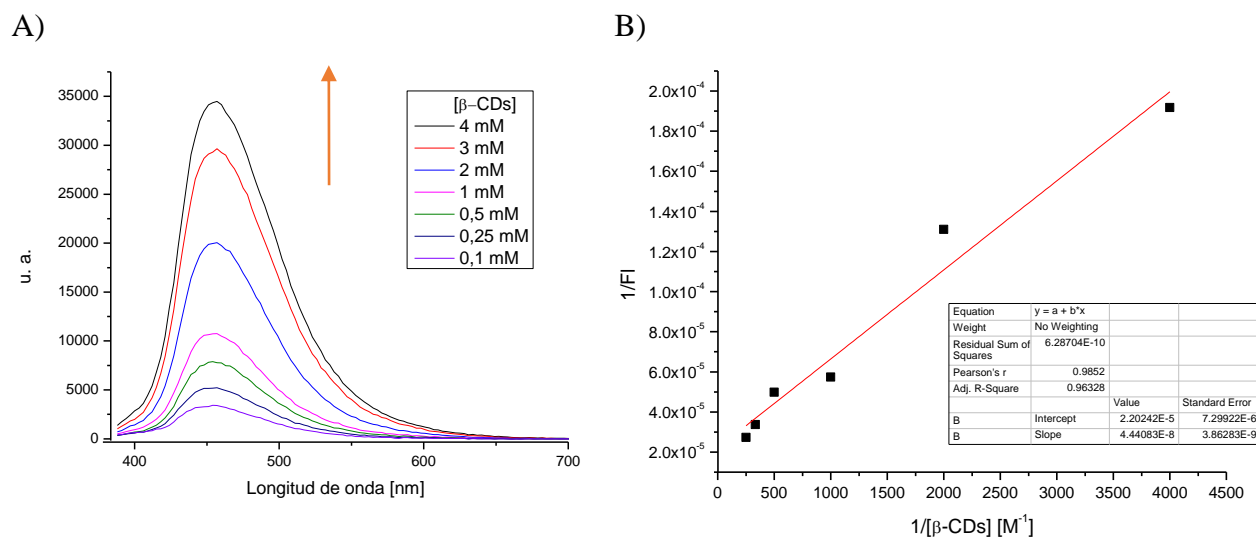


Figura 16. A) Espectro de fluorescencia del compuesto 8 con distintas concentraciones de β -CDs a 25°C y B) Representación gráfica de la ecuación de Benesi – Hildebrand para el complejo de inclusión del compuesto 8 con β -CDs a 25°C

En la figura 16, se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina, indicando que el compuesto se está incluyendo en el complejo. En la tabla 8, se muestra los valores de las constantes de asociación de los complejos de inclusión formados por los compuestos 2, 6, 8 y BZN con β -CDs determinadas mediante la ecuación de Benesi-Hilderbrand^{93,94}. Asimismo, se observa el porcentaje de compuesto incluido en la β -CDs, mediante la ecuación de Lucas-Abellán⁷⁸.

Tabla 8. Determinación de las constantes de asociación de la serie 3-aril cumarinas en β -CDs

Compuesto	Constante de inclusión M^{-1}	Porcentaje de compuesto incluido (%)
2	-	-
6	5500 ± 707	80 ± 4
8	625 ± 177	63 ± 1
BZN	52 ± 10	20 ± 1

De los compuestos incluidos en la ciclodextrina, el compuesto 6 presentó la constante de inclusión más alta, lo cual implica un mayor porcentaje de compuesto incluido. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Folch-Cano, C. *et al*⁵⁸, quienes estudiaron la formación de complejos de inclusión de algunos derivados de catequina de té en diferentes ciclodextrinas, determinándose una constante de asociación de la catequina con β -CDs de $3000 M^{-1}$. Esta constante de inclusión es similar a la obtenida para el compuesto 6, que presenta en su estructura, al igual que la catequina, un grupo catecol. Además, el grupo hidroxilo en el sustituyente arilo, influye en la inclusión, ya que puede generar interacción tipo puente de hidrógeno con los hidroxilos de la cavidad interior de la ciclodextrina. Para el compuesto 8, el sustituyente bromo en el grupo arilo, podría dirigirse hacia el interior de la ciclodextrina, generando interacciones no covalentes de tipo Van del Waals.

Además, la constante obtenida con BZN fue baja, concordando con lo expuesto por Leonardi, D. *et al*⁶⁴, quienes estudiaron la formación de complejos de inclusión con este mismo fármaco con diferentes ciclodextrinas. Así, el valor de la constante de inclusión de BZN con β -CDs es de $8,7 \pm 0,7 M^{-1}$. Por lo que, se concluye que la constante de inclusión de BZN en la β -CDs es difícil, debido a que es un compuesto altamente soluble en medio polar, impidiendo la migración hacia la ciclodextrina. Nuestros resultados corroboran esta observación, ya que, la constante de inclusión de BZN obtenida en el presente estudio es menor respecto a los compuestos 6 y 8.

El compuesto 2 no se incluyó en la β -CDs, lo que podría ser causado por una alta interacción entre el compuesto y el solvente polar, generando una solvatación del compuesto. Estudios realizados respecto a la formación de complejos de inclusión de catequinas de té en β -CDs⁹⁵, determinaron que el grupo catecol se incluye dentro de la ciclodextrina, teniendo mayor preferencia que los grupos hidroxilos de la molécula. Esta observación podría explicar la no inclusión del compuesto 2, ya que al estar el grupo catecol en el sustituyente arilo este anclaría con los hidroxilos exteriores de la ciclodextrina impidiendo la orientación del compuesto al interior de la ciclodextrina. A su vez, Medronho, B. *et al*⁹⁶, evaluaron la inclusión de ácido rosmarínico en β -CDs, indicando que el grupo catecol interactúa con los hidroxilos de la parte externa de la ciclodextrina, para luego orientarse la molécula hacia el interior de la cavidad, lo que corroboraría lo postulado anteriormente.

La presencia de grupos hidroxilos en los compuestos en estudio, otorgan características polares a las moléculas, por lo que el utilizar un derivado de la β -CDs con características polares como la hidroxipropil- β -CDs (HP- β -CDs) podrían mejorar la inclusión. Así, se evaluó la formación de complejos de inclusión de los compuestos en HP- β -CDs. La tabla 9, muestra los valores de las constantes de inclusión y porcentajes de compuesto incluido en la HP- β -CDs.

Tabla 9. Determinación de las constantes de asociación de la serie 3-aril cumarinas en

Compuesto	HP- β -CDs	
	Constante de inclusión M^{-1}	Porcentaje de compuesto incluido (%)
2	4210 \pm 1409	77 \pm 7
6	20000 \pm 1000	94 \pm 4
8	1286 \pm 100	67 \pm 7

Los valores obtenidos indican un aumento en las constantes de inclusión al utilizar la HP- β -CDs con respecto a los complejos formados con β -CDs. Lo que, concuerda con lo descrito por Folch-Cano. C, *et al*⁵⁸, quienes indican que la modificación de la ciclodextrina aumenta

la inclusión de los compuestos, ya que la extensión de la cavidad por los grupos hidroxipropil podría mantener al huésped en su lugar de manera más efectiva.

Por otra parte, se determinó la geometría de inclusión de BZN y compuesto 8 en β -CDs mediante RMN 1 y 2D.

El espectro de RMN ^1H del BZN libre (en MeOD deuterado) se ilustra en la figura 17a, en él se evidencia dos dobletes (*d*) correspondientes a los protones 4'-H y 5'-H centrados en 7.17 y 7.46 ppm, con constantes de acoplamiento (*J*) de 1.20 Hz, del fragmento 1H-2-nitroimidazolilo; dos singletes (*s*) en la región de 4.42 y 5.21 ppm, que integran para dos protones cada uno, asociados a los hidrógenos Ha y Hb, respectivamente. Al igual que un multiplete (*m*) en 7.22 – 7.36 ppm relacionado a los protones del anillo de benceno del fragmento bencilo del BZN, 2''-H/6''-H, 3''-H/5''-H, 4''-H y el protón de la función amida.

En la figura 17d, se observa el espectro RMN ^1H de la cumarina 8 (en DMSO deuterado). En él se puede observar tres singletes (*s*) correspondientes a los protones 5-H, 8-H y 4-H centrados en 7.1, 6.8 y 8.2 ppm. Asimismo, se tiene dos singletes (*s*) en la región de 9.5 y 10.4 ppm correspondientes a los protones de 6-H y 7-H. En la parte del grupo arilo, se identificó un doblete (*d*) alrededor de 7.92 ppm correspondiente al protón 2'-H y un multiplete (*m*) correspondientes a los protones 4'-H, 5'-H y 6'-H en la región de 7.71- 7.39 ppm con constantes de acoplamiento (*J*) 8.5 Hz.

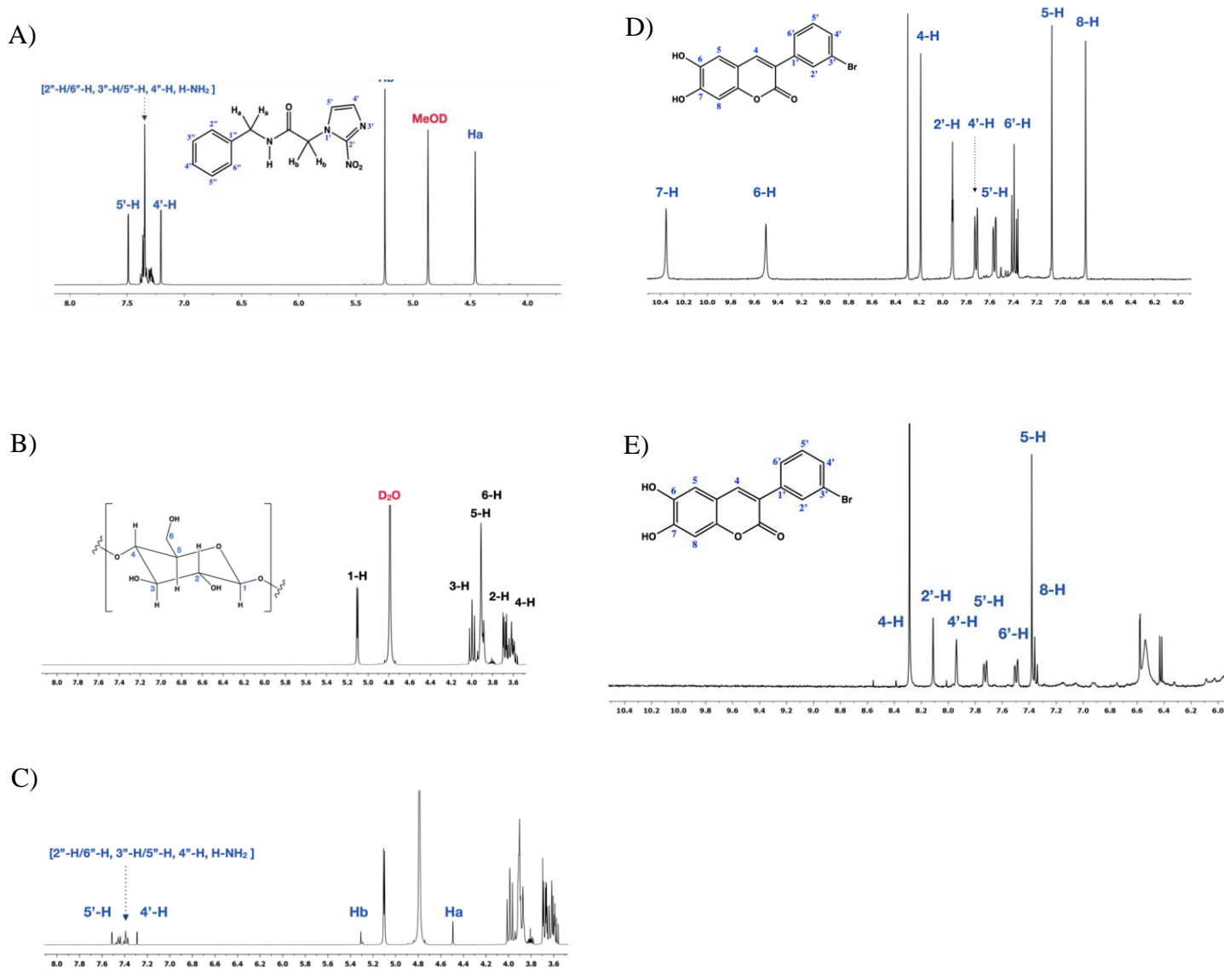


Figura 17. Comparación entre los espectros de RMN ^1H del benznidazol, β -ciclodextrina, compuesto 8 y complejos de inclusión formados. A) Espectro RMN ^1H del BZN 400 MHz, B) Espectro RMN ^1H de β -ciclodextrina 400 MHz, C) Espectro de RMN ^1H del BZN- β -CDs 400 MHz, D) Espectro de RMN ^1H compuesto 8 400 MHz y E) Espectro RMN ^1H compuesto 8- β -CDs 400 MHz.

En la figura 17b, se presenta el espectro RMN ^1H de la β -CDs en (D_2O). En esta figura, se identifica en primera instancia, la señal característica (doblete) del protón anomérico de la D-glucopiranososa a 5.10 ppm cuya constante de acoplamiento con el protón 2-H es de 3.78 Hz. Adicionalmente, la señal del protón 3-H se puede detectar fácilmente, ésta se resuelve como un triplete (*t*) centrado en 4.00 ppm y con una constante de acoplamiento equivalente

a 9.41 Hz, debido a la interacción simultánea con los núcleos 2-H y 4-H. Las señales de los protones restantes 2-H, 4-H, 5-H y 6-H no se resolvieron por completo y, por tanto, fueron asociadas a los multipletes centrados en 3.54-3.70 (2-H, 4-H) y 3.88-3.92 (5-H, 6-H) ppm.

Con el objetivo de corroborar las asignaciones recién descritas, se recurrió al análisis del espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H (Figura 18) para la β -CDs. Tal y como se observa, se comprueba inequívocamente las siguientes interacciones entre los núcleos 1-H y 2-H (línea azul), 2-H y 3-H (línea naranja), 3-H y 4-H (línea verde), y finalmente, los acoplamientos entre los núcleos 4-H, 5-H y 6-H (línea morada).

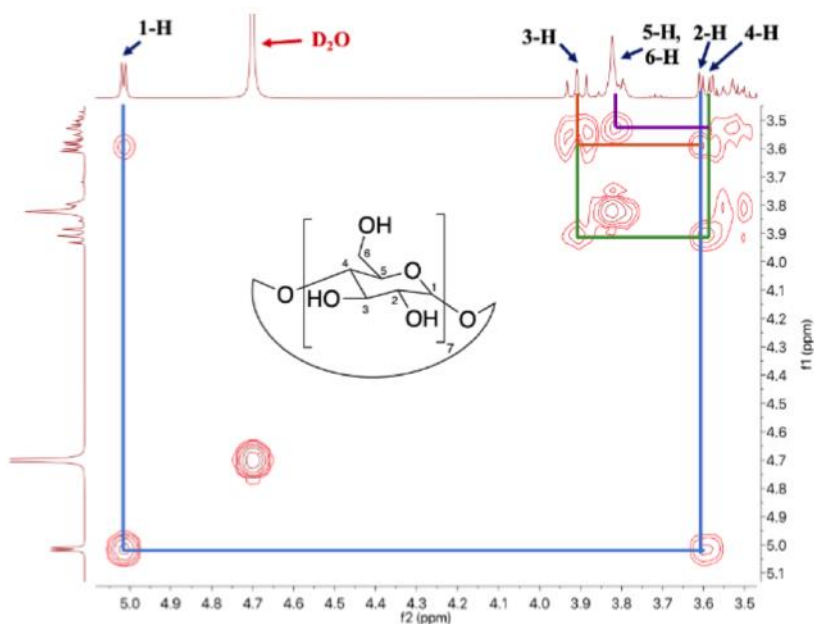


Figura 18. Espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de la β -ciclodextrina (400 MHz)

Una vez establecidos los desplazamientos químicos del BZN, compuesto 8 y β -CDs libres, se caracterizó los complejos de inclusión (figura 17c y e). Al contrastar los espectros de los compuestos libres con los compuestos incluidos, se evidencia claramente diferencia en los desplazamientos químicos de las señales del BZN y compuesto 8 cuando están formando complejos con la β -CDs, indicando la inclusión en la cavidad del macrociclo de D-glucopiranososa (Figura 18).

En general, las señales de los protones del BZN y compuesto 8 en el complejo de inclusión se desplazaron hacia mayores frecuencias en el espectro RMN ^1H , probablemente a causa de la interacción con la ciclodextrina. Como se observa en la tabla 10, para el BZN la diferencia en los corrimientos químicos de la mayoría de las señales es del orden de 0.05-0.12 ppm; a excepción de las respectivas a los protones aromáticos del fragmento bencilo del BZN, ya que el centro del multiplete, que representa a estos núcleos, se desplazó 0.02 ppm hacia mayor frecuencia. Para el compuesto 8, se observó que los protones aromáticos del sustituyente arilo en posición 3 incluido el protón 4-H tuvieron desplazamientos bajos 0.13-0.23 ppm con respecto a los protones 5-H y 8-H que se desplazaron entre 0.31-0.55 ppm. Estos desplazamientos bajos se pueden explicar con el hecho de que el anillo de benceno por parte del BZN y el sustituyente arilo hasta el carbono 4 en el compuesto 8 se encuentran localizados en el interior de la cavidad de la ciclodextrina y, por tanto, que exista interacción de los protones de esos fragmentos con los átomos de oxígeno internos del macrociclo, confiriendo una región de protección anisotrópica a estos hidrógenos. Por otra parte, los desplazamientos químicos de mayor magnitud se pueden explicar por la interacción de los protones restantes del BZN y compuesto 8 con los átomos de oxígeno externos de la ciclodextrina (más polarizados), quienes ejercen un campo de desprotección magnética que resulta en el desplazamiento de las señales de estos núcleos hacia el campo bajo del espectro⁹⁷.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de BZN y compuesto 8 libre y en complejo de inclusión con β -CDs

Protón	BZN _{libre}	BZN- β -CDs	$12\Delta\delta$ (ppm)	Protón	Comp. 8 _{libre}	8- β -CDs	$12\Delta\delta$ (ppm)
	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)			δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	
4'-H	7.20	7.29	0.029	2'-H	7.92	8.11	0.19
	1.20	1.20	0				
5'-H	7.49	7.51	0.02	4'-H	7.71 – 7.73	7.94	0.23
	1.20	1.20	0		8.5	8.5	
H_a	4.46	4.49	0.03	5'-H	7.55 – 7.57	7.72 – 7.74	0.17
					8.5	8.5	
H_b	5.25	5.31	0.06	6'-H	7.36 – 7.39	7.49 – 7.51	0.13
2''-H	7.35	7.39	0.04	4-H	8.19	8.39	0.20
3''-H	7.29	7.37	0.08	5-H	7.07	7.38	0.31
4''-H	7.33	7.40	0.07	8-H	6.79	7.34	0.55
5''-H	7.29	7.37	0.08				
6''-H	7.35	7.39	0.04				
H-NH₂	7.36	7.40	0.04				

Con el fin de obtener una herramienta que permita determinar la geometría de inclusión sin la necesidad del uso de instrumentos avanzados y de alto costo, se realizó el modelamiento molecular de la inclusión del compuesto 8 en la β -CDs. Para ello, se optimizó la estructura de la β -CDs para el compuesto 8. La figura 19^a, muestra la estructura de energía mínima obtenida para el complejo de inclusión mediante el moderno método semi-empírico GFN2-xTB⁸⁰. En donde, el sustituyente bromo del grupo arilo en posición 3 del esqueleto base de la cumarina se dirige hacia los hidroxilos primarios de la cavidad de la β -CDs, generando interacciones de tipo halógeno, el oxígeno de la pirona de la cumarina interactúa con los hidroxilos secundarios mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno, mientras que el

grupo catecol se encuentra en la parte externa de la β -CDs. Esta geometría de inclusión se corrobora con lo obtenido mediante RMN ^1H . En conclusión, se determinó que el modelamiento molecular es una herramienta óptima para determinar la geometría de inclusión de este tipo de cumarinas. A partir de esto, se determinó las geometrías de inclusión de los compuestos 2 y 6 en β -CDs.

La geometría de inclusión del compuesto 2 (Figura 19b), indica que la parte del sustituyente arilo en posición 3 de la cumarina se encuentra en el interior de la β -CDs, mientras que el esqueleto base de la cumarina está en la parte externa. Así, el grupo catecol del sustituyente arilo genera interacciones de tipo puente de hidrógeno con los hidroxilos. A su vez, el sustituyente genera interacción de tipo hidrófobas con la cavidad interna de la β -CDs. Para el compuesto 6 (Figura 19c), la geometría de inclusión indica que todo el esqueleto base de la cumarina se encuentra en la parte interna de la cavidad de la β -CDs, mientras que el sustituyente arilo está en la parte externa. Además, el grupo catecol en posición 6 y 7 del esqueleto base de la cumarina interactúa con los grupos hidroxilos primarios de la ciclodextrina mediante puentes de hidrógeno, el grupo carbonilo genera interacciones de tipo puente de hidrógeno con los hidroxilos secundarios del macrociclo. Asimismo, el anillo benzopirona genera interacción hidrófoba con la parte interna de la cavidad.

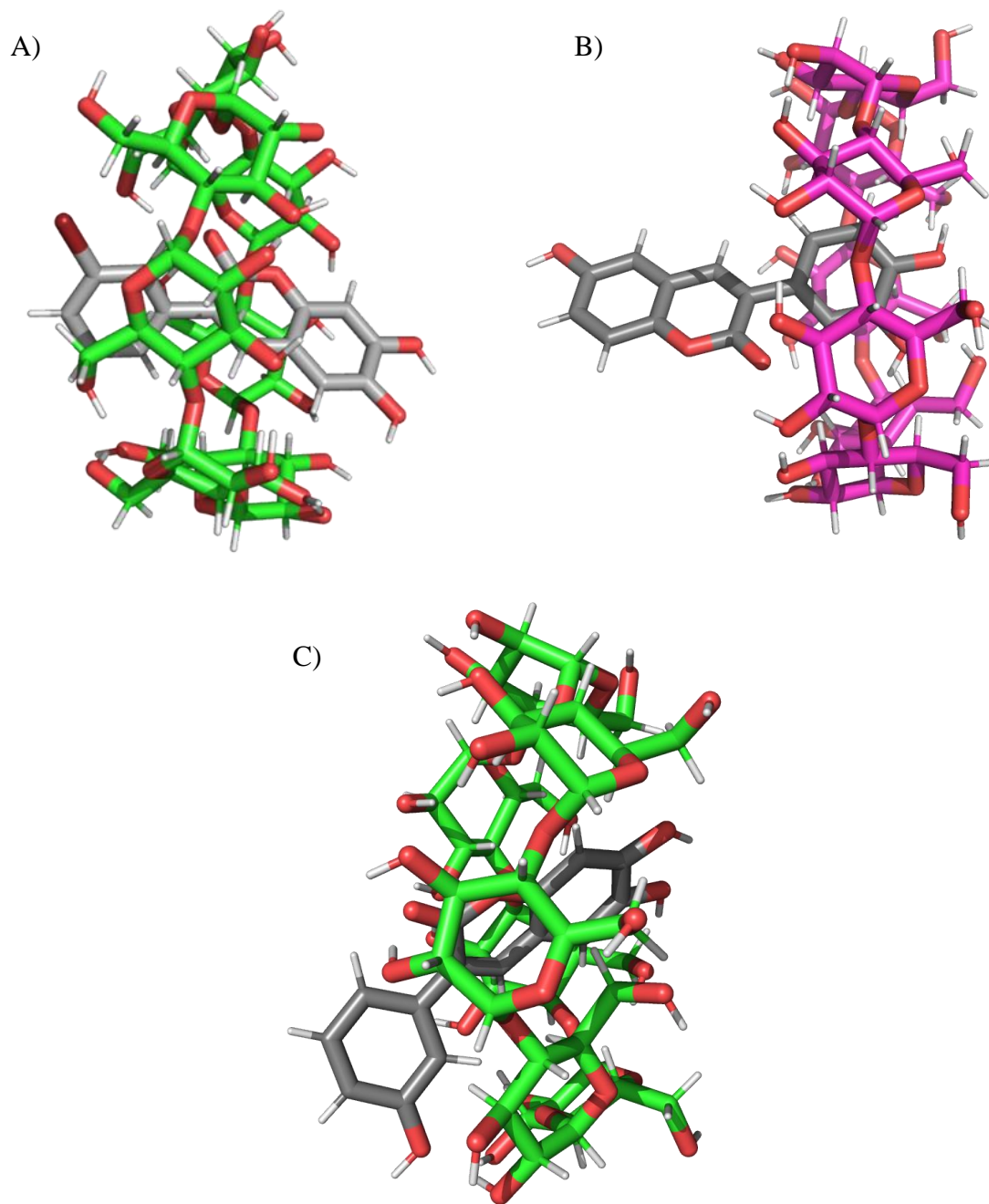


Figura 19. Geometría de los complejos de inclusión de los compuestos en β -CDs mediante modelamiento molecular. A) complejo de inclusión de 8- β -CDs, B) complejo de inclusión de 2- β -CDs y C) complejo de inclusión de 6- β -CDs.

4.6. Determinación de PAMPA en los complejos de inclusión

Con la determinación de la constante de inclusión y la concentración de compuesto contenido en el complejo de inclusión con β -CDs, se determinó la permeabilidad paralela en membrana artificial de los complejos y se comparó con los compuestos sin incluir. En la tabla 11, se indica los valores obtenidos en el análisis de la difusión paralela en membrana artificial (PAMPA). Para este estudio se trabajó con los complejos de inclusión de los compuestos 6 y 8, ya que fueron los que se logró determinar la constante de inclusión de los complejos formados con β -CDs.

Tabla 11. Determinación de la permeabilidad paralela en membrana artificial de los compuestos de inclusión comparados con los compuestos libres

Análisis PAMPA		
Compuesto	% Difundió	% Retenido
6	<LD	77,1 \pm 2,1
CI-6	<LD	36 \pm 5
8	<LD	78,8 \pm 0,8
CI-8	<LD	81 \pm 1

CI: Complejo de inclusión; <LD: bajo el límite de detección

Se evidencia una variación en los valores de permeabilidad en membrana artificial de los compuestos incluidos respecto a los compuestos libres. Para el compuesto 6, se observa que cuando forma el complejo de inclusión disminuye el porcentaje de compuesto retenido en la membrana artificial con respecto al compuesto libre. Lo cual, podría ser causado por las dimensiones del complejo de inclusión formado, impidiendo poder atravesar el poro de la membrana artificial. Fu. C, *et al*⁹⁸, determinaron que el tamaño del poro de la membrana artificial en el ensayo de permeabilidad paralela en membrana artificial es de 0,45 μ m, por lo que tamaños de compuestos mayores al poro no logran atravesar la membrana; siendo esta una posible causa por la cual el complejo de inclusión de 6 tenga un porcentaje alto de compuesto que no logró atravesar la membrana. Para el complejo de inclusión del compuesto 8, se observa un aumento en el porcentaje de compuesto retenido en membrana con respecto al compuesto libre, siendo esta variación no significativa. Paczkowska M, *et al*⁹⁹, evaluaron

la difusión pasiva mediante la técnica PAMPA del sumatriptán y su complejo de inclusión en β -CDs. Los autores determinaron que cuando se forma el complejo de inclusión disminuye la cantidad de compuesto que no logra atravesar la membrana artificial, incrementando su difusión, ya que una posible causa es el aumento de la biodisponibilidad del compuesto al estar incluido con respecto al compuesto libre. Moncada-Basualto, M, *et al*⁶⁵, determinaron que existen varios mecanismos que pueden explicar el aumento de la permeabilidad de las cumarinas cuando están formando complejos de inclusión. Así, el primer mecanismo se basa en el aumento de la solubilidad de las cumarinas cuando están incluidas dentro de la cavidad de la ciclodextrina; lo que, le permite a la molécula transportarse a través de las capas de agua que rodean la célula con la ayuda de la ciclodextrina hasta llegar a la membrana celular donde el complejo se disocia y el compuesto libre penetra a través de la membrana. Adicionalmente, los complejos de inclusión pueden ser incorporados a la célula mediante transportadores ubicados en las membranas celulares y mediante endocitosis¹⁰⁰.

Para los dos complejos de inclusión en estudio no fue posible determinar los porcentajes que lograron atravesar la membrana artificial, ya que se encontraban por debajo de los límites de detección del instrumento (tabla 11).

4.7. Determinación de la actividad tripanocida sobre tripomastigote de *T. cruzi* y citotoxicidad en células mamíferas VERO® de los complejos de inclusión

Se determinó la actividad tripanocida de los complejos de inclusión sobre tripomastigote de *T. cruzi* a la concentración del IC₅₀ para el compuesto 8 y a la concentración de 100 μ M para el compuesto 6, las cuales fueron determinadas mediante las ecuación de Lucas-Abellán⁷⁸.

Las actividades tripanocidas fueron comparadas con los valores obtenidos por los compuestos sin incluir. En la tabla 12, se observa los valores de la actividad tripanocida de los complejos de inclusión de los compuestos 6 y 8.

Tabla 12. Porcentaje de actividad tripanocida de los complejos de inclusión de 6 y 8 en β -CDs sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi*

Compuesto	Porcentaje de efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	Porcentaje de citotoxicidad en células de mamífero VERO®
6 - β-CDs (100 μM)	28,2 \pm 1,5	9,4 \pm 4,8
6 (100 μM)	24,0 \pm 1,5	16,5 \pm 6,5
8 - β-CDs (34 μM)	18,0 \pm 6,1	18,2 \pm 3,3
8 (34 μM)	30,4 \pm 3,8	23,4 \pm 3,4

En la tabla anterior, se observa que la actividad tripanocida del complejo de inclusión de 6 es mayor que el compuesto sin incluir, lo que se puede relacionar con la mayor solubilidad del compuesto. Moncada-Basualto. M, *et al*⁶⁵, estudiaron la actividad tripanocida de los complejos de inclusión de una serie 3-amido cumarinas sustituidas en 6-NH₃- β -CD, determinando que la actividad tripanocida de los complejos de inclusión era mayor que los compuestos sin incluir, ya que existe un aumento en la solubilidad del compuesto, así como también en la biodisponibilidad. Este estudio corrobora los resultados obtenidos para el compuesto 6. En el caso del compuesto 8, se observa que la actividad tripanocida disminuye cuando está formando el complejo de inclusión, causado posiblemente por la inclusión de la parte activa de la molécula en la ciclodextrina.

Los resultados del efecto citotóxico sobre células de mamífero determinaron que los complejos de inclusión disminuyeron su toxicidad con respecto a los compuestos libres, lo cual es corroborado por Lyra. M, *et al*¹⁰¹, quienes describieron que existe una dependencia entre la concentración del compuesto y los efectos citotóxicos, explicando así la baja citotoxicidad celular, debido a que al estar el compuesto incluido en la ciclodextrina existe una liberación controlada del mismo.

Otra estrategia utilizada para la búsqueda de nuevos tratamientos sobre enfermedades causadas por parásito protozoarios es la combinación de fármacos tradicionales con nuevos compuestos bioactivos para potenciar la actividad terapéutica y reducir los efectos adversos de los fármacos convencionales^{46,47}. Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas,

existe una alta proliferación de parásitos e inflamación tisular intensa, lo que agrava la generación de EROs y ERNs^{48,49}. Además, los fármacos convencionales BZN y NFX, al ser compuestos nitroheterocíclicos, también aumentan el estrés nitrosativo y oxidativo. Este ambiente oxidativo, asociado a la multiplicación intracelular de *T. cruzi*, conduce a la destrucción de los tejidos del hospedador, contribuyendo así a la etiopatogenia de la enfermedad.

En base a lo anterior, se estudió la combinación del fármaco convencional BZN con el compuesto 8 que es el más activo de la serie en estudio. Considerando que el mecanismo de acción tripanocida de BZN implica: i) la modificación covalente de macromoléculas mediante la formación de metabolitos citotóxicos como el glioxal; ii) el aumento de la fagocitosis de *T. cruzi* por las células huésped con la consecuente producción de citosinas y iii) la inhibición de NADH-fumarato reductasa en el parásito^{50,52}. Estos mecanismos también son responsables de los efectos adversos en el huésped. Por tanto, la posibilidad de reducir la dosis de BZN en combinación con el compuesto 8 sería una estrategia atractiva en la búsqueda del tratamiento de pacientes crónicos.

4.8. Determinación de la actividad tripanocida del compuesto 8 combinado con Benznidazol

Se evaluó el posible efecto sinérgico y antagónico de la combinación del compuesto 8 con la droga antichagásica convencional BZN. Para ello, se incubaron 10^7 tripomastigotes de *T. cruzi* durante 24 hr, en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de 5, 10, 20, 34, 50, 100 y 200 μM para el compuesto 8 y 5, 10, 20, 50, 100 y 200 μM para BZN. La determinación del efecto tripanocida de la combinación se realizó mediante la metodología de reducción del MTT y los efectos de combinación entre el compuesto 8 – BZN se analizaron mediante el software gratuito COMBENEFIT® seleccionando el enfoque estadístico de independencia de Bliss⁶⁹. En la figura 20, se muestra la combinación dosis-respuesta del compuesto 8 y BZN.

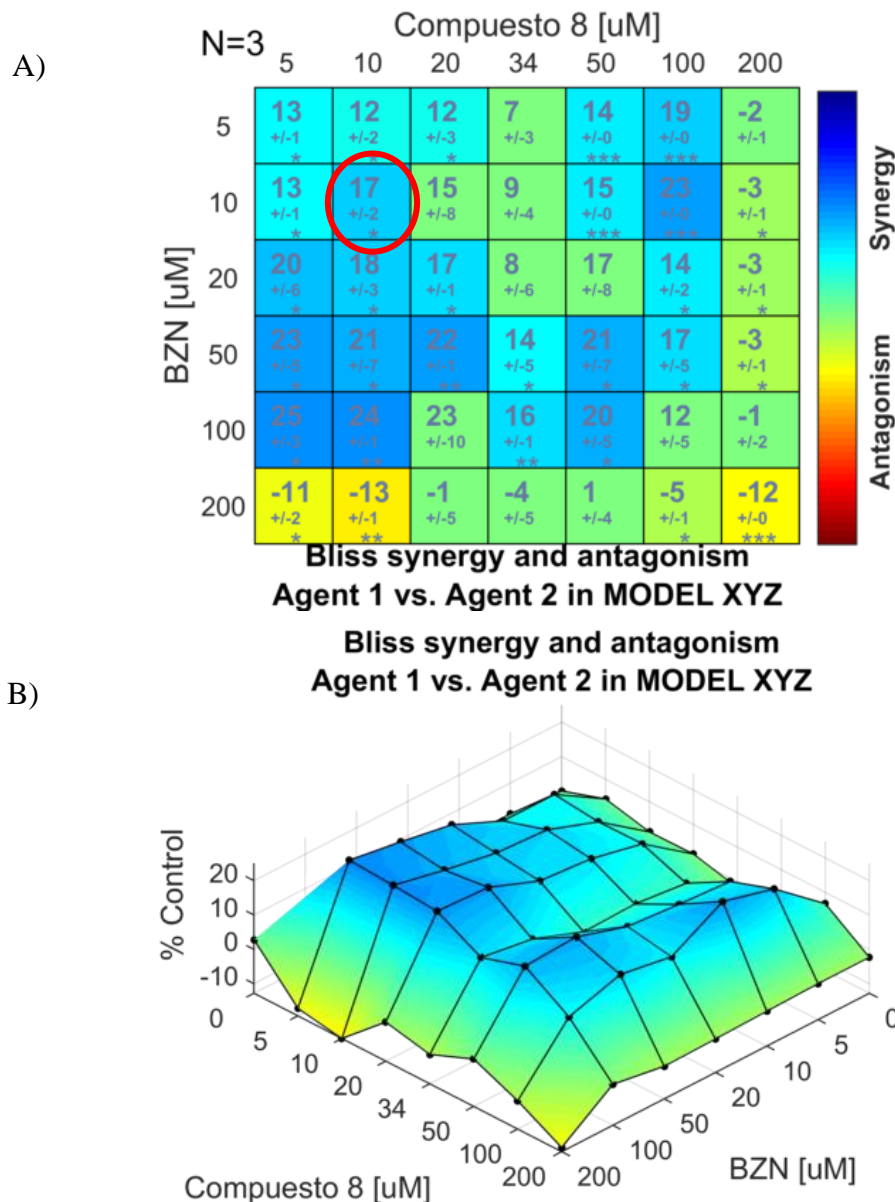


Figura 20. A) Matriz de combinación de los datos reales obtenidos para BZN y compuesto 8 utilizando el modelo independiente de Bliss y B) Mapa de calor de sinergia que muestra la sinergia para cada combinación. Las combinaciones con significación estadística ($*p \leq 0,05$) están coloreadas y los valores no significativos se muestra en verde. Datos expresados como la media de tres experimentos independientes.

Los mapas de calor de sinergia se obtuvieron comparando los datos registrados para cada punto de combinación, mostrando un efecto sinérgico a bajas concentraciones de compuesto 8 y altas concentraciones de BZN. Asimismo, se observó un efecto antagonista a altas concentraciones de BZN y compuesto 8. El valor del IC_{50} para el compuesto 8 es de $34 \mu M$ y para BZN $20 \mu M$. Por tanto, se determinó que la mejor combinación con un sinergismo

leve se obtiene para una concentración de 10 μM de ambos compuestos (círculo rojo), ya que la concentración IC_{50} de cada compuesto se redujo casi en un 50 %, siendo ideal para minimizar la dosis y los consiguientes efectos secundarios. Con lo cual, se corrobora lo propuesto por Fouquier. C, *et al*¹⁰², quienes postulan que las terapias combinadas generan una mayor eficacia, menor toxicidad y disminuye el desarrollo de resistencia a fármacos, en comparación con los agentes individuales.

La matriz dosis respuesta fue analizada mediante el modelo planteado por la Independencia de Bliss, basándonos en que el mecanismo de acción del compuesto 8 y el fármaco BZN son independientes de tal manera que no interfieren entre ellos¹⁰³⁻¹⁰⁶. Ya que, se conoce que un mecanismo de acción del fármaco BZN es mediante la generación de metabolitos electrofílicos tóxicos para el parásito, mientras que el compuesto 8 genera radicales libres produciendo estrés oxidativo en el parásito. En la tabla 13, se presenta los valores del efecto tripanocida de la mejor combinación comparado con las concentraciones de los compuestos por separado sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi*.

Tabla 13. Porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* y citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® de la combinación del compuesto 8 y BZN

	Concentración (μM)	% Efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	% Efecto citotóxico sobre células VERO®
Comp. 8	10	7 ± 1	4 ± 2
BZN	10	1 ± 1	1 ± 1
Comp. 8-BZN	10 : 10	23 ± 2	31 ± 8

Al evaluar los resultados, se observa que la actividad tripanocida de la mejor combinación (23 ± 2) es mayor con respecto a los compuestos 8 (7 ± 1) y BZN (1 ± 1) separados a la misma concentración. Por lo que, se puede postular que existe un sinergismo, ya que la actividad tripanocida aumentó 3,4 veces con respecto al compuesto 8 y 23 veces con respecto

a BZN. Asimismo, se evaluó la actividad citotóxica de la combinación sobre células de mamífero y se determinó que la toxicidad de la combinación (31 ± 8) aumentó con respecto al compuesto 8 (4 ± 2) y BZN (1 ± 1) a la misma concentración. Lo cual, podría atribuirse a que el compuesto 8 y BZN tienen mecanismos de acción diferentes, por lo que, la célula de mamífero podría agotar todos sus mecanismos de defensa, quedando vulnerable al daño generado, lo que no ocurre cuando se tiene los compuestos por separado.

En conclusión, se determinó que la combinación del compuesto 8 con BZN genera un aumento en la actividad tripanocida, al ser comparados con los compuestos por separado. Aunque esta actividad no fue como se esperaba idealmente, lo que podría estar relacionado con la baja solubilidad del compuesto 8 en medio acuoso o cambios estructurales mediados por pH o incluso enzimáticos. Es por ello, que se evaluó la misma combinación con la diferencia que se utilizó el complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CDs, ya que como se mencionó anteriormente la generación de complejos de inclusión mejoran la solubilidad y biodisponibilidad del compuesto incluido.

En la tabla 14, se observa los resultados de la actividad tripanocida sobre tripomastigotes de *T. cruzi* y la citotoxicidad en células VERO® de la combinación del complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CDs y BZN.

Tabla 14. Porcentaje del efecto tripanocida sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* y citotoxicidad sobre células de mamífero VERO® de la combinación del complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CDs y BZN

	Concentración (μ M)	% Efecto tripanocida sobre tripomastigote de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	% Efecto citotóxico sobre células VERO®
Comp. 8	10	7 ± 1	4 ± 2
BZN	10	1 ± 1	1 ± 1
β-CDs	10	-	-
8-β-CDs-BZN	10 : 10	25 ± 4	27 ± 6

La actividad tripanocida de la combinación del complejo de inclusión del compuesto 8 y BZN (25 ± 4) aumento con respecto a los compuestos sin combinar a la misma concentración, generando un sinergismo al estar combinados. A su vez, al comparar la actividad tripanocida del compuesto 8 con BZN (23 ± 2), se observa un aumento de la actividad cuando se combina el compuesto 8 incluido en la ciclodextrina con BZN. Lo cual, podría deberse a un aumento en la solubilidad y biodisponibilidad del compuesto 8 al estar incluido. Asimismo, la toxicidad disminuyó con respecto a la combinación del compuesto 8 y BZN sin incluir, aunque se mantuvo el patrón anterior de ser la combinación más toxica que los compuestos separados, lo cual se explicó anteriormente.

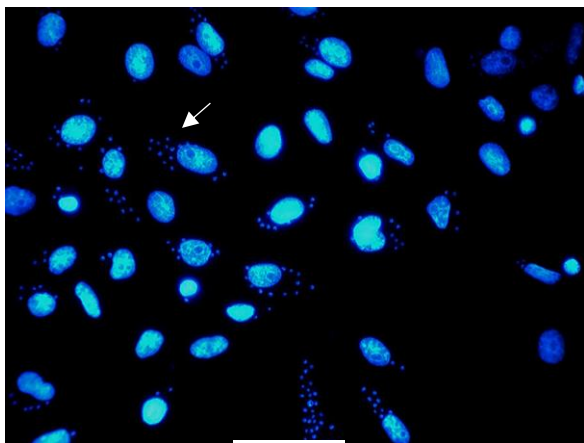
Cabe resaltar que no se evaluó las combinaciones con la inclusión de BZN en la ciclodextrina, ya que al tener una constante de inclusión baja ($k = 52 \pm 10$), puede ocurrir un desplazamiento por parte del compuesto 8 al BZN incluido, generando la inclusión del compuesto 8.

Todos los ensayos realizados para determinar la actividad tripanocida se han probado sobre la forma extracelular sanguínea del parásito. Asimismo, los fármacos convencionales son efectivos sobre la fase aguda de la enfermedad, pero esta se ve disminuida en la fase crónica. Por lo cual, es necesario evaluar la actividad del compuesto 8, su complejo de inclusión y la combinación de ellos con BZN sobre las formas intracelular (amastigote) de *T. cruzi*⁸.

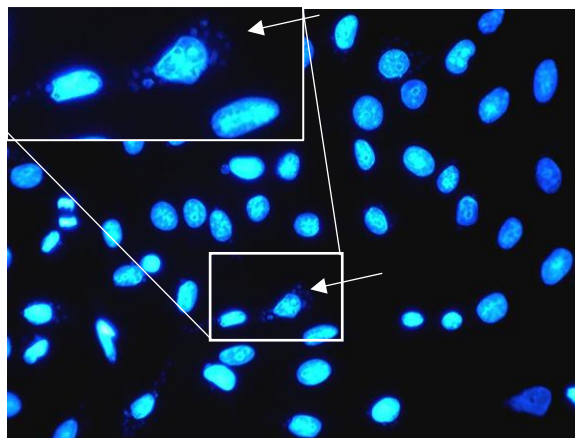
4.9. Determinación de la actividad tripanocida sobre la forma intracelular (amastigote) de *T. cruzi* del compuesto 8, complejo de inclusión en β -CDs y la combinación con BZN

Para la determinación de la actividad tripanocida sobre la forma intracelular (amastigote), se sembraron 5×10^4 células VERO® en placa de 24 pocillos que luego fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* a relación célula:parásito de 1:3. Luego, de 24 hrs post-infección, las células fueron lavadas e incubadas en presencia y ausencia del compuesto 8, su complejo de inclusión y BZN a la concentración del IC₅₀. Asimismo, se evaluó la mejor combinación del BZN. Posterior a las 24 hrs post-tratamiento, se realizó el ensayo de tinción DAPI, que permite diferenciar los núcleos de los amastigotes intracelulares de los núcleos de las células

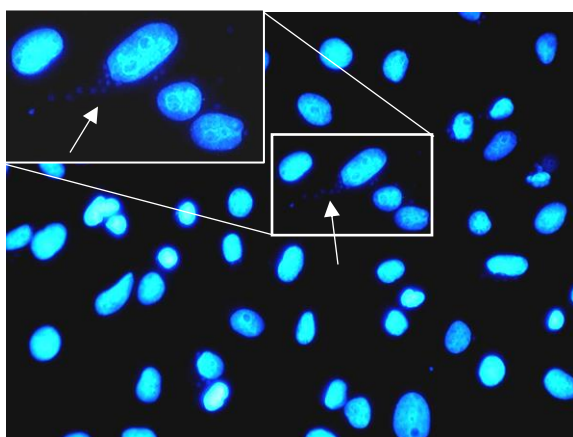
VERO®, para determinar la cantidad de células infectadas y el número de amastigotes por células. La figura 21, muestra las imágenes de las actividades tripanocidas sobre la forma intracelular de *T. cruzi*, generadas por el compuesto libre 8, incluido en la β -CDs (8- β -CDs) y en combinación con BZN, obtenidas por microscopía epifluorescente.



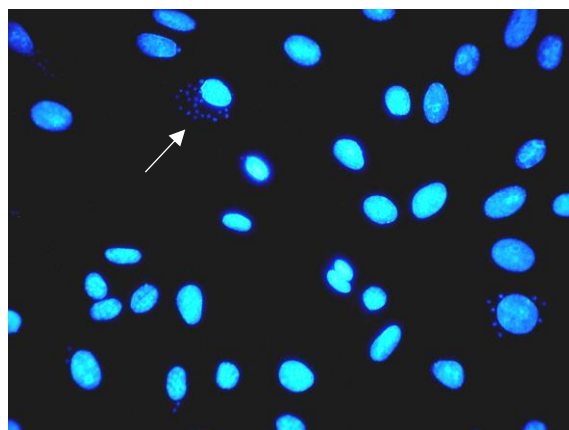
(A)



(D)



(B)



(E)

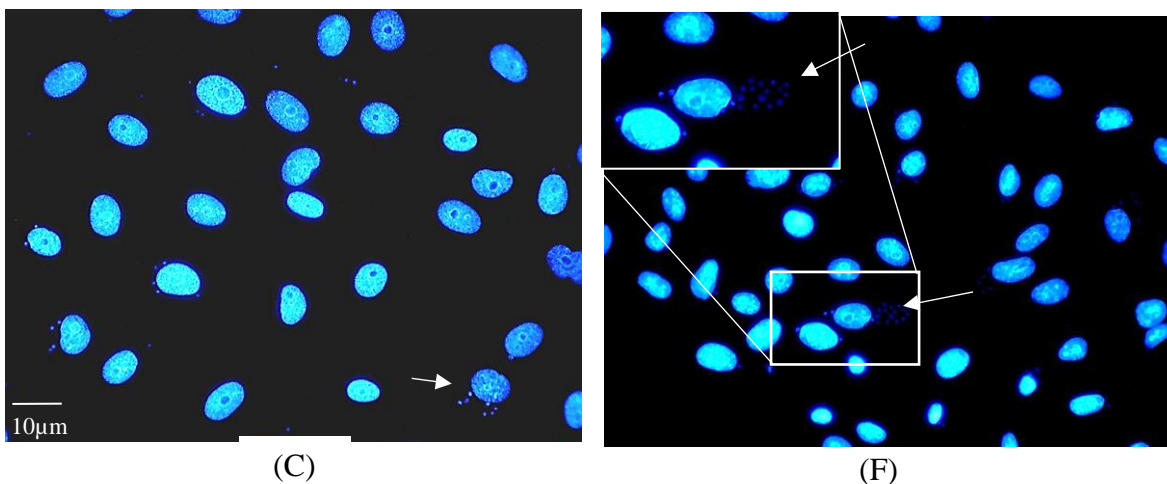


Figura 21. Efecto tripanocida intracelular sobre la forma amastigote de *T. cruzi*. Las células vero se expusieron a una proporción de 1:3 durante 24 hrs, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y las células se expusieron a los compuestos a concentración IC₅₀, y la concentración de la mejor combinación, durante 24 hrs. Cada imagen es representativa de A) células Vero infectadas (control), B) BZN, C) compuesto 8, D) 8-β-CDs, E) 8-BZN y F) 8-β-CDs-BZN. Se analizaron 300 células por condición, con una barra de aumento de 10 μm

En la tabla 15, se presenta los porcentajes de células infectadas y amastigotes por célula luego de ser tratados con el compuesto 8 y BZN solos, combinados y en complejo de inclusión con β-CDs.

Tabla 15. Determinación del efecto tripanocida y citotóxico del compuesto 8, BZN, complejo de inclusión y combinación con BZN sobre la forma intracelular amastigote de *T. cruzi*

Compuesto	Conc. (μM)	% células no infectadas	% células infectadas	Parásito/Célula
Control	-	63 ± 7	40 ± 7	8 ± 2
Benznidazol	20	73 ± 5	30 ± 9	4 ± 1
Compuesto 8	34	54 ± 7	51 ± 6	3 ± 1
8-β-CDs	34	62 ± 5	40 ± 4	6 ± 1
8-BZN	10:10	77 ± 9	23 ± 6	5 ± 2
8-β-CDs-BZN	10:10	80 ± 5	26 ± 8	4 ± 1

Los resultados determinaron que la combinación del compuesto 8 con BZN conduce a un mayor efecto sobre la infección de células VERO, con respecto al compuesto 8 y BZN solos, ya que se observa una disminución en el porcentaje de células infectadas, pero un leve aumento en el número de parásitos por célula. Asimismo, se observó que el complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CDs, disminuyó el porcentaje de células infectadas en comparación con el compuesto libre, lo cual puede atribuirse al aumento de la disponibilidad del compuesto.

Para la combinación de BZN con el complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CDs, se observó una disminución del porcentaje de las células infectadas similar a la determinada para la combinación de 8 sin incluir, evidenciando que no hay diferencia relevante entre ambas combinaciones, atribuible al aumento de la biodisponibilidad del compuesto 8, ya que no hay un aumento de la biodisponibilidad del BZN, lo que parece ejercer un efecto mayor sobre la infección de las células VERO, ya que presenta valores similares a la droga *per se*.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la prueba considera el número de células infectadas y el número de parásitos por célula, y no la actividad de los compuestos sobre la forma intracelular amastigote. Por lo tanto, esta prueba solo involucra la tasa de infectividad en células de mamífero después del tratamiento con el compuesto.

En conclusión, todos los compuestos muestran un efecto tripanocida a las concentraciones IC_{50} . Además, la combinación presenta actividad tripanocida a una concentración inferior a los compuestos libres. Por lo que, la terapia combinada se vuelve muy importante para reducir la dosis de fármacos tradicionales para el tratamiento de la enfermedad⁸⁴.

En base a lo anterior, se realizó un estudio de la actividad tripanocida a las 96 hrs de tratamiento, para evaluar el efecto sobre la replicación de la forma intracelular (amastigote) y su diferenciación a la forma tripomastigote, en presencia de los compuestos y la combinación de 8 y BZN, con o sin inclusión en β -CDs.

4.10. Determinación del efecto tripanocida posterior a las 96 hrs de tratamiento con los compuestos 8, BZN, complejo de inclusión en ciclodextrina y combinaciones

Para la determinación de la actividad tripanocida posterior a las 96 hrs de tratamiento con los compuestos, complejo de inclusión y combinaciones sobre la forma intracelular amastigote de *T. cruzi*, se registró la carga de ADN del parásito mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). El protocolo fue el mismo utilizado para el estudio del efecto tripanocida intracelular, con la diferencia de que a las 96 hrs se retiró el sobrenadante y se centrifugó a la velocidad de precipitación de la forma tripomastigote de *T. cruzi*, para extracción del ADN parasitario y posterior cuantificación por qPCR¹⁰⁷, ya que se espera que a este tiempo toda la forma intracelular amastigote se diferenció a la forma tripomastigote¹⁰⁸.

En la tabla 16, se muestra el número de parásitos que lograron replicar, diferenciar y lisar las células, posterior a las 96 hrs de tratamiento, con los compuestos 8, BZN, complejo de inclusión y combinaciones. Asimismo, en la figura 22 se muestra las concentraciones relativas de tripomastigotes que lograron lisar la célula y estar en el medio de cultivo.

Tabla 16. Determinación de la actividad tripanocida posterior a las 96 hrs de tratamiento

Compuesto	Conc. (μM)	N° parásitos del sobrenadante posterior a las 96 hrs de tratamiento
Control	-	157960 \pm 1378
BZN	20	750 \pm 45
8	34	50593 \pm 2144
8-β-CDs	34	150458 \pm 1501
8-BZN	10:10	28999 \pm 9700
8-β-CDs-BZN	10:10	14559 \pm 635

Efecto tripanocida post 96 hrs de tratamiento

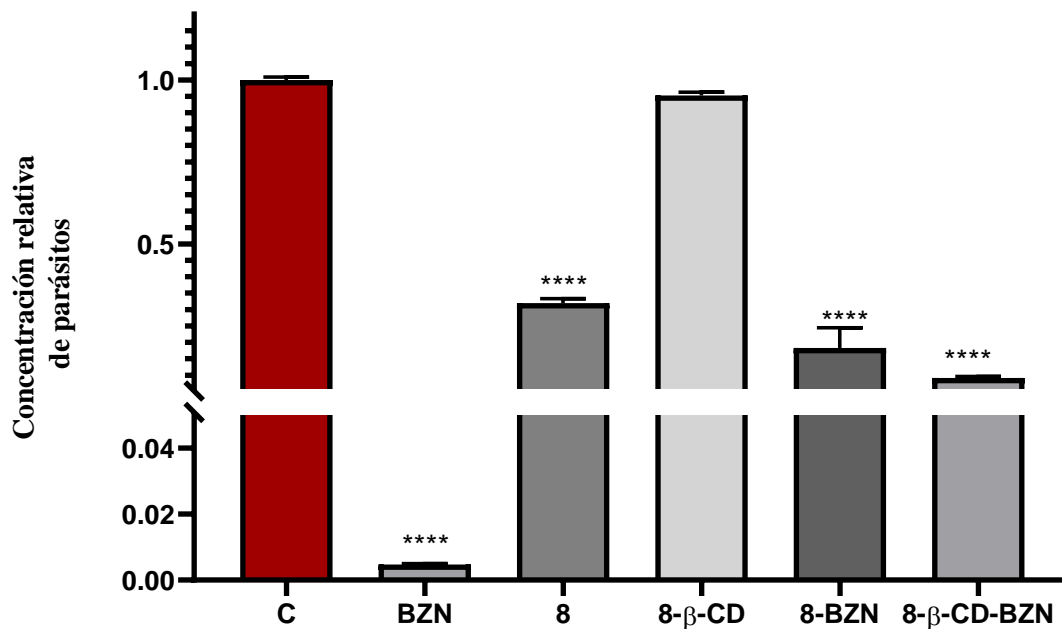


Figura 22. Determinación de la concentración relativa de parásitos posterior a las 96 hrs de tratamiento con: BZN, compuesto 8, 8-β-CDs, 8-BZN y 8-β-CDs-BZN. Diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA una sola vía con post-prueba de Dunnett; (****: $p < 0,01$)

Los resultados obtenidos muestran que el BZN es el compuesto que presentó menor número de parásitos (750 ± 45), corroborando el resultado obtenido en el estudio de la actividad tripanocida intracelular. Esto podría explicarse por el daño de BZN a los amastigotes, lo que impide la replicación y posterior diferenciación a tripomastigote.

Para la combinación del compuesto 8 y el complejo de inclusión en β-CDs con BZN se observó que el número de parásitos que lograron diferenciarse es menor con respecto a los compuesto 8 y BZN solos, corroborando los datos anteriores, ya que se mantiene el mismo patrón identificado en el estudio del efecto tripanocida intracelular.

Como se informó anteriormente, un posible mecanismo de acción del compuesto 8 es la generación del estrés oxidativo en el parásito. Lo cual, podría estar relacionado con la inhibición de la enzima GAPDH, una proteína esencial de la vía glucolítica de los tripanosomátidos (enzimático). También, produciría un déficit en el mecanismo antioxidante

(no enzimático)^{29,109}. En base a lo anterior, es interesante conocer cómo afecta la generación de especies radicalarias en el parásito cuando se tiene el complejo de inclusión del compuesto 8 en β -CD, la combinación de 8 y el complejo de inclusión con BZN sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi*.

Para ello, se utilizó el procedimiento planteado anteriormente en la determinación de especies radicalarias en medio parasitario mediante la resonancia de espín electrónico (REE), utilizando DMPO como atrapador de espín.

En la figura 23, se observa los patrones de acoplamiento hiperfino. En donde, el compuesto 8, el complejo de inclusión (8- β -CD) y en combinación con BZN, mostró el mismo patrón hiperfino, mientras que BZN no mostró ningún patrón.

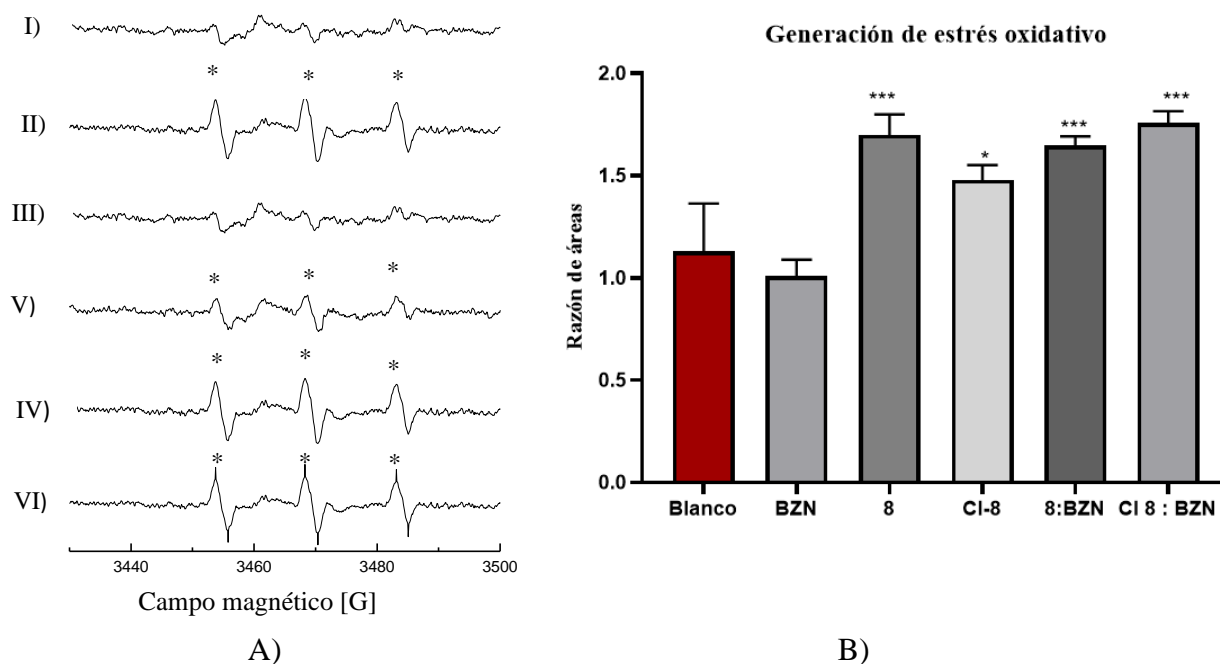


Figura 23. A) Espectros REE de los espín aductos generados a temperatura ambiente sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi*. I) Espectro registrado del control, II) Espectro registrado para el compuesto 8, III) Espectro registrado para BZN, IV) Espectro registrado para 8-BZN, V) Espectro registrado del compuesto 8- β -CDs y VI) Espectro registrado para la combinación de 8- β -CDs-BZN. El patrón hiperfino del DMPOX está representado por (*). B) Determinación de la relación de áreas de los compuestos comparados con el blanco. Diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA una sola vía con post-prueba de Dunnett; (***) $p < 0,01$)

Los patrones hiperfinos representan la generación de una señal triplete fuerte con constantes de acoplamiento hiperfinas ($a_N \sim 14,62$ G), correspondiente al compuesto paramagnético DMPOX, generado por la oxidación del aducto DMPO-OH (Figura 15). El cálculo de relación de áreas, en comparación con el blanco, permite determinar que los compuestos 8 y 8- β -CDs tienen relaciones de área, como las respectivas combinaciones; lo cual, indica que hay la generación de radicales en el parásito. Por otro lado, BZN por sí solo no mostró ninguna variación, lo que puede indicar que actúa mediante un mecanismo de acción diferente.

Por otra parte, se conoce que las mitocondrias del parásito de *T. cruzi* utilizan sustratos oxidables para producir un gradiente de protones electroquímico a través de la membrana mitocondrial para producir ATP (Adenosin trifosfato). Por tanto, sería muy interesante evaluar si los compuestos pueden afectar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).

El parásito tiene una sola mitocondria, que es esencial para la supervivencia del parásito, y regula el balance energético y la apoptosis⁶⁵. El metabolismo mitocondrial se ha evaluado variando el potencial de membrana mitocondrial. Para ello, se utilizó la sonda fluorescente de éster metílico de tetrametilrodamina (TMRE) como indicador de la variación del potencial. En la figura 24, se observa los resultados obtenidos sobre el potencial de membrana mitocondrial del parásito generado por el compuesto 8, complejo de inclusión y sus respectivas combinaciones con BZN.

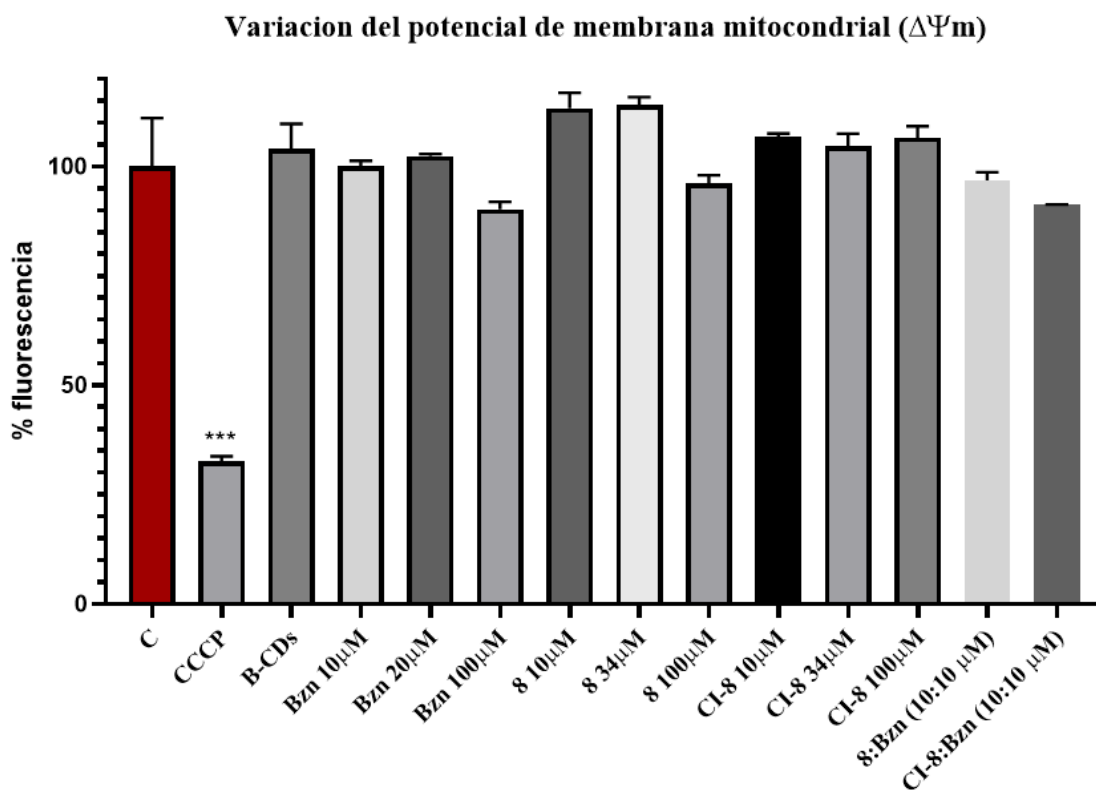


Figura 24. Porcentaje de incorporación de la sonda fluorescente TMRE por la variación del potencial de membrana mitocondrial sobre tripomastigote de *T. cruzi*. Diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA una sola vía con post-prueba de Dunnett; (***) : $p < 0,01$)

Los resultados muestran que el compuesto 8, 8- β -CDs y sus combinaciones respectivas con BZN, no presentan variaciones sobre el potencial de membrana mitocondrial. De manera similar, el BZN no tuvo efecto sobre el potencial de membrana, corroborando datos previos⁴⁹. El agente de desacoplamiento carbonilcianuro-3-clorfenilhidrazona (CCCP) se utilizó como control positivo. En base a los resultados anteriores, se postula que el mecanismo de acción del compuesto 8 no afecta el potencial de membrana mitocondrial del parásito, por lo que puede asociarse con la generación de estrés oxidativo en *T. cruzi*, como se demostró previamente.

4.11. Discusión general

Se determinó que la presencia del grupo catecol en la serie 3-aryl cumarinas, modulan la actividad tripanocida, ya que no presentaron capacidad antioxidante medido mediante el índice ORAC-FL y el estudio de los índices de Fukui radicalario.

En cuanto a la actividad tripanocida, se observó que la presencia del grupo catecol en el esqueleto base de la cumarina aumenta la actividad tripanocida. Asimismo, la presencia de un halógeno en posición *meta* del sustituyente arilo en posición 3 incrementa aún más dicha actividad. Por lo que el mecanismo de acción podría ser la generación de estrés oxidativo en *T. cruzi*. Por ende, una estrategia para el diseño de cumarinas nuevas con mayor actividad tripanocida sería interesante mantener el grupo catecol en diferentes posiciones del andamio cumarínico, ya que pueden modular la actividad tripanocida al generar el estrés oxidativo. Además, modificar la posición y el tipo de halógeno (cloro o flúor) puede disminuir la citotoxicidad y aumentar la actividad tripanocida. También, los sustituyentes que presenten características de captación de electrones pueden ser una alternativa a estudiar.

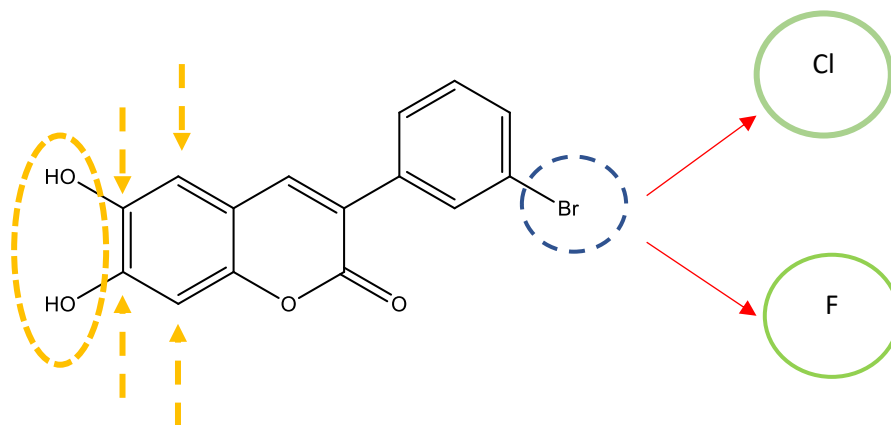


Figura 25. Diseño de nuevas cumarinas con potencial actividad tripanocida, basados en los resultados obtenidos

Por otro lado, la formación de complejos disminuyó la actividad tripanocida del compuesto 8, ya que podría estar incluida la parte activa de la molécula en el interior de la ciclodextrina. A su vez, aumento el porcentaje de compuesto retenido en la membrana artificial, debido a un aumento de la biodisponibilidad del compuesto.

En la combinación de fármacos, se observó que el compuesto 8 y el complejo de inclusión con ciclodextrina combinados con BZN, aumentó la actividad tripanocida con respecto a los compuestos solos, lo cual demostraría ser una estrategia interesante para la reducción de la dosis de los fármacos convencionales para tratar la enfermedad de Chagas.

5. CONCLUSIONES

- Se determinó que la serie 3-aril cumarinas poseen actividad tripanocida moderada sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi*, modulada por el grupo catecol, postulándose que el mecanismo de acción tripanocida para el compuesto más activo es a través de la generación de estrés oxidativo. En donde, participarían de enzimas esenciales para la supervivencia del parásito.
- Se determinó la capacidad antioxidante de la serie 3-aril cumarinas. En donde, el grupo catecol no es determinante en la capacidad antioxidante, lo cual se evidenció mediante la determinación del índice ORAC-FL y se confirmó a través del índice de Fukui radicalario.
- La formación de los complejos de inclusión del compuesto 8 aumentó la solubilidad de los compuestos, mejorando su biodisponibilidad con respecto al compuesto sin incluir. Siendo, una alternativa prometedora para la inclusión de compuestos tripanocidas potenciales limitados por la solubilidad y para la administración de fármacos anti-chagásicos.
- Se determinó que el compuesto más activo de la serie presentó actividad tripanocida cuando está libre y en combinación con BZN sobre la forma intracelular del parásito y posterior a 96 hrs de tratamiento, impidiendo la diferenciación de la forma amastigote a tripomastigote y posterior lisis celular. Lo cual, se evidenció mediante microscopía fluorescente y PCR en tiempo real.
- La combinación del compuesto 8 con BZN resultó ser una estrategia adecuada para mejorar la efectividad del tratamiento y reducir la dosis de BZN que presentan efectos secundarios graves para el paciente.

6. ANEXO

6.1. Análisis de docking molecular de la nueva serie de cumarinas

Otro posible mecanismo de acción anti-*T. cruzi* que se ha postulado tanto de los compuestos polifenólicos como de la cumarina es la inhibición de las enzimas Arginina Quinasa (AK) y Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (gGAPDH) de *T. cruzi*. Ambas enzimas participan en el almacenamiento de energía mediante la transformación de ADP (adenosín difosfato) a ATP (adenosín trifosfato), además su expresión podría participar en la velocidad de replicación y disponibilidad de nutrientes en el parásito, por lo que serían interesantes blancos de estudio^{30,110}.

Con la finalidad de determinar una posible estructura que genere una actividad inhibitoria enzimática, se ha propuesto estudios de estructura – actividad, dentro de las cuales se encuentra el Docking Molecular, que se basa en la predicción de la conformación preferida de un compuesto para interactuar con: enzimas, proteínas, entre otros; logrando así establecer una estructura como potencial candidato para ser evaluado experimentalmente. Es así como, Wu. Q, *et al*²⁶, determinaron que el polifenol glicosilado rutina, tiene la característica de ser un inhibidor no competitivo de la AK, manteniendo interacciones hidrófobas con el sitio activo de la enzima. Asimismo, Valera. A, *et al*²⁷, evaluaron un grupo de compuestos polifenólicos como inhibidores potenciales de la AK, encontrando que el resveratrol fue el que presentó una baja energía de enlace con el sitio activo de la enzima $-6,96 \text{ kcal.mol}^{-1}$; así también, una alta constante de inhibición $7,93 \mu\text{M}$. Además, determinaron que las interacciones del resveratrol con el sitio activo estaban mediadas por interacciones hidrófobas. Por otra parte, Freitas. R, *et al*²⁹, determinaron que el flavonoide glicosilado tirosile presentó actividad inhibitoria de la enzima gGAPDH con un IC_{50} $46 \mu\text{M}$. Asimismo, Pavao. F, *et al*³⁰, evaluaron la inhibición de la enzima gGAPDH de *T. cruzi* por un derivado de cumarina llamado chalepina, compuesto extraído de *Policarpus spicatus*; en donde, determinaron una actividad inhibitoria enzimática de IC_{50} $64\mu\text{M}$.

Con la finalidad de racionalizar los compuestos en estudio se realizó un análisis de acoplamiento molecular (Tabla 17). Se utilizaron las enzimas AK *T. cruzi* (PDB ID: 2J1Q)¹¹¹

y *gGAPDH T. cruzi* (PDB ID: 1K3T)³⁰ como objetivos de estudio. El software AutoDock 4.0 se utilizó para calcular las posibles conformaciones de los sustratos que se unen a AK y *gGAPDH T. cruzi*. El acoplamiento molecular se realizó utilizando puntos de cuadrícula 60 x 60 x 60 con un espacio predeterminado de 0,375 Å. La cuadrícula se posicionó para incluir en el sitio de unión al ligando completo en la parte central de la subunidad para permitir un muestreo alrededor de los residuos importantes de cada enzima¹¹². En la tabla 17, se observa los valores de energía de enlace calculados entre cada compuesto con la enzima AK y *gGAPDH*.

Tabla 17. Energías de unión de los compuestos con las enzimas AK y *gGAPDH*

Compuesto	AK kcal.mol ⁻¹	GAPDH kcal.mol ⁻¹
1	-6,98	-6,97
2	-7,19	-7,05
3	-6,84	-7,04
4	-6,93	-7,32
5	-7,68	-6,36
6	-7,95	-6,81
7	-7,93	-7,24
8	-8,09	-7,15
9	-8,07	-6,64
10	-7,08	-6,12
11	-7,18	-6,21

En base a los resultados obtenidos en la tabla 17, se determinó que las energías de enlace de los 11 compuestos sobre las dos enzimas no tienen gran variación, ya que las estructuras de los compuestos son bastantes similares. Por lo que, es difícil poder realizar una primera discriminación de los compuestos que mejor interactúan con el sitio activo de las enzimas. Por otra parte, trabajar únicamente con las energías de enlace podrían conllevar a cometer errores, ya que no se estaría tomando en cuenta las interacciones y distancias respectivas entre el compuesto y los principales residuos del sitio activo de la enzima. Por lo que, para corroborar el resultado de la energía de enlace es necesario realizar el análisis de las

principales interacciones que tienen los compuestos con el sitio activo de la enzima. Estas interacciones pueden ser: puente de hidrógeno, Van der Waals, hidrófobas, interacciones halógenas, etc.

6.1.1. Acoplamiento molecular e identificación de las principales interacciones de la serie 3-aril cumarinas sustituidas con AK de *T. cruzi*

Estudios realizados por Zhou. G, *et al*¹¹³, indicaron la estructura de la enzima AK y las interacciones con el cofactor ADP y el sustrato arginina en el estado de transición. Así se determinó que el cofactor ADP interactúa mediante puente de hidrógeno con los residuos Arg 124, Arg 126, Arg 280, Arg 309, Glu 314. Para el sustrato de arginina existen dos interacciones que se encuentran localizadas en los grupos externos del compuesto: guanidino y carboxilato. Para el extremo guanidino hay interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Cys 271, Glu 225, Glu 314 y los residuos Arg 229 y Arg 309 que están mediadas por el cofactor ADP. Mientras, que para el extremo carboxílico son: Ser 63, Gly 64, Val 65, Gly 66, Ile 67, Tyr 68. A partir de estos resultados, se decidió evaluar las interacciones de cada uno de los compuestos con los residuos principales del sitio activo de la AK. En la tabla 18, se presenta el número de interacciones de cada compuesto con los principales residuos del sitio activo.

Tabla 18. Interacciones de la serie de cumarinas sustituidas con los residuos de aminoácidos principales de la AK

Compuesto	SA	SA Guanidino Arginina						SA Carboxílico Arginina					N° interacciones
	ADP	Cys	Glu	Glu	Arg	Arg	Ser	Gly	Val	Gly	Ile	Tyr	
	Arg 126	271	225	314	229	309	63	64	65	66	67	68	
1	3,723	2,201 1,941			2,006		3,549	2,779		3,025		3,478	7
2	3,009	1,994			2,168		2,33			2,129		4,309	6
3	3,067	2,068			2,089		2,472	2,447		2,569		3,891	7
4	4,09	2,177			2,042		3,607	4,34		3,31		4,524	7
5	3,67	2,186			2,167		3,25			2,244		3,637	6
6	3,076	2,178			1,933					2,017		4,276	5
7	3,651	2,172			1,961		3,464			2,27		4,401	6
8	3,401	2,185			2,191		3,414	2,878		2,342		3,021	7
9	3,184	2,167			2,03		3,037	2,807		2,761		3,146	7
10	3,191	2,171			2,041					2,21		4,24	5
11	3,766	2,171			2,174					2,857		4,023	5

*Los valores en rojo indican las interacciones mediante puente de hidrogeno entre el compuesto y el residuo de aminoácido

Se determinó que el número mayor de interacciones entre los compuestos y los residuos de la enzima es 7, y el más bajo es 5. Además, se observa que todas las moléculas estudiadas interactúan con los residuos de aminoácidos requeridos por el sustrato natural de la enzima, por lo que estos compuestos podrían ser inhibidores de la interacción de la arginina con la enzima AK. En la figura 26, se presenta al compuesto 8 con 7 interacciones y el compuesto 6 con 5 interacciones.

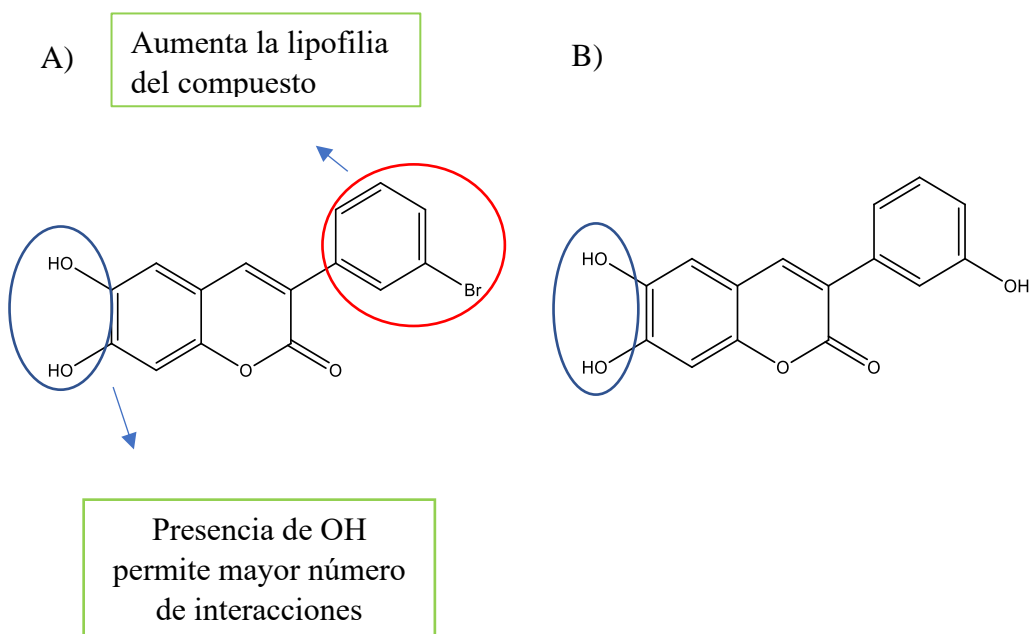


Figura 26. Análisis estructural de los compuestos A) 8 y B) 6

El análisis estructural indicó que para la molécula 8 con 7 interacciones, la presencia de un grupo catecol como sustituyente en el esqueleto base de la cumarina le permite generar interacciones de puente de hidrógeno. Además, la presencia de sustituyentes como el bromo en el anillo, le otorga mayor lipofilia en comparación con el compuesto 6, de tal manera que logra interactuar hidrofólicamente y mediante puentes de halógeno con otros residuos importantes de la enzima. Contrario a lo determinado para el compuesto 6, que presenta un grupo hidroxilo como sustituyente en posición *meta* en el anillo, disminuyendo la lipofilia, y por lo tanto el número de interacciones. En la tabla 19, se presenta la lipofilia y los ángulos de torsión tanto al vacío como al interactuar con la enzima para los dos compuestos.

Tabla 19. Análisis de los compuestos 8 y 6

Compuesto	N° interacciones	Log P	Ángulo de torsión	
			Vacío	Interacción
8	7	3,4	145.9°	142.9°
6	5	2,2	145.4°	102.4°

En base a los valores anteriores, se corrobora el análisis estructural, ya que la presencia del bromo aumenta la lipofilia en el compuesto 8, mientras que en el compuesto 6 el grupo hidroxilo en el arilo disminuye la misma. Asimismo, el ángulo de torsión del compuesto 8 no varía en la interacción con respecto al vacío. En cambio, en el compuesto 6, el sustituyente arilo se coloca en forma perpendicular a la base de la cumarina, variando su ángulo de torsión. Lo cual, podría deberse por el sustituyente hidroxilo en posición *meta*, ya que interactúa mediante puentes de hidrógeno con otros residuos no importantes del sitio activo de la enzima (Figura 28). En la figura 27, se indica los átomos seleccionados para determinar el ángulo de torsión.

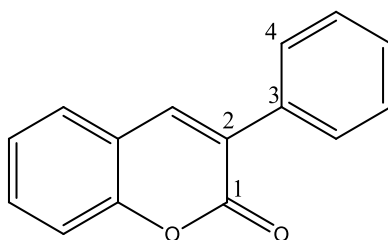


Figura 27. Ángulo de torsión analizado en las estructuras de las cumarina sustituidas

La figura 28, presenta las interacciones de los dos compuestos con la enzima AK.

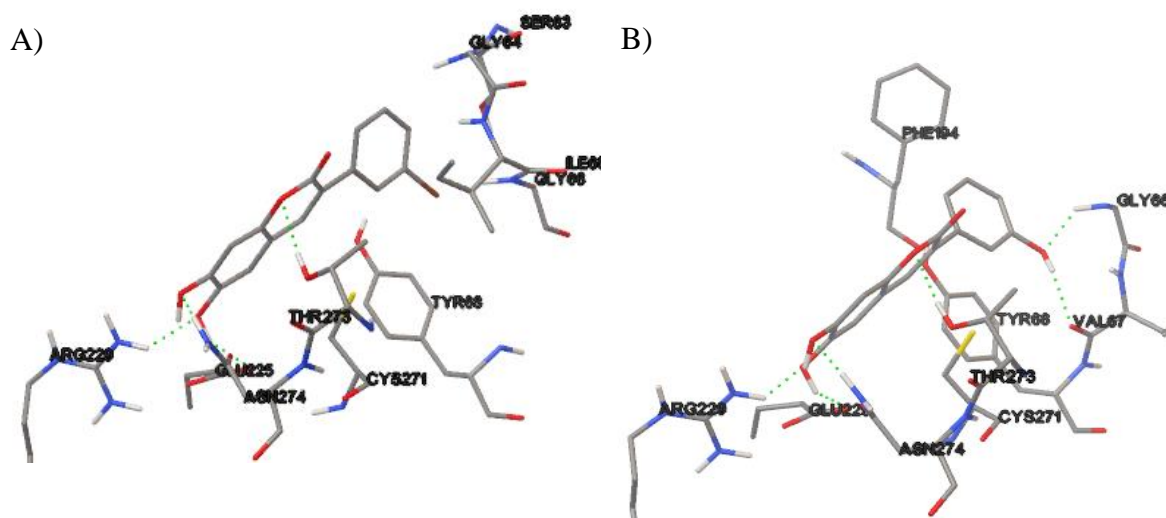


Figura 28. Interacción con el sitio activo de la enzima AK: A) compuesto 8 y B) compuesto 6

Culminado el análisis estructural, y con el fin de determinar los compuestos candidatos a inhibidores enzimáticos, se realizó un primer filtro, en donde aquellas moléculas que tengan más de 5 interacciones cumplieran con el requisito. En la tabla 20, se presenta los compuestos que pasaron el primer filtro.

Tabla 20. Análisis de las distancias de interacción de los compuestos con la enzima AK

Compuesto	SA Guanidino			SA Carboxílico Arginina				Distancia de la interacción
	Arginina			Ser	Gly	Gly	Tyr	
	Cys	Glu	Arg					
271	225	229	63	64	66	68		
1	3,723	2,201 1,941	2,006	3,549	2,779	3,025	3,478	4
2	3,009	1,994	2,168	2,33		2,129	4,309	4
3	3,067	2,068	2,089	2,472	2,447	2,569	3,891	6
4	4,09	2,177	2,042	3,067	4,34	3,31	4,524	2
5	3,67	2,186	2,167	3,25		2,244	3,637	3
7	3,651	2,172	1,961	3,464		2,27	4,401	3
8	3,401	2,185	2,191	3,414	2,878	2,342	3,021	4
9	3,184	2,167	2,03	3,037	2,807	2,761	3,146	5

*Los valores en rojo indican las interacciones mediante puente de hidrógeno entre el compuesto y el residuo de aminoácido

Posterior al primer filtro, se realizó un segundo filtro en el que se consideraron las distancias de interacción entre los residuos de la enzima y los compuestos en estudio, en donde, los compuestos que presenten número de interacciones menos a 5, no cumplieran con el requisito. En la tabla 21, se presenta los compuestos que superaron el filtro.

Tabla 21. Compuestos derivados de cumarina con las mejores interacciones con la AK

Compuesto	SA Guanidino Arginina			SA Carboxílico Arginina			
	Cys	Glu	Arg	Ser	Gly	Gly	Tyr
	271	225	229	63	64	66	68
3	3.067	2.068	2.089	2.472	2.447	2.569	3.891
9	3.184	2.167	2.03	3.037	2.807	2.761	3.146

Los compuestos que pasaron el último filtro presentan interacciones tipo puente de hidrógeno, con el residuo guanidínico del sustrato arginina, mientras que el residuo carboxílico tiene interacciones hidrófobas. Debido a que, la enzima presenta dos características: su parte interna es hidrofílica y su parte externa hidrofóbica; lo que explica el número de interacciones por puente de hidrógeno. Por lo tanto, los compuestos descritos en la tabla 21 podrían ser candidatos potenciales para inhibir la enzima AK.

6.1.2. Acoplamiento molecular e identificación de las interacciones con la gGAPDH *T. cruzi*

Estudios realizados por Souza. D, *et al*¹, indicaron la estructura de la enzima gGAPDH *T. cruzi* y como interactúa con el cofactor NAD⁺. Los resultados mostraron que la enzima tiene un sitio activo compuesto por los residuos Cys 166, His 194, Asn 335, Val 255. Además, tiene un bolsillo hidrofóbico de aproximadamente 9 Å caracterizado por los residuos Met 38, Val 205 y Asp 39. Asimismo, encontraron que el residuo Arg 249 forma un puente salino con el residuo Asp 210, lo cual le permite tomar una conformación y activar la reacción del sustrato G₃P. en cuanto, a la interacción con el NAD⁺ observaron que principalmente interactúa con los residuos catalíticos Cys 166 e His 194. A su vez, para que exista la interacción del cofactor con la enzima el residuo Cys 166 tiene una interacción de tipo Van der Waals con Asn 335, esta interacción le permite interactuar mediante puente de hidrógeno con el residuo Val 255, de tal manera que la Asn 335 toma una disposición en la cual el grupo amino terminal del residuo puede interactuar mediante puente de hidrógeno con el cofactor NAD⁺ y permitir la reacción. En base a lo anterior, se decidió evaluar el número de interacciones de cada compuesto con los residuos principales del sitio activo de la gGAPDH.

En la tabla 22 se presenta, el número de interacciones de cada compuesto con los principales residuos del sitio activo.

Tabla 22. Interacciones de la serie de cumarinas sustituidas con los residuos de aminoácidos principales de la gGAPDH

Compuesto	SA NAD			SA G3P			Bolsillo hidrófobo			N° Interacciones
	Cys 166	His 194	Asn 335	Val 255	Arg 249	Asp 210	Met 38	Val 205	Asp 39	
1	3,158	1,852	2,026							3
2	3,068	1,667								2
3	3,026	1,691	1,753							3
4	3,462		1,926							2
5	3,297		1,968							2
6	3,369		1,954							2
7	3,236		1,961							2
8	3,426		2,073							2
9	3,401		2,233							2
10	3,329		1,881							2
11	3,474		1,763							2

Se observa, que el número mayor de interacciones entre los compuestos y los residuos de la enzima es 3, y el más bajo es 2. Además, todas las moléculas interactúan con los residuos de aminoácidos requeridos por el cofactor NAD⁺. Estas interacciones podrían indicar una posible inhibición de la enzima impidiendo la reacción. En la figura 29, se presenta al compuesto 3 y 6 con 3 y 2 interacciones, respectivamente.

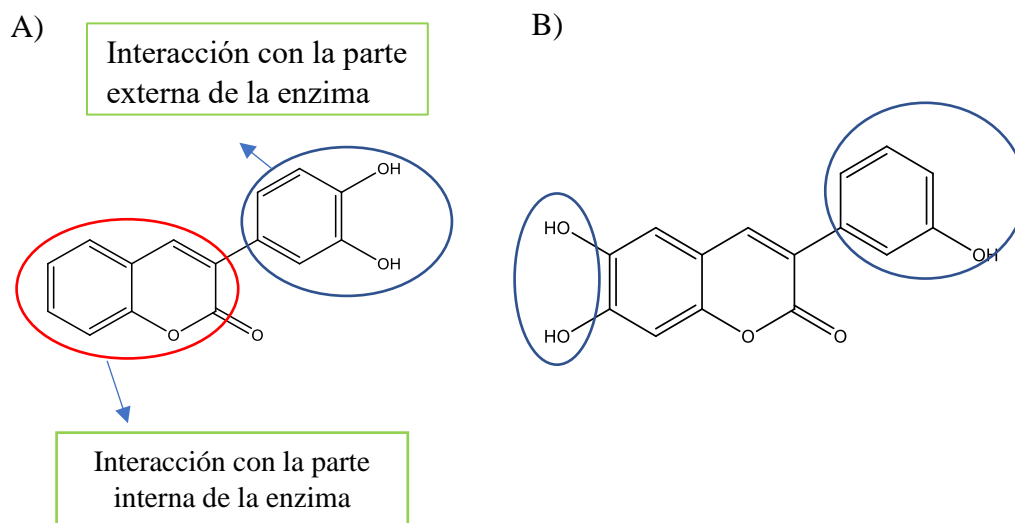


Figura 29. Análisis estructural de los compuestos A) 1 y B) 6

Para el compuesto 1 con 3 interacciones, la presencia de un grupo catecol como sustituyente en el grupo arilo de la cumarina le permite generar interacciones de puente de hidrógeno con la parte externa del sitio activo de la enzima, mientras que el esqueleto base de la cumarina le permiten interactuar con la parte interna hidrófoba del sitio activo. El compuesto 6 con 2 interacciones, tiene un grupo catecol en el esqueleto base de la cumarina que interactúa con la parte externa del sitio activo de la enzima. A su vez, la presencia de un fenol en posición 3 de la cumarina no le otorga lipofilia al compuesto, por lo que le resulta dificultoso internarse en el bolsillo de la enzima. Asimismo, se determinó que los grupos hidroxilo se anclan en la zona externa del sitio activo de la enzima, permitiendo que el resto de la molécula se oriente hacia el interior del sitio activo. Por lo que, la presencia de grupos que aumentan la lipofilia permitirían mayor interacción con el bolsillo hidrofóbico de la enzima. Cabe mencionar que las características de la enzima son una alta hidrofobicidad en la parte interior y una alta hidrofiliidad en la parte externa del sitio activo.

En la tabla 23, se observa la lipofilia y los ángulos de torsión tanto en el vacío como al interactuar con la enzima de los dos compuestos mencionados anteriormente.

Tabla 23. Análisis de los compuestos 1 y 6

Compuesto	N° interacciones	Log P	Ángulo de torsión	
			Vacío	Interacción
1	3	2,6	145.1°	108.9°
6	2	2,2	145.1	102.4°

En función a los valores de lipofilia, se determina que es un parámetro indispensable en la interacción con la parte interna de la enzima, ya que el compuesto con mayor interacción tiene un LogP de 2,6 mientras que el compuesto 6 con 2 interacciones tiene un LogP 2,2, debido a la presencia de un grupo catecol y grupo fenol como sustituyentes del esqueleto base de la cumarina, lo cual impide el ingreso a la parte interna del sitio activo de la enzima.

Los ángulos de torsión indicaron que la molécula 1 ancla mediante puente de hidrógeno en la parte externa y a continuación, se orienta hacia el interior del sitio activo de la enzima, tomando una orientación casi perpendicular al sustituyente en posición 3 respecto al esqueleto base de la cumarina. Mientras, que el compuesto 6 ancla en el exterior de la enzima desde el esqueleto base de la cumarina y el sustituyente arilo se orienta casi perpendicular hacia el interior, con la diferencia que interactúa con otros aminoácidos que no pertenecen al sitio activo. En la figura 30, se presentan las interacciones con la enzima *gGAPDH T. cruzi*.

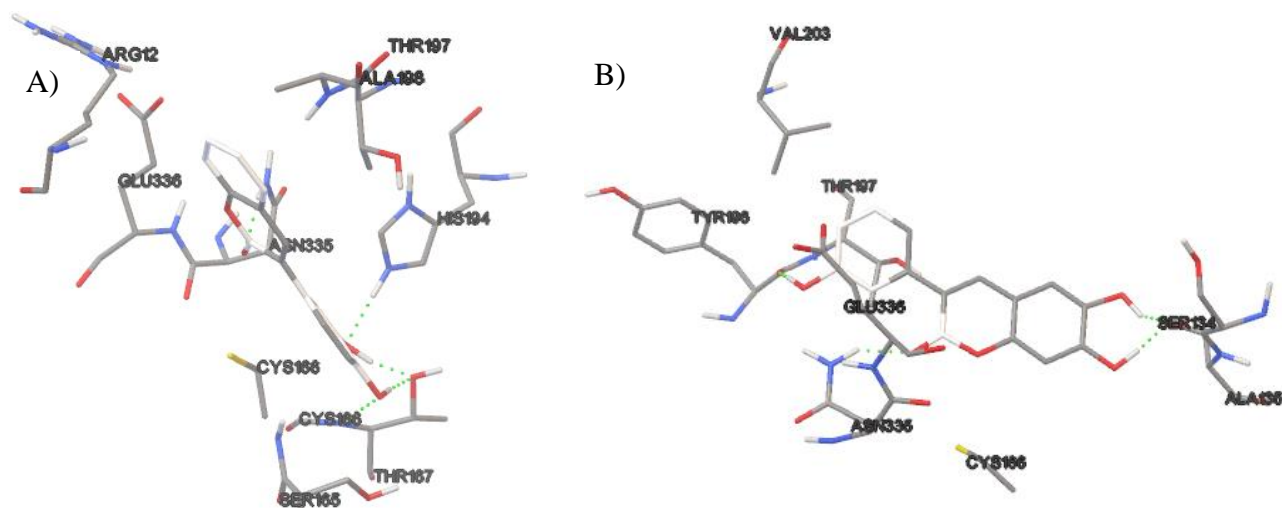


Figura 30. Interacción con el sitio activo de la enzima *gGAPDH* A) 1 y B) 6

Posterior al análisis estructural, se decidió realizar un primer filtro en el cual se considerará a los compuestos que presenten 3 interacciones con los residuos del sitio activo de la enzima. En la tabla 24, se observa los compuestos que podrían ser candidatos para inhibir a la enzima.

Tabla 24. Compuestos que cumplieron con el primer filtro

Compuesto	SA NAD			SA G3P		Bolsillo hidrófobo			
	Cys	His	Asn	Val	Arg	Asp	Met	Val	Asp
	166	194	335	255	249	210	38	205	39
1	3.158	1.852	2.026						
3	3.026	1.691	1.753						

Los compuestos que cumplieron con el requisito presentan en su estructura grupos hidroxilo, que le permiten anclar con la parte externa de la enzima y a su vez contienen sustituyentes que aumentan la lipofilia. Siendo, el compuesto 1 y 3 candidatos potenciales para inhibir la enzima gGAPDH.

En base a los resultados obtenidos para las enzimas AK y gGAPDH de *T. cruzi*, se concluye que la presencia del grupo catecol como sustituyente en el esqueleto básico de la cumarina o en el arilo es fundamental, le permite al compuesto interactuar mediante puentes de hidrógeno con el sitio activo de las dos enzimas, ya sea desde su parte externa o interna del sitio activo. A su vez, la lipofilia es una característica importante en los compuestos, ya que les orienta hacia la parte hidrofóbica del sitio activo de las enzimas, generando el mayor número de interacciones con los residuos de interés.

Cabe mencionar que la actividad de los compuestos obtenidos experimentalmente no puede ser relacionado con la inhibición enzimática, pero podría ser uno de los caminos que lleven a explicar el porqué de la actividad tripanocida, ya que los estudios de Docking Molecular, son modelos teóricos, en donde, el compuesto interactúa directamente con la enzima sin tomar en cuenta todo el proceso anterior que tiene que realizar el compuesto hasta llegar al blanco de estudio. Por lo que, para corroborar estos resultados sería indispensable el estudio experimental de la constante de inhibición enzimática.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 D. H. F. Souza, R. C. Garratt, A. P. U. Araújo, B. G. Guimarães, W. D. P. Jesus, P. A. M. Michels, V. Hannaert and G. Oliva, *FEBS Letters*, 1998, **424**, 131–135.
- 2 M. Paulo Ribeiro Machado, A. Moraes Rocha, L. Felipe de Oliveira, M. Beatriz de Cuba, I. de Oliveira Loss, L. Roberto Castellano, M. Vinicius Silva, J. Reis Machado, G. Antonio Nogueira Nascentes, L. Henrique Paiva, W. Savino, V. Rodrigues Junior, P. Chakur Brum, V. Ferreira Prado, M. Antonio Maximo Prado, E. Lages Silva, N. Montano, L. Eduardo Ramirez, V. Jose Dias da Silva and V. J. Dias da Silva, *Exp Physiol*, 2012, **97**, 1186–1202.
- 3 R. L. Tarleton, *Trends in Molecular Medicine*, 2016, **22**, 835–838.
- 4 S. Antinori, L. Galimberti, R. Bianco, R. Grande, M. Galli and M. Corbellino, *European Journal of Internal Medicine*, 2017, **43**, 6–15.
- 5 L. Conteh, T. Engels and D. H. Molyneux, *The Lancet*, 2010, **375**, 239–247.
- 6 F. X. Lescure, G. le Loup, H. Freilij, M. Develoux, L. Paris, L. Brutus and G. Pialoux, *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, **10**, 556–570.
- 7 J. A. Urbina, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2015, **62**, 149–156.
- 8 E. Chatelain, *Journal of biomolecular screening*, 2015, **20**, 22–35.
- 9 M. Carmo Pereira Nunes, W. Dones, C. A. Morillo, J. Justiniano Encina, A. Luiz Ribeiro, B. Horizonte, M. Gerais, P. Rico and S. Cruz de la Sierra, *Journal of the American College of Cardiology*, 2013, **62**, 767–776.
- 10 A. Rassi, A. Rassi and J. Marcondes de Rezende, *Infectious Disease Clinics*, 2012, **26**, 275–291.
- 11 W. M. A. (WMA), *Journal of the Indian Medical Association*, 2009, **107**, 403–405.
- 12 J. A. Pérez-Molina and I. Molina, *The Lancet*, 2018, **391**, 82–94.
- 13 J. Gascon, C. Bern and M. J. Pinazo, *Acta tropica*, 2010, **115**, 22–27.
- 14 S. R. Quah, *International Encyclopedia of Public Health: Second Edition*, 2016, 1–4470.
- 15 D. B. R. Rodrigues, M. A. dos Reis, A. Romano, S. A. D. L. Pereira, V. D. P. A. Teixeira, S. Tostes Junior and V. Rodrigues, *Clinical & developmental immunology*, 2012, **2012**, 361730.
- 16 F. Nagajyothi, F. S. Machado, B. A. Burleigh, L. A. Jelicks, P. E. Scherer, S. Mukherjee, M. P. Lisanti, L. M. Weiss, N. J. Garg and H. B. Tanowitz, *Cellular Microbiology*, 2012, **14**, 634–643.
- 17 A. G. Schijman, *Acta tropica*, 2018, **184**, 59–66.

- 18 C. J. Forsyth, S. Hernandez, W. Olmedo, A. Abuhamidah, M. I. Traina, D. R. Sanchez, J. Soverow and S. K. Meymandi, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2016, **63**, 1056–1062.
- 19 E. Chatelain and J. R. Ioset, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2018, **13**, 141–153.
- 20 M. Lapier, M. Zuniga-Lopez, B. Aguilera-Venegas, R. Adam, B. Abarca, R. Ballesteros, R. Lopez-Munoz, J. Maya and C. Olea-Azar, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, **17**, 399–411.
- 21 M. Moncada-Basualto, M. Lapier, J. D. Maya, B. Matsuhira, C. Olea-Azar, G. L. Delogu, E. Uriarte, L. Santana and M. J. Matose, *Medicinal Chemistry*, 2018, **14**, 573–584.
- 22 B. Demoro, S. Rostán, M. Moncada, Z. H. Li, R. Docampo, C. Olea Azar, J. D. Maya, J. Torres, D. Gambino and L. Otero, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, **23**, 303–312.
- 23 B. Aguilera-Venegas, C. Olea-Azar, E. Norambuena, V. J. Arán, F. Mendizábal, M. Lapier, J. D. Maya, U. Kemmerling, R. López-Muñoz and M. Muñoz, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, **78**, 1004–1012.
- 24 L. Minini, G. Álvarez, M. González, H. Cerecetto and A. Merlino, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2015, **58**, 40–49.
- 25 E. R. da Silva, C. do C. Maquiaveli and P. P. Magalhães, *Experimental Parasitology*, 2012, **130**, 183–188.
- 26 X.-Q. Wu, W.-J. Zhu, Z.-R. Lü, Y. Xia, J.-M. Yang, F. Zou and X.-Y. Wang, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, **44**, 149–155.
- 27 E. A. V. Vera, M. Sayé, C. Reigada, F. S. Damasceno, A. M. Silber, M. R. Miranda and C. A. Pereira, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **87**, 498–503.
- 28 H.-R. Wang, W.-J. Zhu and X.-Y. Wang, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, **49**, 985–991.
- 29 R. F. Freitas, I. M. Prokopczyk, A. Zottis, G. Oliva, A. D. Andricopulo, M. T. S. Trevisan, W. Vilegas, M. G. v. Silva and C. A. Montanari, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, **17**, 2476–2482.
- 30 F. Pavão, M. S. Castilho, M. T. Pupo, R. L. A. Dias, A. G. Correa, J. B. Fernandes, M. F. G. F. Silva, J. Mafezoli, P. C. Vieira and G. Oliva, *FEBS Letters*, 2002, **520**, 13–17.
- 31 E. de S. Marques, D. B. Salles and E. L. Maistro, *Toxicology Reports*, 2015, **2**, 268–274.

- 32 A. E. Hagerman, K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld and T. L. Riechel, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**, 1887–1892.
- 33 D. Zúñiga-Núñez, P. Barrias, G. Cárdenas-Jirón, M. S. Ureta-Zañartu, C. Lopez-Alarcón, F. E. Morán Vieyra, C. D. Borsarelli, E. I. Alarcon and A. Aspée, *RSC Advances*, 2018, **8**, 1927–1933.
- 34 V. Mandlik, S. Patil, R. Bopanna, S. Basu and S. Singh, *PLOS ONE*, 2016, **11**, e0164585.
- 35 T. O. Olomola, R. Klein, N. Mautsa, Y. Sayed and P. T. Kaye, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, **21**, 1964–1971.
- 36 R. Vazquez, M. E. Riveiro, C. Mondillo, J. C. Perazzo, M. Vermeulen, A. Baldi, C. Davio and C. Shayo, *Biochemical Pharmacology*, 2013, **86**, 210–221.
- 37 M. J. Matos, F. Pérez-Cruz, S. Vazquez-Rodriguez, E. Uriarte, L. Santana, F. Borges and C. Olea-Azar, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2013, **21**, 3900–3906.
- 38 F. Pérez-Cruz, F. A. Villamena, G. Zapata-Torres, A. Das, C. A. Headley, E. Quezada, C. Lopez-Alarcon and C. Olea-Azar, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2013, **26**, 773–783.
- 39 R. F. Guñez, M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, C. Olea-Azar and J. D. Maya, *Future Medicinal Chemistry*, 2013, **5**, 1911–1922.
- 40 T. B. de Oliveira, R. C. Pedrosa and D. W. Filho, *International Journal of Cardiology*, 2007, **116**, 357–363.
- 41 S. Gupta, J.-J. Wen and N. J. Garg, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, **2009**, 190354.
- 42 G. Vilar-Pereira, V. C. Carneiro, H. Mata-Santos, A. R. R. Vicentino, I. P. Ramos, N. L. L. Giarola, D. F. Feijó, J. R. Meyer-Fernandes, H. A. Paula-Neto, E. Medei, M. T. Bozza, J. Lannes-Vieira and C. N. Paiva, *PLoS Pathogens*, 2016, **12**, e1005947.
- 43 M. A. Brenzan, C. V. Nakamura, B. P. Dias Filho, T. Ueda-Nakamura, M. C. M. Young, A. G. Córrea, J. A. Júnior, A. O. dos Santos and D. A. G. Cortez, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008, **62**, 651–658.
- 44 N. Robledo-O’Ryan, M. Moncada-Basualto, F. Mura, C. Olea-Azar, M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, M. Moncada-Basualto, M. Lapier and J. D. Maya, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, **25**, 621–632.
- 45 G. S. Ulrich-Merzenich, *Synergy*, 2014, **1**, 59–69.
- 46 V. Seguel, L. Castro, C. Reigada, L. Cortes, M. v. Díaz, M. R. Miranda, C. A. Pereira, M. Lapier, C. Campos-Estrada, A. Morello, U. Kemmerling, J. D. Maya and R. López-Muñoz, *Experimental Parasitology*, 2016, **171**, 23–32.

- 47 J. R. P. T. Castanheira, R. E. P. Castanho, H. Rocha, C. Pagliari, M. I. S. Duarte, A. L. S. Therezo, E. F. B. Chagas and L. P. A. Martins, *Parasitology International*, 2018, **67**, 547–555.
- 48 G. R. Goes, P. S. Rocha, A. R. S. Diniz, P. H. N. Aguiar, C. R. Machado and L. Q. Vieira, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2016, **10**, e0004555.
- 49 B. S. Hall, C. Bot and S. R. Wilkinson, *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**, 13088–13095.
- 50 S. R. Wilkinson, M. C. Taylor, D. Horn, J. M. Kelly and I. Cheeseman, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**, 5022–5027.
- 51 F. C. de Alcantara, V. F. Lozano, A. S. Vale Velosa, M. R. M. dos Santos and R. M. S. Pereira, *Polyhedron*, 2015, **101**, 165–170.
- 52 M. V. Providello, Z. A. Carneiro, G. B. Portapilla, G. Tavares do Vale, R. S. Camargo, C. R. Tirapelli and S. de Albuquerque, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, , DOI:10.1128/AAC.00514-18/FORMAT/EPUB.
- 53 K. J. Pelizzaro-Rocha, T. S. Tiunan, E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, B. P. D. Filho and C. V. Nakamura, *Phytomedicine*, 2010, **18**, 36–39.
- 54 A. Chen, M. Liu, L. Dong and D. Sun, *Fluid Phase Equilibria*, 2013, **341**, 42–47.
- 55 J. Szejtli, *Chemical Reviews*, 1998, **98**, 1743–1753.
- 56 G. Dollo, D. O. Thompson, P. le Corre, F. Chevanne and R. le Verge, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, **164**, 11–19.
- 57 P. Mura, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **101**, 238–250.
- 58 C. Folch-Cano, C. Jullian, H. Speisky and C. Olea-Azar, *Food Research International*, 2010, **43**, 2039–2044.
- 59 J. Zhang and P. X. Ma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, **65**, 1215–1233.
- 60 S. v. Kurkov and T. Loftsson, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **453**, 167–180.
- 61 G. Wenz, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1994, **33**, 803–822.
- 62 C. Tablet, I. Matei, E. Pincu, V. Meltzer and M. Hillebrand, *Journal of Molecular Liquids*, 2012, **168**, 47–53.
- 63 C. Folch-Cano, C. Olea-Azar, E. Sobarzo-Sánchez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, F. Otero and C. Jullian, *Journal of Solution Chemistry*, 2011, **40**, 1835–1846.
- 64 D. Leonardi, M. E. Bombardiere and C. J. Salomon, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, **62**, 543–548.

- 65 M. Moncada-Basualto, B. Matsuhira, A. Mansilla, M. Lapier, J. D. Maya and C. Oleazar, *Carbohydrate Polymers*, 2019, **204**, 170–181.
- 66 C. Salas, R. A. Tapia, K. Ciudad, V. Armstrong, M. Orellana, U. Kemmerling, J. Ferreira, J. D. Maya and A. Morello, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, **16**, 668–674.
- 67 J. Duaso, G. Rojo, G. Cabrera, N. Galanti, C. Bosco, J. D. Maya, A. Morello and U. Kemmerling, *Placenta*, 2010, **31**, 705–711.
- 68 T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, 1983, **65**, 55–63.
- 69 G. Y. di Veroli, C. Fornari, D. Wang, S. Mollard, J. L. Bramhall, F. M. Richards and D. I. Jodrell, *Bioinformatics*, 2016, **32**, 2866–2868.
- 70 B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**, 4619–4626.
- 71 S. G. Balasubramani, G. P. Chen, S. Coriani, M. Diedenhofen, M. S. Frank, Y. J. Franzke, F. Furche, R. Grotjahn, M. E. Harding, C. Hättig, A. Hellweg, B. Helmich-Paris, C. Holzer, U. Huniar, M. Kaupp, A. Marefat Khah, S. Karbalaei Khani, T. Müller, F. Mack, B. D. Nguyen, S. M. Parker, E. Perlt, D. Rappoport, K. Reiter, S. Roy, M. Rückert, G. Schmitz, M. Sierka, E. Tapavicza, D. P. Tew, C. van Wüllen, V. K. Voora, F. Weigend, A. Wodyński and J. M. Yu, *The Journal of Chemical Physics*, 2020, **152**, 184107.
- 72 J. G. Brandenburg, C. Bannwarth, A. Hansen and S. Grimme, *The Journal of Chemical Physics*, 2018, **148**, 064104.
- 73 S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich and H. Krieg, *The Journal of Chemical Physics*, 2010, **132**, 154104.
- 74 S. Grimme, S. Ehrlich and L. Goerigk, *Journal of Computational Chemistry*, 2011, **32**, 1456–1465.
- 75 K. Eichkorn, F. Weigend, O. Treutler and R. Ahlrichs, *Theoretical Chemistry Accounts*, 1997, **97**, 119–124.
- 76 A. E. Reed, R. B. Weinstock and F. Weinhold, *The Journal of Chemical Physics*, 1985, **83**, 735–746.
- 77 Th. Ackermann, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 1987, **91**, 1398–1398.
- 78 C. Lucas-Abellán, I. Guillén, M. T. Mercader-Ros, A. Serrano-Martínez, E. Núñez, N. Núñez-Delicado and J. A. Gabaldón, *Carbohydrate Polymers*, 2014, **103**, 87–93.
- 79 J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge and D. B. Collum, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2013, **52**, 11998–12013.

- 80 C. Bannwarth, S. Ehlert and S. Grimme, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2019, **15**, 1652–1671.
- 81 C. Bannwarth, E. Caldeweyher, S. Ehlert, A. Hansen, P. Pracht, J. Seibert, S. Spicher and S. Grimme, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2021, **11**, e1493.
- 82 A. Bujard, C. Petit, P. A. Carrupt, S. Rudaz and J. Schappler, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, **97**, 143–150.
- 83 R. Prades, S. Guerrero, E. Araya, C. Molina, E. Salas, E. Zurita, J. Selva, G. Egea, C. López-Iglesias, M. Teixidó, M. J. Kogan and E. Giralt, *Biomaterials*, 2012, **33**, 7194–7205.
- 84 R. Veas, M. Rojas-Pirela, C. Castillo, C. Olea-Azar, M. Moncada, P. Ulloa, V. Rojas and U. Kemmerling, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2020, **127**, 110178.
- 85 A. Liempi, C. Castillo, M. Cerda, D. Droguett, J. Duaso, K. Barahona, A. Hernández, C. Díaz-Luján, R. Fretes, S. Härtel and U. Kemmerling, *Acta Tropica*, 2015, **143**, 47–50.
- 86 J. Duaso, E. Yanez, C. Castillo, N. Galanti, G. Cabrera, G. Corral, J. D. Maya, I. Zulantay, W. Apt and U. Kemmerling, *Journal of Tropical Medicine*, 2012, **2012**, 758357.
- 87 C. Aliaga and E. A. Lissi, *Canadian Journal of Chemistry*, 2004, **82**, 1668–1673.
- 88 J. S. Durand-Niconoff, M. H. Matus, S. F. Juárez-Cerrillo and F. J. Meléndez, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2016, **135**, 249.
- 89 P. J. Hotez, E. Dumonteil, L. Woc-Colburn, J. A. Serpa, S. Bezek, M. S. Edwards, C. J. Hallmark, L. W. Musselwhite, B. J. Flink and M. E. Bottazzi, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2012, **6**, e1498.
- 90 J. Miller and A. Dahan, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, **430**, 388–391.
- 91 F. Salgado, M. Moncada-Basualto, J. Pozo-Martinez, A. Liempi, U. Kemmerling, J. D. Maya, P. Jaque, F. Borges, E. Uriarte, M. J. Matos and C. Olea-Azar, *Arabian Journal of Chemistry*, 2021, **14**, 102975.
- 92 G. Barriga-Gonzalez, C. Olea-Azar, M. Zuniga-Lopez, C. Folch-Cano, B. Aguilera-Venegas, W. Porcal, M. Gonzalez and H. Cerecetto, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, **15**, 484–495.
- 93 A. A. Abdel-Shafi and S. S. Al-Shihry, *Spectrochimica Acta Part A*, 2009, **72**, 533–537.
- 94 H. A. Benesi and J. H. Hildebrand, *Journal of the American Chemical Society*, 1949, **71**, 2703–2707.

- 95 T. Aree and S. Jongrungruangchok, *Carbohydrate Polymers*, 2016, **140**, 362–373.
- 96 B. Medronho, A. J. M. Valente, P. Costa and A. Romano, *Colloid and Polymer Science*, 2014, **292**, 885–894.
- 97 R. Chadha, D. V. S. Jain, A. Aggarwal, S. Singh and D. Thakur, *Thermochimica Acta*, 2007, **459**, 111–115.
- 98 C. W. Fu, H. E. Tsai, W. S. Chen, T. T. Chang, C. L. Chen, P. W. Hsiao and W. S. Li, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, **64**, 527–542.
- 99 M. Paczkowska, M. Mizera, K. Sałat, A. Furgała, P. Popik, J. Knapik-Kowalczyk, A. Krause, D. Szymanowska-Powałowska, Z. Fojud, M. Kozak, M. Paluch and J. Cielecka-Piontek, *Scientific Reports*, 2018, **8**, 16184.
- 100 K. Réti-Nagy, M. Malanga, É. Fenyvesi, L. Szente, G. Vámosi, J. Váradi, I. Bácskay, P. Fehér, Z. Ujhelyi, E. Róka, M. Vecsernyés, G. Balogh, G. Vasvári and F. Fenyvesi, *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, **496**, 509–517.
- 101 M. A. M. Lyra, J. L. Soares-Sobrinho, R. C. B. Q. Figueiredo, J. M. Sandes, Á. A. N. Lima, R. P. Tenório, D. A. F. Fontes, F. L. A. Santos, L. A. Rolim and P. J. Rolim-Neto, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2012, **73**, 397–404.
- 102 J. Fouquier and M. Guedj, *Pharmacology Research & Perspectives*, 2015, **3**, e00149.
- 103 C. I. BLISS, *Annals of Applied Biology*, 1939, **26**, 585–615.
- 104 M. C. Berenbaum, *Pharmacological Reviews*, 1989, **41**, 93–141.
- 105 W. R. Greco, G. Bravo and J. C. Parsons, *Pharmacological Reviews*, 1995, **47**, 331–385.
- 106 N. Geary, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2013, **304**, 237–253.
- 107 C. Castillo, G. Ramírez, C. Valck, L. Aguilar, I. Maldonado, C. Rosas, N. Galanti, U. Kemmerling and A. Ferreira, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, **7**, e2376.
- 108 W. Souza, *Current Pharmaceutical Design*, 2002, **8**, 269–285.
- 109 C. Maria Aravena, A. Claudio Olea, H. Cerecetto, M. González, J. D. Maya and J. Rodríguez-Becerra, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, **79**, 312–319.
- 110 C. Pereira, *Infection Disorders - Drug Targets*, 2014, **14**, 30–36.
- 111 P. Fernandez, A. Haouz, C. A. Pereira, C. Aguilar and P. M. Alzari, *Proteins*, 2007, **69**, 209–212.

- 112 D. Galvis-Pareja, G. Zapata-Torres, J. Hidalgo, P. Ayala, Z. Pedrozo, C. Ibarra, G. Diaz-Araya, A. R. Hall, J. M. Vicencio, L. Nuñez-Vergara and S. Lavandero, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, **279**, 53–62.
- 113 G. Zhou, T. Somasundaram, E. Blanc, G. Parthasarathy, W. R. Ellington and M. S. Chapman, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, **95**, 8449–8454.