



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE COMPLEJOS DE Pt/Pd CON
LIGANDOS HÍBRIDOS CUMARINA-TIOSEMICARBAZONA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

MACARENA ALEJANDRA ARCOS ARCOS

PATROCINANTE

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. CLAUDIO OLEA-AZAR
DR. MAURICIO MONCADA-BASUALTO

SANTIAGO-CHILE

2023

**Este estudio fue financiado por el proyecto Fondecyt Regular
N° 1190340**

Agradecimientos

Dicen que somos resultado de nuestro círculo de personas más cercanas, y es por esto, que le debo a muchas personas quien soy hoy en día, las experiencias que vivimos y las enseñanzas que me proporcionaron me acompañaran el resto de mi vida y siempre agradeceré por habérmelas conocido.

Agradezco especialmente a mi familia (mi madre, Carmen Gloria y mi abuela, Margarita), por su apoyo incondicional, su crianza y ánimos. Tener una afectuosa madre que me apoye y a pesar de las dificultades logró darme lo que necesitaba e incentivarme a crecer en lo personal, académico y artístico. Y a mí "mami" por cuidar de mi madre y de mí, por darme su afecto y tenerme paciencia. Sé que soy algo mezquina con mis logros y que suelo menospreciarlos, pero sinceramente espero que se enorgullezcan de mí, aunque no lo diga abiertamente. A ustedes, mi familia, les debo mi sentido de la responsabilidad, entereza y resiliencia.

Quiero destacar a Juan Pablo Piderit y a María Graciela, que a pesar de no tener un vínculo sanguíneo me trataron como su familia, me tuvieron paciencia y se convirtieron en mi ejemplo a seguir. Si hay una persona en este mundo a la que me quiero parecer es a mi profe Juan Pablo, aunque ya no este conmigo y no pueda ver la persona en la que me convertí siempre lo llevaré en mi corazón, y cada vez que pinte y haga las cosas que amo lo estaré honrando.

A Camilo Lobo, mi corazón, nunca esperé conocer a una persona tan maravillosa en mi vida, en la que me pudiera apoyar y mostrarle todos mis defectos y a pesar de eso me siga amando. Gracias a ti, he crecido como persona, pude sanar viejas heridas y expresar más abiertamente mis emociones sin temor.

A mis amigos, Raúl, Constanza y Alejandra por darme buenos momentos y hacerme reír, recordándome que la vida esta para disfrutarla.

A Alejandra Farias, por escucharme, ayudarme en mis procesos de cambio y con mis crisis existenciales, siempre agradeceré la orientación y los consejos.

A mi madrina y su marido, Patricia Olate y Juan Carlos; a mis tíos abuelos, Telma y Sergio; a la familia de mi pololo, a las amigas cercanas de mi madre; por darme ánimos, apoyo psicológico y felicitaciones por cada logro. Y algunos profesores de mi educación básica y media, que lograron darme el entusiasmo por el estudio e incentivaron mi curiosidad.

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

A la Universidad de Chile, por permitirme ser parte de su casa de estudios y darme las herramientas para desarrollarme académicamente, personalmente y fortalecer mis habilidades. Quisiera agradecer especialmente al Dr. Claudio Olea y al Dr. Mauricio Moncada, por depositar su confianza en mí, por darme la oportunidad de trabajar en tan maravilloso equipo y apoyarme en la continuación de mis estudios. Siempre agradeceré el contagioso positivismo y las amables palabras de aliento que me ayudaron a ganar más confianza en mí, del Dr. Claudio Olea. Además de la paciencia, la gran disposición, las certeras críticas y consejos del Dr. Mauricio, que me enseñó a trabajar correctamente y empezar a formar mi criterio investigativo.

A la Anita por su buena disposición y paciencia para ayudarme a trabajar en un área de total desconocimiento para mí, la biológica. Además, por siempre tener la gentileza de explicarme cada cosa que desconocía y por saciar mi curiosidad en esta área nueva.

A Josué Pozo, Javiera Órdenes y José Ortega; por su compañía, por ayudarme y enseñarme los distintos procedimientos a trabajar a lo largo de mi tesis. Y en especial, por darme parte de su tiempo para explicarme cosas que no entendía, espero ser tan agradable y amena como ustedes lo fueron conmigo, con los futuros compañeros de laboratorio.

A la profesora Jaqueline Pesoa por aceptarme como ayudante de química orgánica 1, agradezco la oportunidad que me dio de desarrollarme académicamente y fortalecer mis habilidades blandas. Nunca me imagine realizando docencias, pero ahora no concibo mi vida sin ellas, me permitió ayudar a otros y a desear ser mejor para poder transmitir mis conocimientos a otros. Y también, al profesor Javier Herrera por permitirme hacer la ayudantía de orgánica 2 el segundo semestre del 2021.

A los compañeros de trabajo que tuve en mi práctica profesional (Camila, José y Marcela) y a mi jefa (Alejandra Ríos) por el buen ambiente, el compañerismo, por sus enseñanzas y en especial la oportunidad de aprender de ustedes y por quitarme los temores del desconocido mundo laboral.

A la Dra. Loreto Ascar, Jefa de la Carrera de Química; y a la Profesora Tatiana, gracias por su atención, buena disposición a responder mis dudas y por su comprensión a lo largo de la realización del anteproyecto y memoria de título.

Gracias a la Dra. Lucía Otero y a Santiago Rostán que la conocí brevemente en su estancia por Chile, les agradezco poder trabajar con sus compuestos y espero poder seguir trabajando con ustedes en el futuro.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS, ECUACIONES Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
METODOLOGÍAS.....	19
1. REACTIVOS Y EQUIPOS.....	19
1.1) Reactivos.....	19
1.2) Equipos.....	19
1.3) Otros.....	19
2. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS.....	19
2.1) Voltametría cíclica (CV).....	19
2.2) Espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE).....	20
3. BÍOLOGICOS.....	20
3.1) Actividad biológica en células EaHy y <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c....	20
3.2) Citotoxicidad en células sanas (EaHy).....	21
3.3) Cultivo y recolección de parásitos.....	21
3.4) Citotoxicidad en parásitos.....	21
3.5) Potencial de membrana mitocondrial en parásitos.....	22
4. DETERMINACIÓN DE LA LIPOFILIA.....	22
4.1) Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela (PAMPA).....	22
5. CÁLCULOS COMPUTACIONALES.....	23
5.1) Índices de Fukui y simulaciones.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
1) ELECTROQUÍMICA.....	24
1.1) Voltametría cíclica (CV).....	24
1.2) Resonancia de espín electrónico (EPR).....	37
2) CÁLCULOS COMPUTACIONALES.....	37
2.1) Índices de Fukui.....	37

3) MEDICIONES BIOLÓGICAS.....	39
3.1) Actividad citotoxicidad	39
3.2) Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	40
4) LIPOFILIA.....	41
4.1) PAMPA (Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela)	41
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXO.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS, ECUACIONES Y TABLAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> con las tres formas del parásito: Epimastigote, amastigote y tripomastigote.	12
Figura 2: Estructura química de los tratamientos actuales: nifurtimox (a) y benznidazol(b).	13
Figura 3: Mecanismo de reducción de los fármacos clínicos Benznidazol y Nifurtimox.	13
Figura 4: Estructura base de cumarina (2H-cromen-2-ona)	14
Figura 5: Posible interacción del grupo tiosemicarbazona con el sitio activo de la cruzipaina.	15
Figura 6: Formas resonantes del grupo tiosemicarbazona. Tautomería tiona-tiol.	15
Figura 7: Estructura molecular de los ligandos libres y sus respectivos complejos. Además del código de identificación.	17
Figura 8: Reducción de MTT a Formazán por acción enzimática.	20
Ecuación 1: % de incorporación de TMRE	22
Ecuación 2: % de retención en la placa dadora.	22
Ecuación 3: % de Permeabilidad.	22
Ecuación 4: Permeabilidad efectiva	23
Figura 9: Voltamogramas de los compuestos SR10 (A) y SR12 (B), con sus respectivas estructuras.	25
Ecuación 5: Criterio de reversibilidad. Relación entre intensidad de corriente anódica y catódica	26
Ecuación 6: Criterio de reversibilidad. Diferencial de potencial.	26
Ecuación 7: Ecuación de Nicholson & Shain.	26
Figura 10: Relación de intensidad de corriente catódica/ anódica respecto a la función de barrido (V/s) para los ligandos SR10 (A) y SR12(B).	26-27
Figura 11: Reordenamiento tautomérico y apertura del anillo pirona.	28
Figura 12: Propuesta de mecanismo de reducción de la cetona.	28
Figura 13: Mecanismo de reacción del ligando híbrido cumarina-tiosemicarbazona, basado en la bibliografía descrita a -1,6V.	29
Figura 14: Voltamograma de los SR02(C), SR05(D), SR04(E) y SR08(F) con las curvas asignadas.	30-31
Figura 15: Relación entre las razones de curva anódica y catódica en función de la velocidad de barrido para SR02 (C), Sr05 (D), SR04 (E) y SR08 (F).	32-33
Tabla 1: Parámetros electroquímicos de la voltametría cíclica a la velocidad de barrido de 2000 mV/s.	33
Figura 16: Dependencia del logaritmo de la intensidad catódica [μA] de la primera curva en función del logaritmo de la velocidad de barrido (V) para SR10 (A) y SR12 (B).	34
Figura 17: Dependencia del logaritmo de la intensidad catódica [μA] de la primera curva en función del logaritmo de la velocidad de barrido (V) para SR02 (C), SR05 (D), SR04 (E) y SR08(F).	35-36

Tabla 2: Mecanismo de reducción de los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y sus complejos con Pd y Pt.	36
Figura 18: Propuesta de mecanismo de reducción de los ligantes híbridos	37
Figura 19: Asignación de los índices de Fukui más relevantes a los átomos más susceptibles a ataques nucleofílicos (f+) en el ligante híbrido cumarina-tiosemicarbazona SR10.	38
Figura 20: Asignación de los índices de Fukui más relevantes a los átomos más susceptibles a ataques nucleofílicos (f+) en el ligante híbrido cumarina-tiosemicarbazona SR12.	38
Tabla 3: Valores obtenidos de concentración de inhibición media (IC ₅₀) e índices de selectividad para cada compuesto en células mamíferas (EaHy) y parásitos Tripomastigotes de la cepa Dm28c.	39
Figura 21: Efecto de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para cada compuesto (100 μ M) y el estándar CCCP a 40 minutos y 2 horas de exposición.	40
Tabla 4: Porcentaje de permeabilidad y permeabilidad efectiva en membrana artificial.	41

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana es una patología causada por un parásito protozoario ("*Trypanosoma cruzi*"), que en zonas endémicas es transmitido por un insecto triatómico hematófago. Debido a la globalización esta enfermedad se ha extendido a zonas no endémicas, transformándola en un problema sanitario global.

El tratamiento farmacológico actual de la EC, utiliza nitrocompuestos: el Nifurtimox y el benznidazol, como tratamiento de la enfermedad de Chagas. Que, a pesar de su efectividad en la fase aguda de la enfermedad, su eficacia disminuye drásticamente en la fase crónica. Sumado a esto, presentan efectos secundarios severos que dificultan la adhesión a la terapia. Debido a esto, se presenta la necesidad de nuevos tratamientos farmacológicos.

La química bioinorgánica ha proporcionado estrategias para encontrar compuestos tripanocidas nuevos basados en la modificación de las propiedades fisicoquímicas de ligantes bioactivos. Se ha descrito la actividad de híbridos de cumarinas con otras moléculas como estrategia en el diseño de compuestos tripanocidas. Por otro lado, las tiosemicarbazonas han presentado gran interés como drogas antiparasitarias y distintos derivados de tiosemicarbazonas han mostrado actividad frente a *T. cruzi*, a través de la inhibición de la enzima cruzipaína, que es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular durante el proceso de infección. Asimismo, el grupo tiosemicarbazona cuando se utiliza como sustituyente, debido a sus propiedades químicas otorga a la molécula la capacidad de actuar como ligante, característica importante para su posterior complejación con metales de transición: paladio y platino que en otros estudios se han utilizado como mejoradores de selectividad, efectividad y atenuantes de toxicidad.

En este trabajo, se estudió una serie de ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y sus respectivos complejos monolépticos de paladio y platino, donde los sustituyentes enlazados a la fracción tiosemicarbazona incidieron en la permeabilidad en membrana artificial de los compuestos, y se observó un aumento en la permeabilidad de los complejos en comparación de los ligantes.

Por otro lado, se realizaron estudios electroquímicos (voltametría cíclica y EPR) a los complejos y ligantes. Se observó que la modificación del sustituyente de la fracción de la tiosemicarbazona por fenilo disminuye los potenciales de reducción. Asimismo, los complejos de paladio mostraron una mayor facilidad de reducción. Finalmente, se propuso un posible mecanismo de reducción no radicalario.

También, se evaluó la actividad citotóxica en células de mamífero (EaHy) y en parásitos tripomastigotes. Donde se observó que la mayoría de los compuestos estudiados no fueron tóxicos para las células mamíferas y los complejos fueron más activos que los ligantes. Se destaca SR08, ya que fue el compuesto con mejor índice de selectividad. Y a través del ensayo de potencial de membrana mitocondrial se encontró que este compuesto actúa por este mecanismo.

Finalmente, se encontró una relación directa del aumento de la lipofilia con el incremento de la actividad tripanocida, y ninguna relación con el potencial de reducción. Se destaca el compuesto SR08 como candidato prometedor para modificaciones que mejoren su actividad tripanocida.

SUMMARY

Chagas disease (CD) or American trypanosomiasis is a pathology caused by a protozoan parasite ("*Trypanosoma cruzi*"), which in endemic areas is transmitted by a hematophagous triatomic insect. Due to globalization, this disease has spread to non-endemic areas, transforming it into a global health problem.

The current pharmacological treatment of CD uses nitrocompounds: Nifurtimox and benznidazole, as treatment for Chagas disease. That, despite its effectiveness in the acute phase of the disease, its effectiveness decreases drastically in the chronic phase. In addition to this, they have severe side effects that make it difficult to adhere to therapy. Because of this, there is a need for new pharmacological treatments.

Bioinorganic chemistry has provided strategies to find new trypanocidal compounds based on the modification of the physicochemical properties of bioactive ligands. The activity of coumarin hybrids with other molecules has been described as a strategy in the design of trypanocidal compounds. On the other hand, thiosemicarbazones have shown great interest as antiparasitic drugs and different derivatives of thiosemicarbazones have shown activity against *T. cruzi*, through the inhibition of the enzyme cruzipain, which is capable of degrading components of the extracellular matrix during the process. of infection. Likewise, the thiosemicarbazone group when used as a substituent, due to its chemical properties, gives the molecule the ability to act as a binder, an important characteristic for its subsequent complexation with transition metals: palladium and platinum, which in other studies have been used as color enhancers. selectivity, effectiveness and mitigating toxicity.

In this work, a series of coumarin-thiosemicarbazone hybrid ligands and their respective palladium and platinum monolectic complexes were studied, where the substituents linked to the thiosemicarbazone fraction affected the artificial membrane permeability of the compounds, and an increase in the permeability of the compounds was observed. permeability of the complexes compared to the ligands.

On the other hand, an electrochemical study was carried out on (cyclic voltammetry and EPR) complexes and ligands. Modification of the substituent of the thiosemicarbazone moiety to phenyl was observed to decrease the reduction potentials. Likewise, the palladium complexes showed greater ease of reduction. Finally, a possible non-radical reduction mechanism was proposed.

Also, the cytotoxic activity was evaluated in mammalian cells (EaHy) and in trypomastigotes parasites. Where it was observed that most of the compounds studied were not toxic to mammalian cells and the complexes were more active than the ligands. SR08 stands out, since it was the compound with the best selectivity index. And through the mitochondrial membrane potential test, it was found that this compound acts by this mechanism.

Finally, a direct relationship between the increase in lipophilia and the increase in trypanocidal activity was found, and no relationship with the reduction potential. The compound SR08 stands out as a promising candidate for modifications that improve its trypanocidal activity.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), esta afección es endémica de Latinoamérica y se transmite principalmente por vía vectorial, a través de un insecto triatomino hematófago (algunos de estos son: *Triatoma infesta* y *Rhodnius prolixus*) en su zona nativa, donde las falencias económicas, sanitarias y sociales contribuyen a su transmisión y prevalencia [1-5]. Adicionalmente, la globalización y la adaptación del patógeno a otros entornos y huéspedes ha contribuido a la diseminación de la enfermedad de Chagas a otras partes del mundo, donde en zonas no endémicas puede transmitirse por otros medios, como las transfusiones de sangre, trasplante de órganos, consumo de alimentos contaminados, por accidentes en laboratorios y transmisión congénita. Transformándola en un problema sanitario a nivel mundial, donde la Organización mundial de la salud (OMS) calcula que hay 6 a 7 millones de personas infectadas mayoritariamente latinoamericanos y como respuesta para aumentar su visualización, la EC ingresó el 2020 al listado de enfermedades tropicales desatendidas (NTD) [1-7].

Dentro del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* se ven generalmente involucrados un insecto vector y el mamífero huésped (Figura 1). Dependiendo de donde se encuentre el parásito dentro del ciclo, se puede identificar tres formas morfológicas diferentes: i) Epimastigote, forma extracelular replicante no infectiva que se encuentra en los intestinos del vector; ii) Tripomastigote, forma extracelular no replicante e infectiva que se encuentra en la sangre del huésped, en las deposiciones de los triatominos (forma metacíclica), y que se diferencia en la siguiente forma; iii) amastigote, forma replicativa intracelular que se encuentra al interior de las células del mamífero huésped donde se replica varias veces para después diferenciarse en tripomastigotes, los que serán liberados al torrente sanguíneo para infectar otras células blanco tras la lisis de la célula huésped [7,8].

La EC es una enfermedad silenciosa y potencialmente mortal, que presenta tres fases: 1) Fase aguda, se caracteriza por una alta cantidad de parásito circulando en el torrente sanguíneo, dura entre 4 a 8 semanas y generalmente es asintomática, del 70% al 80% de los infectados son asintomáticos toda su vida, menos del 50% de las personas presenta signos o síntomas leves, en raros casos del 1% al 5% se presentan fases agudas graves con posibles complicaciones cardíacas o neurológicas. Solo el 1-2% de los pacientes son diagnosticados en esta fase con el tiempo la enfermedad evoluciona entrando en la 2) fase indeterminada o asintomática crónica en la que se puede permanecer toda la vida o avanzar a la 3) fase crónica, hasta 30% de los pacientes llega a esta etapa, donde el parásito se encuentra en tejidos blanco (músculos cardíaco y digestivo), donde puede provocar daño cardíaco o digestivo o neuronal o mixto, como: megaesófago, megacolon, embolia pulmonar, miocardiopatía dilatada y arritmias (siendo las alteraciones cardíacas las potencialmente mortales) [5-8].

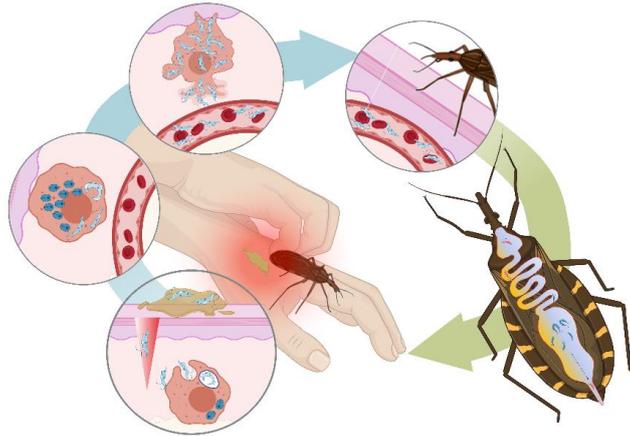


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*, con las tres formas del parásito: Epimastigote, amastigote y tripomastigote.

A pesar de los grandes esfuerzos de prevención, como la aplicación de insecticidas, el cribado de la sangre y tejidos, entre otras [6]; siguen apareciendo miles de casos nuevos cada día. Es aquí donde el tratamiento médico toma un papel protagónico en el combate de esta enfermedad, especialmente cuando el diagnóstico en América es menor al 10%, y las poblaciones más vulnerables no tienen acceso a un diagnóstico y tratamiento, por causas socioeconómicas [4,5,9,10].

Actualmente el tratamiento médico se ve limitado entre dos fármacos, el benznidazol (BNZ) y el nifurtimox (NFX) (Figura 2). Ambos son derivados de nitroheterocíclicos, los cuales son eficaces sólo cuando son administrados en fases aguda o tempranas de la enfermedad; lamentablemente en la fase crónica su efectividad baja. Por otra parte, ambos fármacos presentan efectos adversos graves, como: náuseas, anorexia, síndromes gastrointestinales, alergias, insomnio, irritabilidad, parestesia, etc. Otros inconvenientes que se pueden presentar durante el tratamiento son: la aparición de cepas resistentes, el tratamiento no es apropiado para el período de embarazo, no existen formulaciones pediátricas y factores económico-sociales [11-15]. Se demuestra la urgencia y necesidad de nuevos tratamientos más seguros, menos tóxicos y más eficientes en todas las etapas de la enfermedad. Por lo que, surge la necesidad de diseñar nuevos compuestos más efectivos que produzcan menos efectos secundarios.

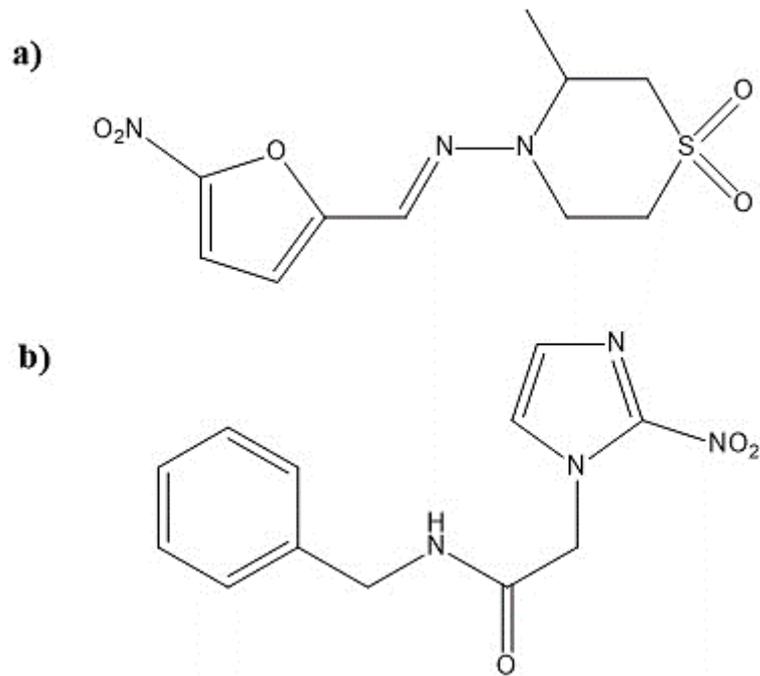


Figura 2: Estructura química de los tratamientos actuales: nifurtimox (a) y benznidazol(b).

El mecanismo de acción de los dos fármacos usados en el tratamiento de la EC (NFX y BNZ), aún no está completamente dilucidado. Sin embargo, se sabe que podrían funcionar como profármacos [15,16] y que ambos se activan en el interior del parásito por acción de las nitrorreductasas (NTR) que reduce el grupo nitro, lo que da lugar a la formación de radicales libres capaces de generar estrés oxidativo en la célula y/o generar metabolitos electrofílicos que dañan o inhiben o disminuyen la actividad de moléculas biológicamente activas (enzimas y ADN). Este proceso se muestra con más detalladamente en la figura 3 [15,17].

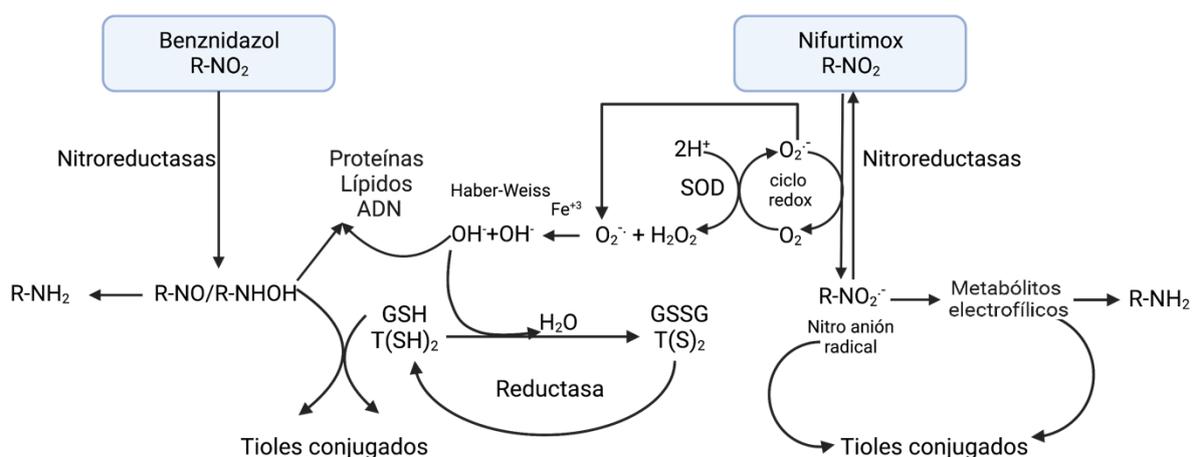


Figura 3: Mecanismo de reducción de los fármacos clínicos Benznidazol y Nifurtimox. [18]

En este contexto se han descrito múltiples moléculas, ligantes y metales con propiedades tripanocidas, en donde, el diseño racional de moléculas activas ha tomado un papel fundamental; y también el estudio de los diversos mecanismos que conlleven a la muerte del parásito o a la disminución de la tasa de infectividad de órganos blanco [19].

Se han investigado diversas familias de compuestos, y entre ellas destacan las cumarinas. Estas están formadas por un anillo de benceno fusionado a un anillo α -pirona (Figura 4). Esta estructura permite la adición de diversos grupos funcionales, lo que ha llevado a la síntesis e identificación de una gran variedad de derivados de cumarinas con diversas funciones biológicas de interés [20-22]. Entre las funciones biológicas que se han registrado para derivados de cumarina se encuentra la antiparasitaria [23,24], antioxidante [25], antiviral [26], antiinflamatoria [22], anticancerígena [27], entre otras. Es importante destacar que el grupo de trabajo de Radicales Libres y Antioxidantes de la Universidad de Chile ha observado actividad tripanocida moderada en los 4-acyloxy-3-nitrocumarinas en estudios previos. Esta actividad se debe al estrés oxidativo generado por la formación de aniones radicales nitro [23]. Todo esto ha despertado un gran interés en la investigación y desarrollo de nuevos derivados de cumarinas, ya que estudios previos sugieren que estos compuestos poseen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades.

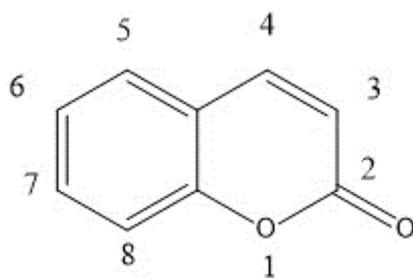


Figura 4: Estructura base de cumarina (2H-cromen-2-ona).

La disrupción de biomoléculas o la alteración de mecanismos importantes para la supervivencia del parásito es una buena alternativa para crear nuevos tratamientos. Hay estudios que describen la capacidad de inducir daño al ADN y disfunciones en la mitocondria que llevan a la apoptosis de células cancerígenas por parte de compuestos con el grupo bioactivo tiosemicarbazonas [28], aunque no fue un estudio en *T. cruzi*, se sabe que los parasitarios y las células cancerígenas guardan ciertas similitudes, como la rápida división celular, estrategias de defensa y evasión del sistema inmune, alta demanda de glucosa, etc.[29]. Aunque, hay otros estudios en 2-piridina tiosemicarbazona en *T. cruzi* donde se obtuvo actividad tripanocida y se observó inhibición de la cruzipaína [30], posiblemente por interacciones con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (figura 5) [31]. También, se ha descrito que las tiosemicarbazonas forman parte de una clase de ligantes, con átomos dadores de electrones como el nitrógeno (N) y el azufre (S), y estructuras resonantes que le confieren estabilidad y la capacidad de hacer múltiples uniones (mono-, di- y hasta tridentado), convirtiéndolo en un ligante versátil y prometedores para su uso en la síntesis de nuevos compuestos bioactivos (Figura 6). Además, el grupo tiosemicarbazona presenta un

tamaño reducido y una lipofilia favorable que facilita la penetración de la membrana celular y, por lo tanto, más biodisponibles. Por otro lado, su bajo costo, su carácter no peptídico [31] y actividad tripanocida prometedora [29,30], convierten a las tiosemicarbazonas en una opción atractiva para el desarrollo de medicamentos tripanocidas.

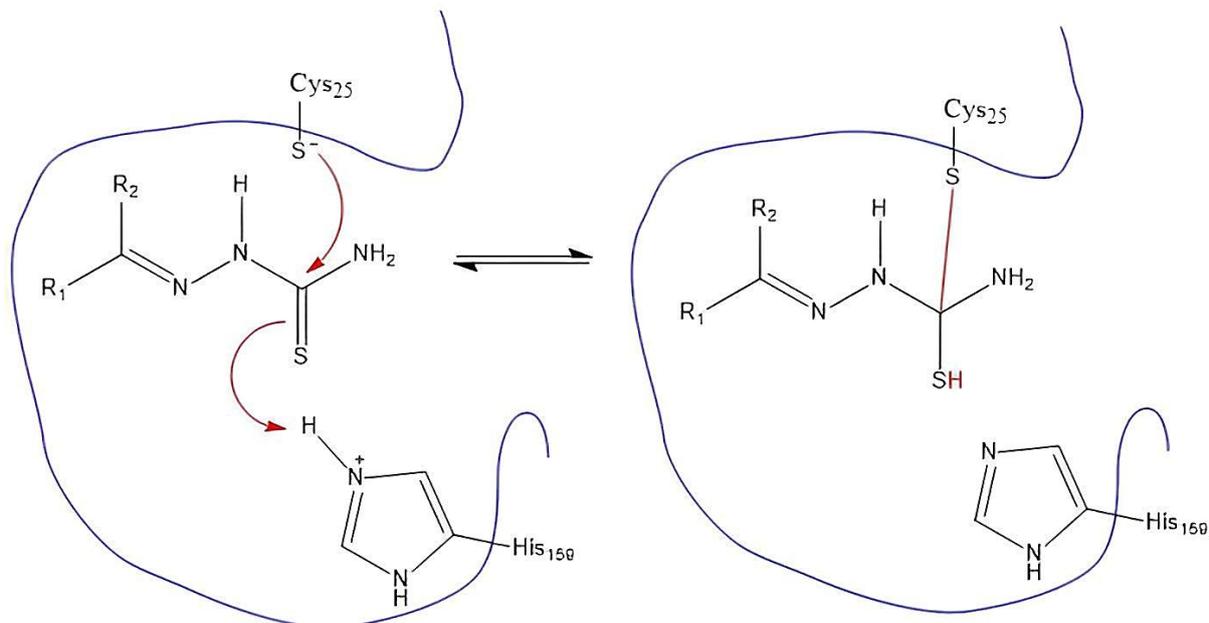


Figura 5: Posible interacción del grupo tiosemicarbazona con el sitio activo de la cruzipaina.

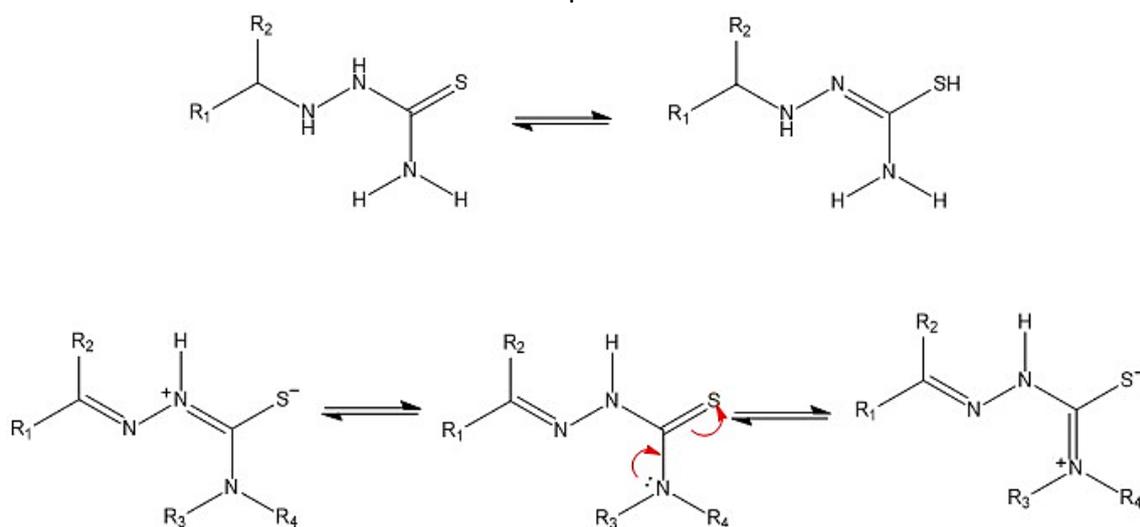


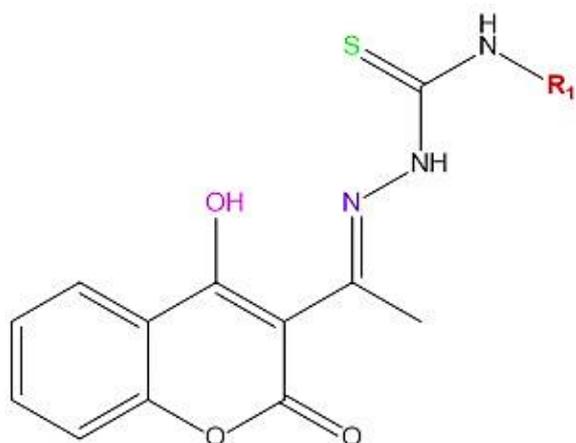
Figura 6: Formas resonantes del grupo tiosemicarbazona. Tautomería tiona-tiol.

La química bioinorgánica, es un área de la química que ofrece nuevas herramientas y tácticas para el diseño de agentes terapéuticos nuevos, además de ayudar a eludir posibles resistencias. Un ejemplo del aporte de la inorgánica a la medicina sería el uso del cisplatino para el tratamiento del cáncer [31-33]. A pesar de la probabilidad de que fármacos basados en metales interactúen con más de un objetivo o pueden sufrir reacciones redox *in vivo* o intercambiar ligantes [29]. Se han realizado estudios donde uno o varios compuestos bioactivo orgánico son asociación a un centro metálico (como el platino, cobre, rutenio,

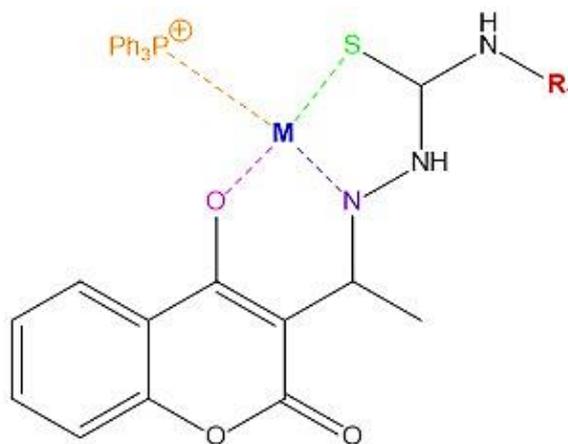
hierro, renio, níquel, iridio, etc.) [32-36] para conformar una unidad molecular multifuncional estable que reduce la citotoxicidad del metal por inhibición de la reducción de este por interacciones con biomoléculas. Además, se espera que los compuestos bioactivos utilizados como ligantes mantengan su actividad o que actúen sobre biomoléculas fundamentales para el parásito y no del huésped [29]. Con el fin de modular las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, lo que llevara a una mejora en la selectividad, efectividad y toxicidad.

Como se mencionó anteriormente el Platino (Pt) es un metal de transición utilizado previamente con fines terapéuticos [29,31,36,37], con dos posibles estados de oxidación +2 y +4, capaces de coordinar con geometría octaédrica (d6) y cuadrada plana (d8). Además, es un ácido de Lewis y un metal blando que interactúa con ligantes que tengan S, N y P [31]. Asimismo, el Paladio (Pd) es otro metal del grupo 10, que comparte muchas características con el Pt, sin embargo, su comportamiento es más lábil, lo que puede llevar a una mayor toxicidad [31]. Esto se podría modular usando ligandos con átomos dadores de electrones (N y S), como lo es la tiosemicarbazona. Y también ha sido utilizado como centro metálico en tratamientos médicos vigentes o potenciales [29,31,38]. Cabe destacar que estos metales han presentado la capacidad de intercalarse con el ADN (siendo el Pd más activo que el Pt) y en estudios de complejos Pd/Pt con N-óxido de piridina-2-tio se observó la inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa [29].

Teniendo en cuenta las múltiples estrategias de diseño de fármacos antes mencionadas, como el uso de metales de transición y su asociación con ligantes orgánicos diseñados racionalmente para crear una entidad estable y multifuncional con actividad biológica de interés y propiedades fisicoquímicas favorables. Se propone el estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de una serie de ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y complejos monolépticos con Pt y Pd. Donde los sustituyentes de la fracción tiosemicarbazona (R₁: metilo y fenilo) modularan la lipofilia de los compuestos y por consiguiente su biodisponibilidad de los mismos (Figura 7). Esperando que los resultados de este estudio proporcionen información válida para el diseño de tratamientos más efectivos y seguros en el futuro.



R₁: Metil o Fenil



M: Pt o Pd

Ligantes libres		L ₁ : Metil	
		L ₂ : Fenil	
Complejos	Pd	SR02	[PdClL ₁ PPh ₃]
		SR04	[PdClL ₂ PPh ₃]
	Pt	SR05	[PtClL ₁ PPh ₃]
		SR08	[PtClL ₂ PPh ₃]

Figura 7: Estructura molecular de los ligantes libres y sus respectivos complejos. Además, del código de identificación.

HIPÓTESIS

Los derivados híbridos de cumarina-tiosemicarbazona tendrán actividad tripanocida la cual estará modulada por la lipofilia de los sustituyentes; cuyo mecanismo de acción tripanocida ocurre a través de estrés oxidativo en el parásito *T. cruzi*. Asociado a la variación del potencial de membrana mitocondrial del parásito. Asimismo, la formación de complejos con Pd y Pt mejorará la actividad tripanocida por aumento de la permeabilidad en membrana del parásito.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación estructura-actividad y mecanismo de acción tripanocida de los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y los complejos de Pd y Pt.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el mecanismo de reducción de los compuestos a través de la Voltametría Cíclica (VC), espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE) e índice de Fukui.
2. Estudiar la permeabilidad en membrana artificial y la actividad de los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y los complejos de Pd y Pt sobre células de mamíferos (EaHy) y la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*.
3. Determinar un posible mecanismo de acción tripanocida, asociado a la generación de estrés oxidativo en la forma tripomastigote de *T. cruzi*, a través de la determinación del potencial de membrana mitocondrial.

METODOLOGÍAS

1. REACTIVOS Y EQUIPOS

1.1) Reactivos

Para los análisis electroquímicos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), perclorato de tetrabutilamonio (PTBA), nitrógeno (N₂) y metanol (MeOH). En el caso de los ensayos biológicos se prepararon soluciones stock de los compuestos en estudio a 20 mM en DMSO y se utilizó bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), suero fetal bovino, solución antibiótica de penicilina y estreptomycin, tritón, nifurtimox, solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% en HCl 0,01 M, medio de cultivo RPMI, medio de cultivo DMEM, *m*-clorofenil carbonilcianuro (CCCP), fenazina, éster metílico de tetrametilrodamina (TRME) y alcohol 70%. Finalmente, para los ensayos de lipofilia se utilizó fosfatidilcolina, dodecano, dimetilsulfoxido, agua destilada y acetona.

1.2) Equipos

Se utilizó un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9,85 GHz), un potenciostato *Metrohm 797 VA*, un lector de microplacas (Asys Expert Plus®), electrodo de platino, electrodo de Ag/AgCl (KCl), electrodo barra de grafito y electrodo de gota colgante de mercurio.

1.3) Otros

Material vivo (parásitos tripomastigotes de la cepa Dm28 y células (EaHy), cubeta de cuarzo, placas de 96 pocillos Asys Expert Plus y placas de Transwell.

2. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS

2.1) Voltametría cíclica (CV) [39-41]

La voltametría cíclica (CV) es una de las técnicas más utilizadas para obtener información cualitativa de un sistema que contenga una especie electroactiva, donde se observan procesos que involucran reacciones electroquímicas. De esta técnica se puede obtener diferentes parámetros, como: los potenciales de pico catódico (E_{pc}) y anódico (E_{pa}), la diferencia de potencial (ΔE), las corrientes de pico catódico (I_{pa}) y anódica (I_{pc}), y el cociente entre estas (I_{pa}/I_{pc}).

El estudio se realizó en un equipo *Metrohm 797 VA*, en medio aprótico, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, perclorato de tetrabutilamonio (PTBA 0,1 M) como electrolito soporte, un electrodo de gota colgante de mercurio como electrodo de trabajo, Ag/AgCl (KCl 3M) como electrodo de referencia y una barra de grafito como contraelectrodo. Todas las mediciones se realizaron previo burbujeo con nitrógeno (N₂) por 10 min.

Los complejos fueron estudiados a una concentración constante a través de barridos de potencial a diferentes velocidades (0,5 a 2,5 V/s), y los datos obtenidos fueron procesados en el programa *Origin 8.5*.

2.2) Espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE) [23,41]

La espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE) es una técnica espectroscópica que permite la detección y caracterización de especies paramagnéticas, es decir, moléculas que presentan electrones desapareados, como lo son los radicales libres; permitiendo dilucidar la densidad electrónica que presentan tales moléculas. Aunque, dichos radicales deben ser lo suficientemente estables como para ser detectados.

El estudio se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9,85 GHz) con una cavidad rectangular y una modulación de campo de 50 kHz. Donde se realizó reducción *in situ* de los compuestos en estudio con el fin de generar especies radicalarias. Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito soporte y un alambre de platino como electrodo de trabajo. Y se aplicó los potenciales determinados por voltametría cíclica (CV).

3. BIÓLOGICOS

3.1) Actividad biológica en células EaHy y *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c [23,42,43]

Todos los cultivos celulares utilizados en este estudio *Trypanosoma cruzi* en estado tripomastigote y las células de mamífero (EaHy), se obtuvieron del programa de farmacología molecular y clínica del instituto de ciencias biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.

La cuantificación del número de células viables se realizó a través de un ensayo colorimétrico, que utiliza sales de tetrazolio (MTT). El MTT posee una facilidad de difusión, solubilidad y característico color (amarillo, 490 nm) de fácil medición. Por otro lado, las células vivas son capaces de reducir el MTT a un compuesto insoluble, que se acumula en el interior de la célula y cuya coloración es azul violáceo (570 nm), el formazán (Figura 8). Por lo tanto, la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas.

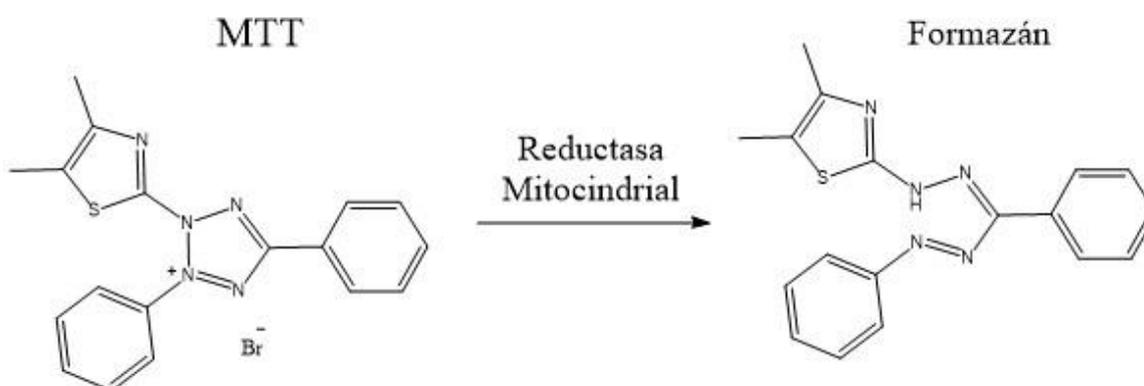


Figura 8: Reducción de MTT a Formazán por acción enzimática.

3.2) Citotoxicidad en células sanas (EaHy)

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM con rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de antibiótico (100 mg/mL penicilina y 100 mg/mL estreptomicina) y en un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C durante 2 días. Luego, las células fueron cosechadas y resuspendidas en medio de cultivo a una densidad final de 5*10⁴ células/mL. Posteriormente, fueron sembradas e incubadas con los compuestos en estudio (previamente disueltos en DMSO) en un rango de concentración de 10µM a 200 µM, durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Como control positivo se utilizó tritón y control negativo células sanas sin tratar.

Finalizado el tiempo de incubación, se agregó 10 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Terminado el tiempo, se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% en HCl 0,01 M para solubilizar el formazán producido, y se dejó en agitación por 12h.

Se realizó la medición en un lector de microplacas (Asys Expert Plus©) a 570 nm y los datos obtenidos fueron procesados en *Prism 5*.

3.3) Cultivo y recolección de parásitos

Los tripomastigotes se obtuvieron de la infección de células VERO con tripomastigotes (cepa Dm28c) de un cultivo previo en una proporción de células/parásitos 3:1, después de 3 a 7 días de incubación a 37°C, 5% CO₂ y en medio de cultivo RPMI con 5% de SBF inactivado. Se realizó la cosecha de los parásitos, siguiendo el siguiente procedimiento. Se recogió el sobrenadante, se centrifugó y se conservó el sobrenadante, luego se realizó una segunda centrifugación a 6000 rpm por 10 min a 4°C, para obtener los tripomastigotes, se resuspendieron en RPMI sin rojo fenol y la solución se llevó a una concentración de 10*10⁶ parásitos/mL.

3.4) Citotoxicidad en parásitos

Los parásitos fueron sembrados con los compuestos en estudio (previamente disueltos en DMSO) en un rango de concentración de 25µM a 400 µM en un volumen total de 300 µL e incubados por 24 a 32 horas a 37° C y 5% CO₂. Se utilizó como control positivo Nifurtimox y como control negativo parásitos sin tratar.

Terminado el tiempo de incubación se agregó 30 µL de MTT con fenzina y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego, se agregó 300 µL de SDS al 10% HCl 0,01N a cada ependorf y se dejó agitando por 12 horas aproximadamente. Por último, se llevaron las soluciones a una placa de 96 pocillos, se realizó la medición a 570 nm en un lector de microplacas Asys Expert Plus© y los datos fueron tratados en el programa *Prism 5*.

3.5) Potencial de membrana mitocondrial en parásitos [24]

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó por incorporación de la sonda fluorescente TMRE (éster metílico de tetrametilrodamina).

Se sembraron los tripomastigotes de la cepa Dm28c (10^7 parásitos/mL) con los compuestos en estudio (a 100 μ M y 200 μ M) en 300 μ L de parásitos y se incubó por 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Se utilizó como control positivo CCCP (*m*-clorofenil carbonilcianuro, 10 μ M) y como control negativo parásitos sin tratamiento.

Pasadas las 2 horas de incubación se realizó una centrifugación a 6000 rpm por 10 min a 4°C, se lavó con PBS, se volvió a centrifugar (mismas condiciones) para eliminar exceso de compuesto. Después se agregó medio RPMi y las suspensiones se incubaron con TRME (10 μ L, 200 mM) por 20 min. Terminado el tiempo, se volvió a centrifugar (a 6000 rpm por 10 min a 4°C), se lavó con PBS, se agregó medio (300 μ L RPMi) para retirar el exceso de sonda TMRE y finalmente se llevaron las suspensiones a una placa de 96 pocillos.

La tasa de incorporación de la sonda se determinará por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm. Y los resultados se expresaron en porcentaje de incorporación de TMRE versus los compuestos, utilizando la ecuación 1.

$$\%TMRE = \frac{R_{compuesto}}{R_{control}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

4. DETERMINACIÓN DE LA LIPOFILIA

4.1) Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela (PAMPA) [44]

El PAMPA es un ensayo de permeabilidad que permite evaluar la difusión pasiva de compuestos potencialmente activos, ya que la membrana lipídica de fosfatidilcolina, que simula la bicapa lipídica no presenta transporte activo.

Se utilizó una placa Transwell con dos tipos de pocillos: donante(superior) y aceptora (inferior). En el pocillo donante se encuentra una membrana semipermeable artificial de polifluoruro de vinilideno (PVDF), en esta se depositó 4 μ L fosfatidilcolina en dodecano, se dejó evaporar el solvente por 5 min. Luego se agregó 300 μ L de solución acuosa 10% DMSO en el pocillo aceptor y en el pocillo donante se añadieron 200 μ L de los compuestos en estudio solubilizado en 10% DMSO: H₂O. Se dejó en agitación entre 80 y 100 rpm a 30°C.

Las mediciones se realizaron tomando 100 μ L de muestra y se le añadió 1mL de DMSO. Además, la determinación de la concentración de los compuestos se realizó por espectrofotometría, a través de la interpolación de una curva de calibración previamente realizada.

Los ensayos se realizaron por duplicado y los porcentajes de permeabilidad se calcularon usando las ecuaciones 2, 3 y 4.

$$\% \text{ Retención} = \frac{[C]_{P.Donora a t}}{[C]_{P.Donora a t0}} * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\% \text{ Permeabilidad} = 100 - \% \text{ Retención} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$Pe = \frac{-218.3}{t} * \log \left[1 - \frac{2 C_A(t)}{C_D(0)} \right] * 10^{-6} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde: En la ecuación 2, el dividendo correspondiente a la concentración de la placa donara a t (horas) y el divisor es la concentración de la placa donadora al inicio (a t= 0). La ecuación 4, muestra la permeabilidad efectiva donde t es tiempo, $C_A(t)$ es la concentración de la placa aceptora en función del tiempo y $C_D(0)$ es la concentración de la placa dadora al inicio (t=0).

5. CÁLCULOS COMPUTACIONALES

5.1) Índices de Fukui y simulaciones [45]

Los índices de Fukui forman parte de las herramientas teóricas computacionales actuales que permiten obtener información sobre la energía, estructura y propiedades de los átomos y moléculas. Estos entregan información sobre la susceptibilidad de los átomos del sistema de ser atacados por un nucleofílico (f+) o electrofílico (f-).

Los índices de Fukui fueron calculados utilizando el programa *Gaussian09* para los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona SR10 (metil) y SR12 (fenil), simulado en DMSO como solvente; y cuyos resultados se presentan en Anexo 1.

Por otro lado, se realizó la simulación de los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona SR10 (metil) y SR12 (fenil) en *mcule* [46] para obtener el coeficiente de lipofilia (log P).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) ELECTROQUÍMICA

1.1) Voltametría cíclica (CV)

El comportamiento electroquímico de todos los compuestos se estudió por medio de voltametría cíclica a través de barridos de potencial a diferentes velocidades, para evaluar la influencia del sustituyente de la fracción tiosemicarbazona y el metal central (Pd y Pt) sobre los potenciales de reducción, lo que indica la facilidad que tienen los compuestos para captar electrones, además, esta técnica nos proporciona información sobre la reversibilidad de los procesos y un posible mecanismo.

En la figura 9, se muestran los voltamogramas correspondientes a los ligantes libres (SR10 y SR12) en el rango de potencial permitido por el solvente. En los voltamogramas se presentan dos señales en el sentido de la reducción, la primera a $-0,5V$ (I_c) aproximadamente y la segunda (II_c) entre los $-1,2 V$ a los $-1,5V$. Se postula que la diferencia de los potenciales registrados para ambos compuestos (Tabla 1), se debe a la influencia del grupo sustituyente R en la tiosemicarbazona. En donde, el efecto inductivo del grupo metilo desplaza los potenciales hacia valores más negativos a diferencia del grupo fenilo.

Asimismo, los voltamogramas correspondientes a los ligantes híbridos (figura 9), presentan señales similares que exhiben dependencia entre la velocidad de barrido y la intensidad de corriente. De acuerdo con lo descrito por Justim & Bohs [39] la segunda señal correspondería a la reducción irreversible del doble enlace carbono-nitrógeno de la tiosemicarbazona y la cupla aparentemente cuasi-reversible a potenciales menos negativos correspondería a la reducción del carbonilo del éster cíclico, esta señal no es reversible, porque la intensidad del pico catódico y anódico no son similares, lo que significa que la cantidad de compuesto que se reduce no es la misma que se oxida.

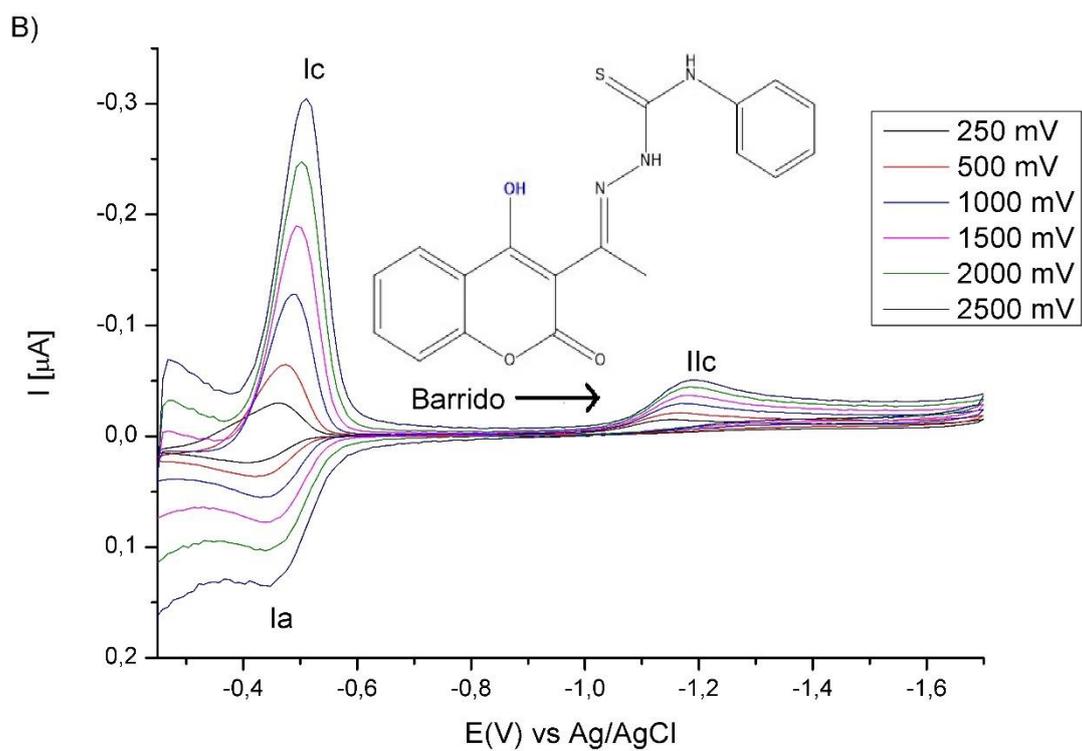
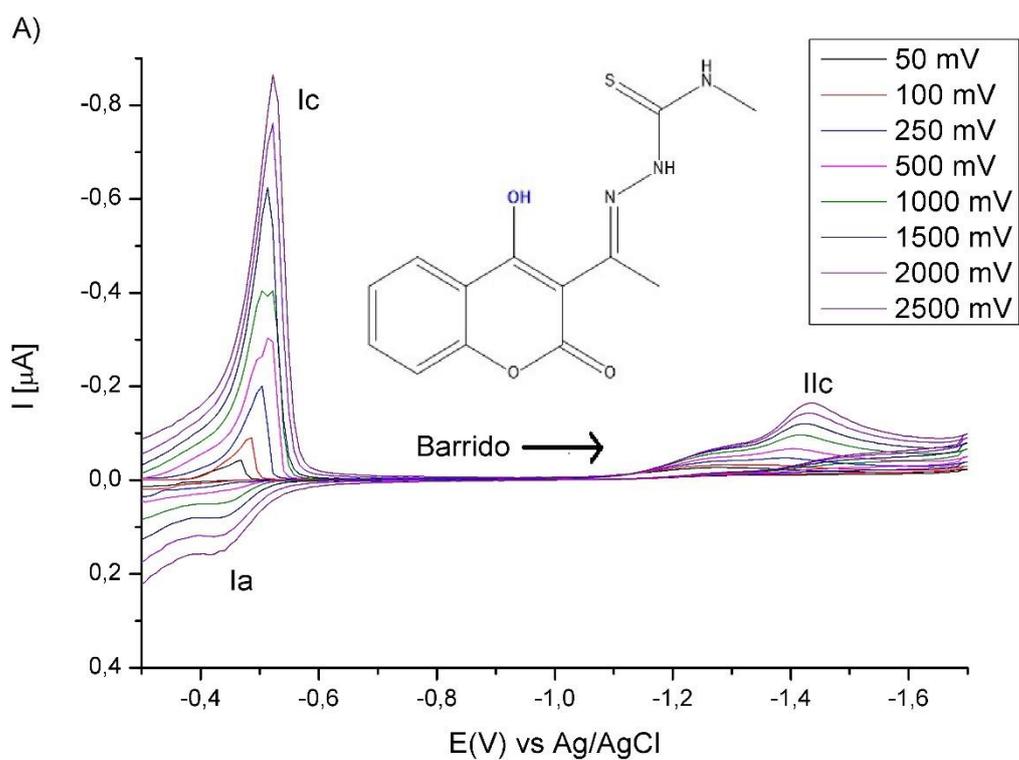


Figura 9: Voltamogramas de los compuestos SR10 (A) y SR12 (B), con sus respectivas estructuras.

El cociente de la intensidad de corriente catódica y anódica (I_{pa}/I_{pc}) y el diferencial de potencial (ΔE), son criterios de reversibilidad de Nicholson & Shain, 1964 [47], y se muestran a continuación en la ecuación 5 y ecuación 6, respectivamente.

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1 \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\Delta E = E_c - E_a = \frac{60 \text{ mV}}{n} \quad (\text{Ecuación 6})$$

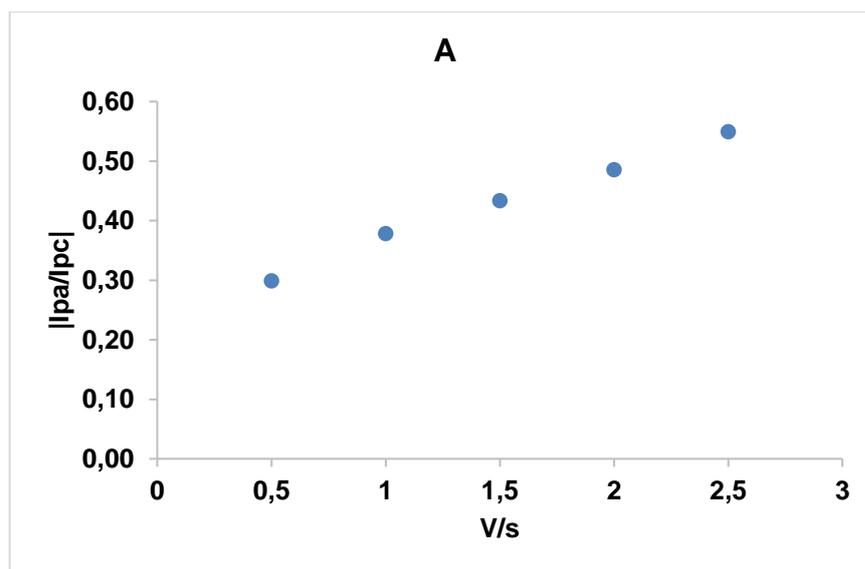
Donde n = número de electrones.

La relación entre intensidad anódica/ catódica es un criterio de reversibilidad, y para determinar su valor es necesario obtener los valores absolutos de las corrientes y aplicar la ecuación 7:

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| = \frac{I_{pa_0}}{I_{pc_0}} + \frac{0,485 * I_{p\lambda_0}}{I_{pc_0}} + 0,086 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde: la intensidad anódica y catódica (I_{pa_0} e I_{pc_0}), corresponde al valor máximo obtenido en el voltamograma. Y la intensidad de switching ($I_{p\lambda_0}$), corresponde a la intensidad obtenida en el potencial de switching o “el potencial límite” donde se invierte la dirección de barrido.

Al aplicar los criterios de reversibilidad anteriormente descritos (ecuación 5 y 6) y que se muestran en la Tabla 1 y en la figura 10. Se postula que la primera cupla de SR10 corresponde a una transferencia electrónica cuasi-reversible y que SR12 es una reacción química reversible seguida de una transferencia monoeléctronica reversible ($\Delta E_p=60\text{mV}$) [47].



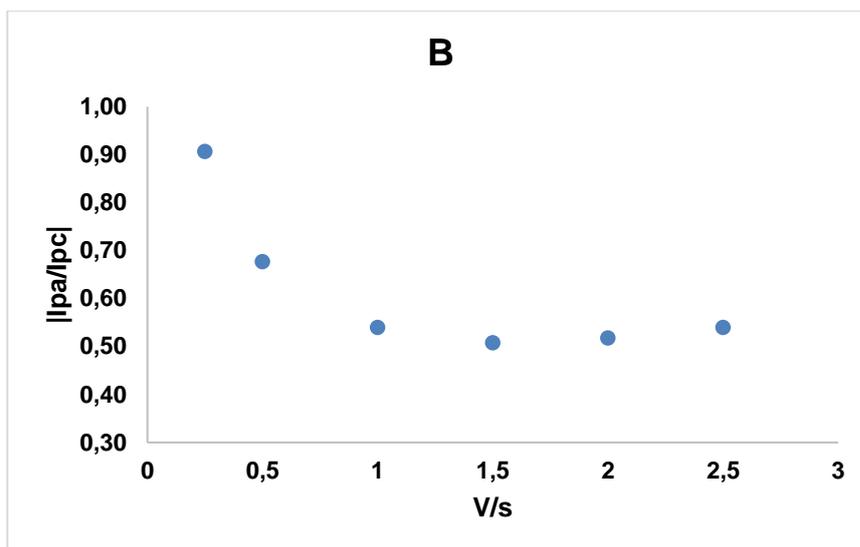


Figura 10: Relación de intensidad de corriente catódica/ anódica respecto a la función de barrido (V/s) para los ligantes SR10 (A) y SR12(B).

En relación con las señales que aparecen a potenciales menos negativos, Z. Stunić, 1979 [48] describió una posible aromatización del anillo pirano y en el caso de tener grupos atractores de electrones en posición 3, puede ocurrir la apertura del anillo como se muestra en la figura 11. Asimismo, en este mismo estudio se presentan una 3-fenilhidrazona-4-hidroxicumarina, que presentó un $E_{p1/2}$ de -0,496 [48], valor muy similar a los potenciales obtenidos en la serie de compuestos para la primera cupla (tabla 1). Por otro lado, Justim & Bohs, 2021 [39] describe que los derivados isatina-tiosemicarbazona sufren procesos de reducción, como la reducción de la cetona a hidroxilo y la reducción irreversible del grupo tiosemicarbazona a amina y tiourea; donde ambos ocurren en dos pasos e involucran la generación de un intermediario radicalario. Teniendo esto en cuenta, se propone un mecanismo de reducción para la primera cupla (figura 12), donde la cetona se puede reducir a través de la transferencia de electrones (\bar{e}) o mediante la transferencia de electrones de una molécula con un electrón desapareado (A^*) a otra molécula generando el anión correspondiente. Y se propone otro mecanismo de reducción para la segunda señal catódica que aparece a potenciales más negativos para los ligantes híbridos de cumarina-tiosemicarbazona y que es asociado a reducción del enlace imino del grupo tiosemicarbazona y la ruptura del enlace N-N del grupo tiosemicarbazona (figura 13).

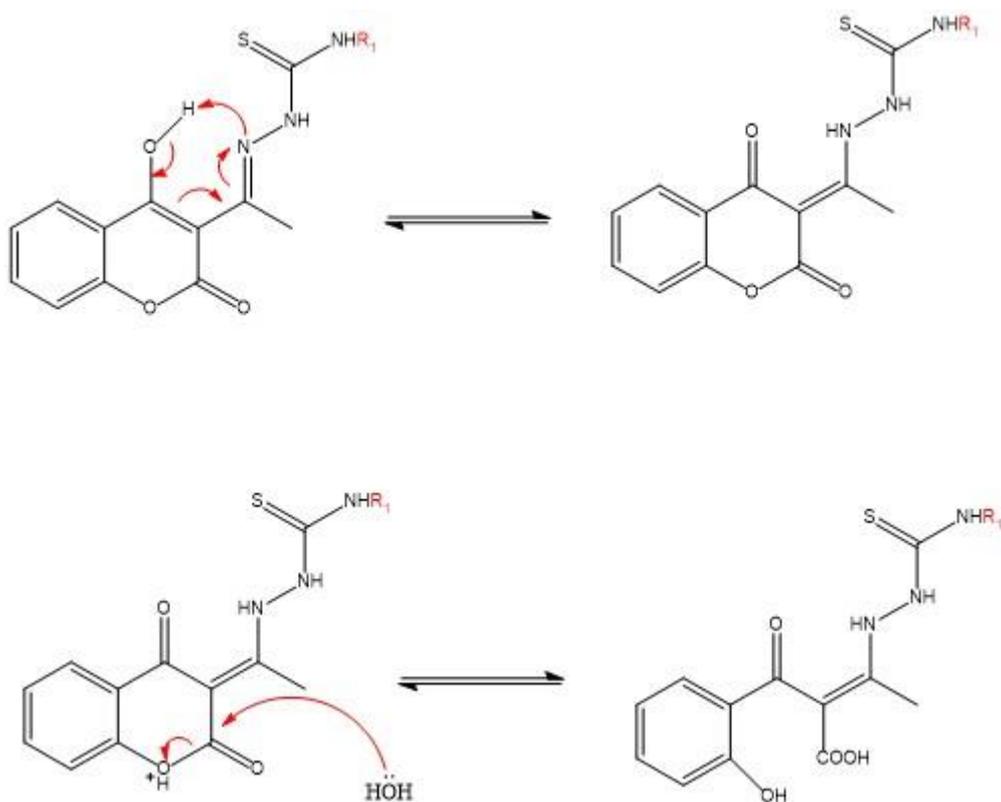


Figura 11: Reordenamiento tautomérico y apertura del anillo pirona.

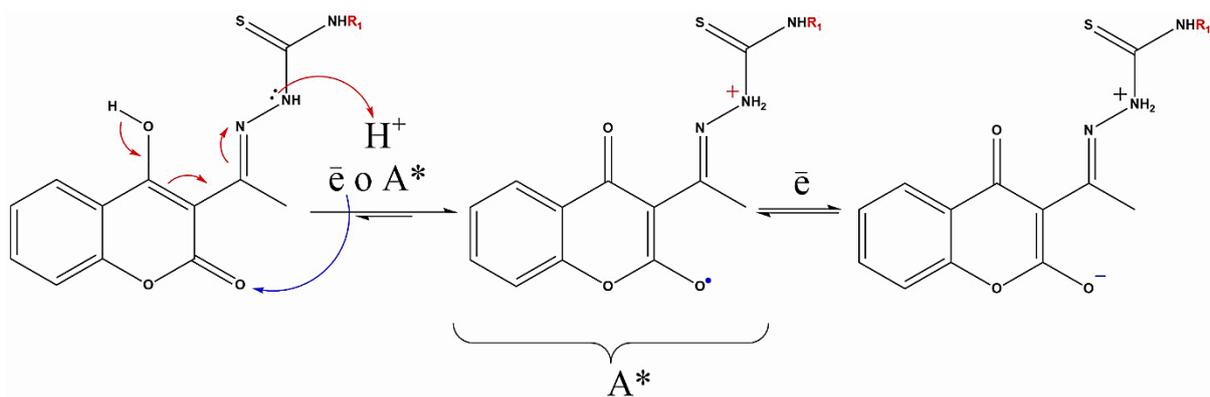


Figura 12: Propuesta de mecanismo de reducción de la cetona.

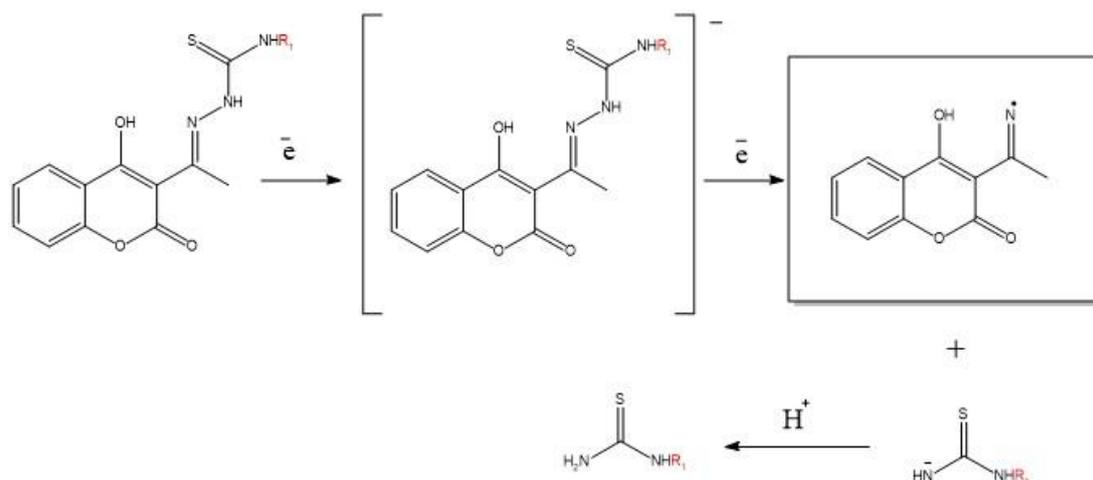
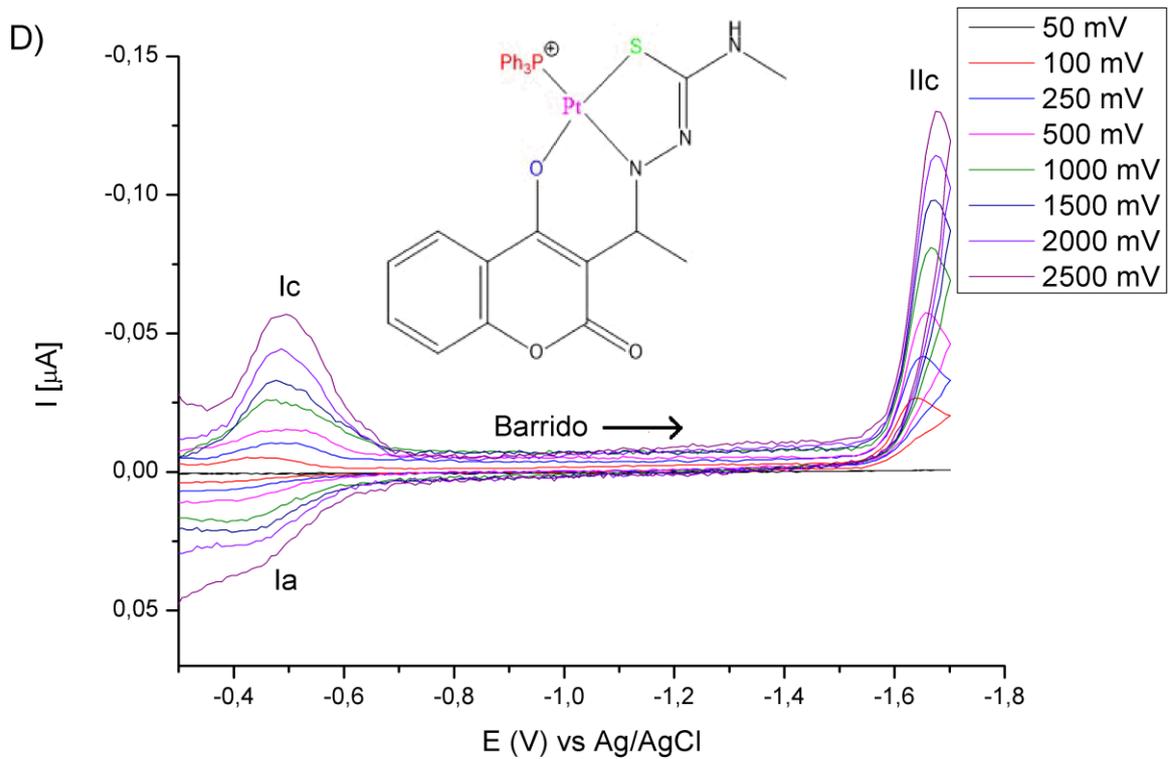
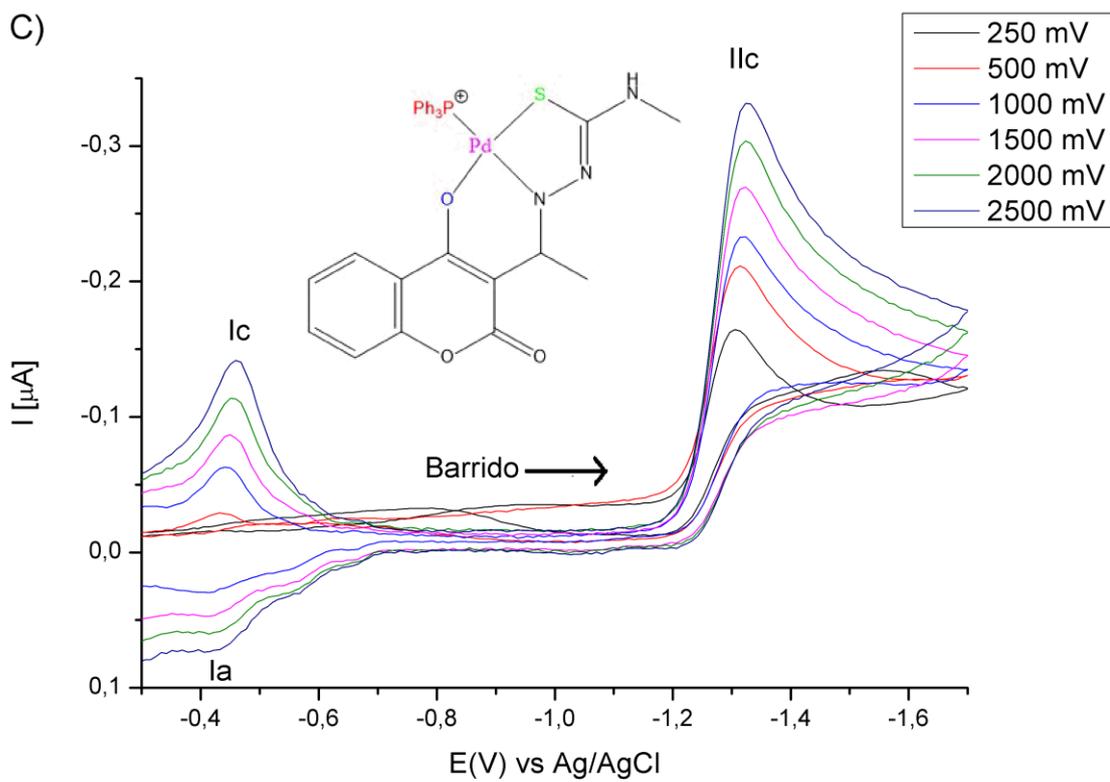


Figura 13: Mecanismo de reacción del ligante híbridos cumarina-tiosemicarbazona, basado en la bibliografía [39, 49]. Descrita a -1,6V.

Los voltamogramas de los complejos estudiados se muestran en la figura 14; donde SR05 y SR08 son complejos de platino y SR02 y SR04 son complejos de paladio. Se observa que los compuestos de coordinación con el mismo centro metálico tienen similar forma y potencial de reducción para las curvas que aparecen a potenciales más negativos (-1.2 V a -1.7V). Sin embargo, al analizar más detalladamente los potenciales de reducción (tabla 1), se corrobora la influencia del sustituyente R sobre el potencial de reducción, ya que los complejos con el grupo metilo tienen potenciales más negativos en comparación al grupo fenilo. Además, se destaca que los compuestos de paladio sufren un aumento en el potencial de reducción de la segunda cupla en comparación a los complejos de platino. La diferencia de potenciales entre complejos de igual ligante, pero con diferente centro metálico radica en la blandura de este, ya que el Pd es menos blando que el Pt, causando una disminución de densidad de carga en el ligante, lo que permite con mayor facilidad la captación de electrones, o sea, su reducción.



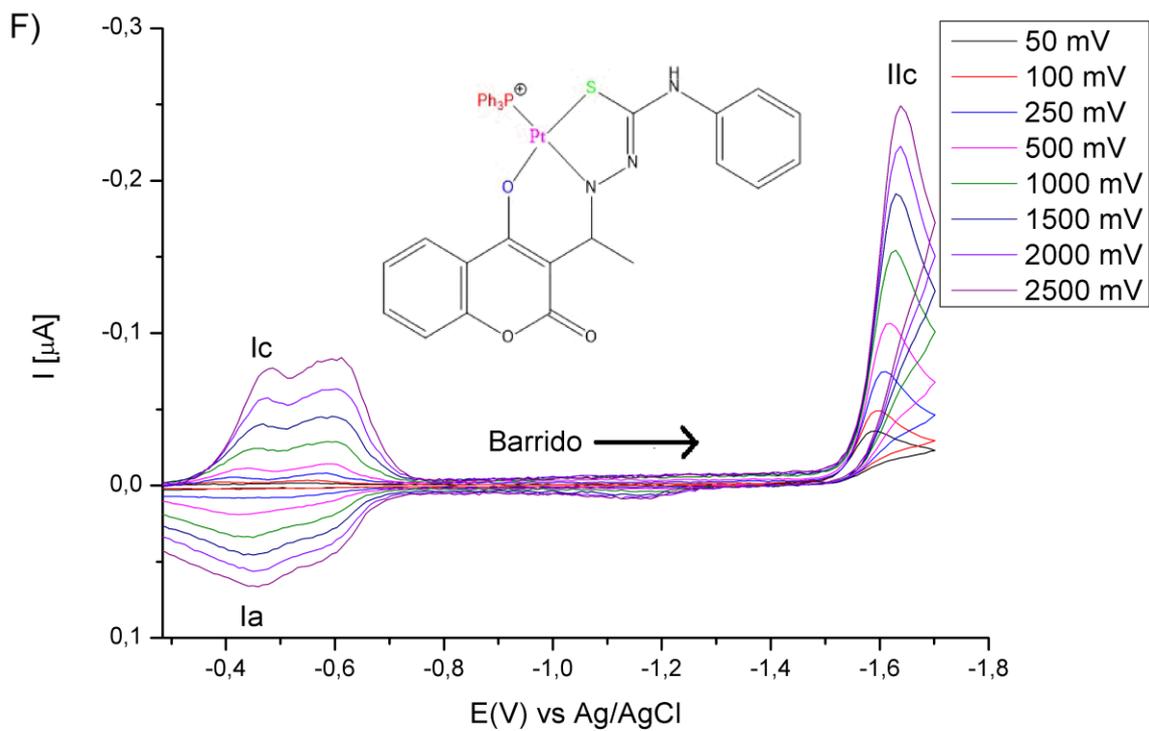
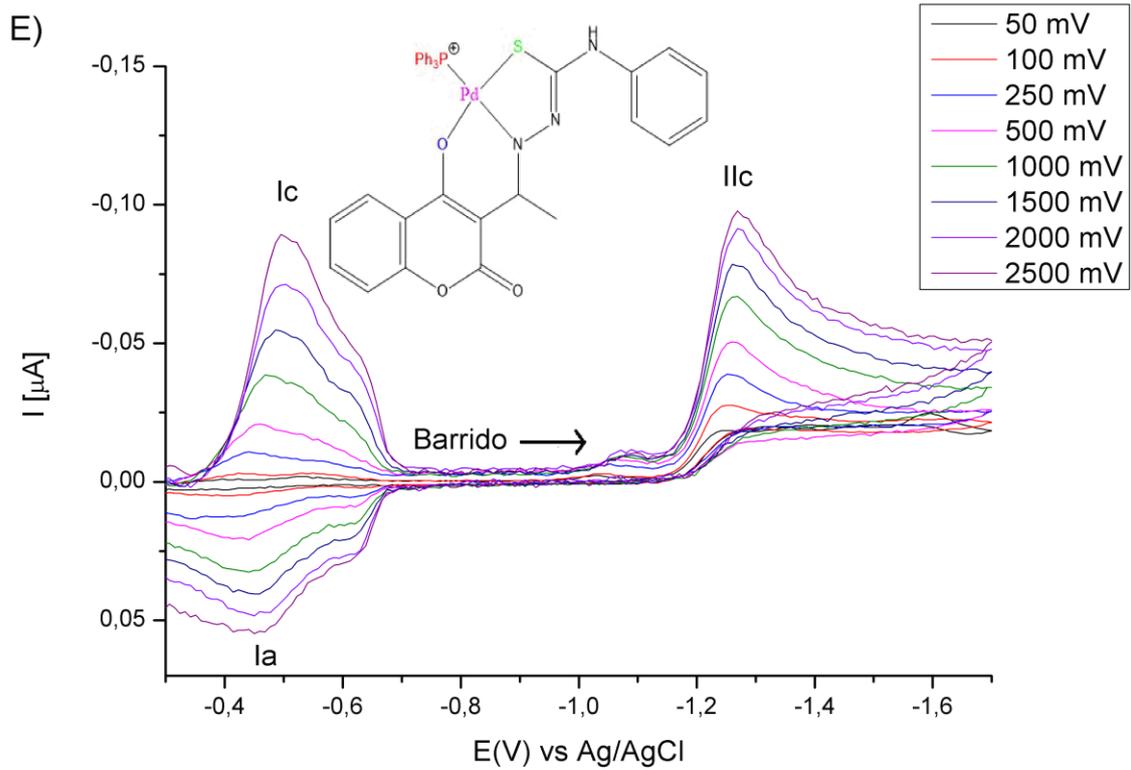
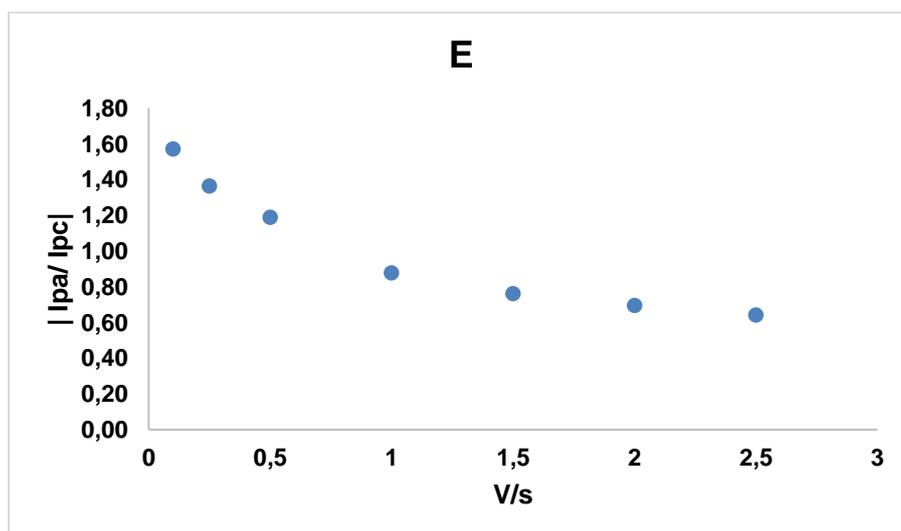
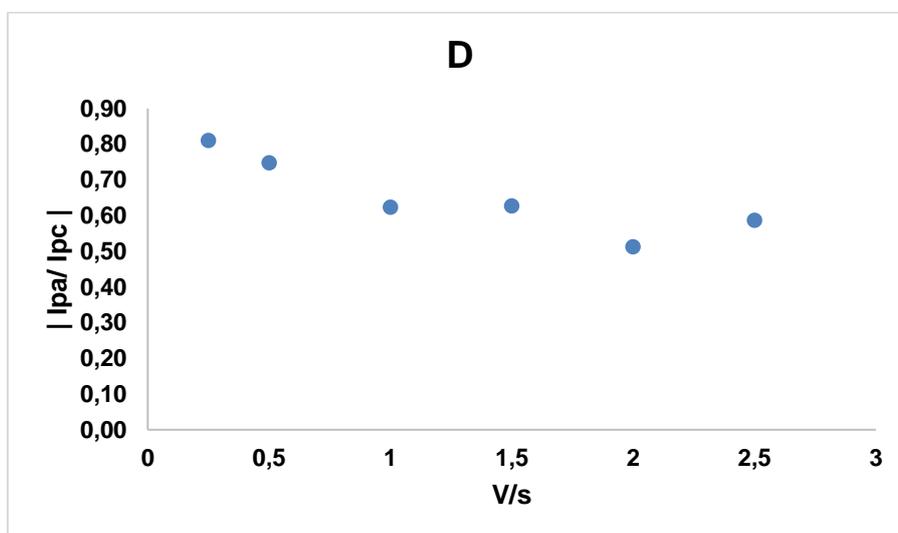
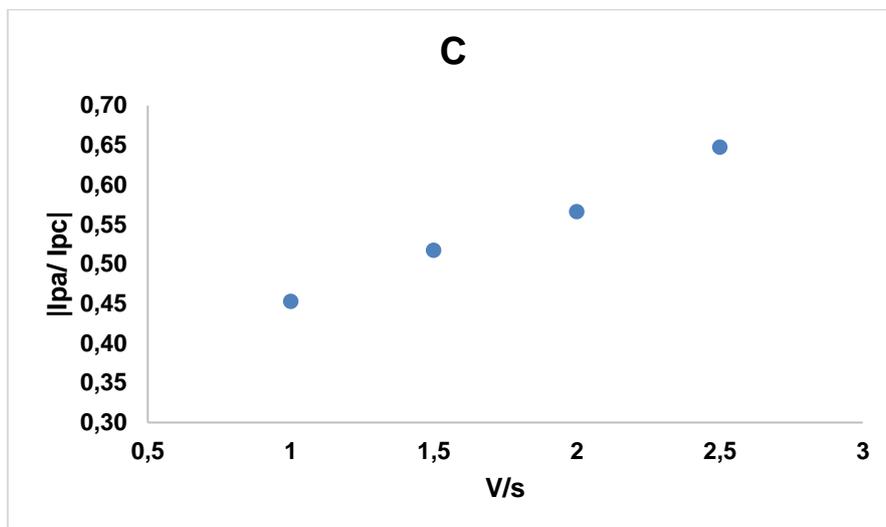


Figura 14: Voltamograma de los SR02(C), SR05(D), SR04(E) y SR08(F) con las cuplas asignadas.

Los complejos al igual que los ligantes presentaron cuplas aparentemente reversibles a potenciales superiores a los -0,7V y una señal catódica irreversible a potenciales más negativos. Por este motivo, se realizó una evaluación de la reversibilidad para la primera cupla de los complejos.



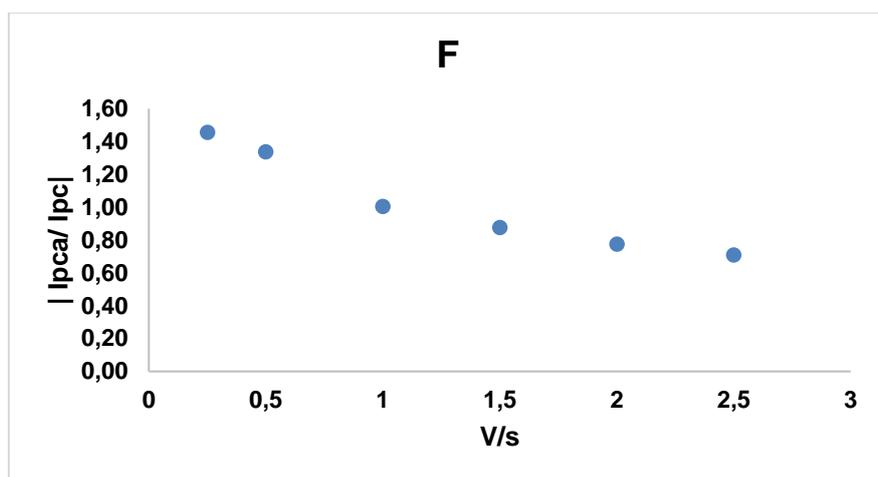


Figura 15: Relación entre las razones de cupla anódica y catódica en función de la velocidad de barrido para SR02 (C), SR05 (D), SR04 (E) y SR08 (F).

La relación entre las intensidades anódicas y catódicas en función a la velocidad de barrido de los complejos monolépticos se presentan en la figura 15. Se puede apreciar claramente que los complejos SR04 y SR08 presentaron curvas similares a las observadas para el ligante: SR12, curva descendente. Al igual que el complejo SR05, que a pesar de tener un ligante diferente sufrió una reacción química reversible con transferencia de electrones reversible. Y finalmente, SR02 presentó una curva ascendente, concordante con su respectivo ligante, SR10 (metil).

Tabla 1: Parámetros electroquímicos de la voltametría cíclica a la velocidad de barrido de 2000 V/s.

Molécula	Ipc [μ A]	Ipa [μ A]	I Ipc [μ A]	Ipa/Ipc	Epc I [V]	Epa I [V]	Epc II [V]	ΔE I [V]
SR02/ [PdL ₁ PPh ₃]Cl	-0,11	0,06	-0,30	0,49	-0,45	-0,40	-1,32	-0,05
SR05/ [PtL ₁ PPh ₃]Cl	-0,04	0,02	-0,11	0,59	-0,53	-0,47	-1,67	-0,06
SR10/ L ₁ , Metil	-0,56	0,22	-0,14	0,47	-0,52	-0,44	-1,43	-0,08
SR12/ L ₂ , Fenil	-0,25	0,10	-0,06	0,49	-0,50	-0,44	-1,19	-0,06
SR08/ [PtL ₂ PPh ₃]Cl	-0,07	0,04	-0,22	0,65	-0,48	-0,45	-1,64	-0,03
SR04/ [PdL ₂ PPh ₃]Cl	-0,05	0,03	-0,09	0,53	-0,50	-0,45	-1,27	-0,05

Se observa en la tabla 1 que los complejos de Pd (SR02 y SR04), en su primera curva tuvieron la misma diferencia de potencial (ΔE_p) de -0,05V aproximadamente y en conjunto con lo visto en la figura 15, se presume que estos compuestos presentan una reacción química reversible seguida de una transferencia de electrones reversible. Por otra parte, los complejos de Pt tuvieron distintos ΔE_p , donde SR08 podría ser un proceso dielectrónico cuasi-reversible ($\Delta E_p = -0,03V$). En cambio, SR05 es un proceso monoelectrónico ($\Delta E_p = -0,06V$) perteneciente

a una reacción química reversible con transferencia de electrones reversible [47]. Entonces se puede mencionar que los complejos sufren los mismos procesos químicos que los ligandos estudiados.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la serie de compuestos será evaluada en un sistema biológico donde ocurren procesos redox controlados por enzimas, por ende, sería conveniente comparar los valores de los potenciales de reducción de los compuestos en estudio con el fármaco nifurtimox de $-0,91V$ [41]. Pese a que aparentemente tiene un mecanismo de acción diferente al tratamiento clínico. En función a lo anterior, las cuplas ubicadas a potenciales superiores a $-0,7V$ tendrían una mayor facilidad de reducción en el sistema biológico. Por el contrario, la curva correspondiente a la reducción del grupo imino de la tiosemicarbazona tienen una mayor dificultad de biorreducción que el NFX.

Con relación a la dependencia de la corriente de los picos catódicos con la velocidad de barrido para todos los compuestos estudiados, se graficó el \log (intensidad catódica) versus el $\log(V)$, con el fin de definir el tipo de proceso (difusivo, mixto o adsorptivo), y esto se determina a través de la medida de la pendiente (m), si esta es menor o igual a $0,5$ se demuestra que ocurre un proceso difusivo, si m es mayor a $0,5$ pero menor a 1 es un proceso mixto y en el caso de que m sea cercano o igual a 1 es un proceso adsorptivo (Figuras 16, 17 y tabla 2).

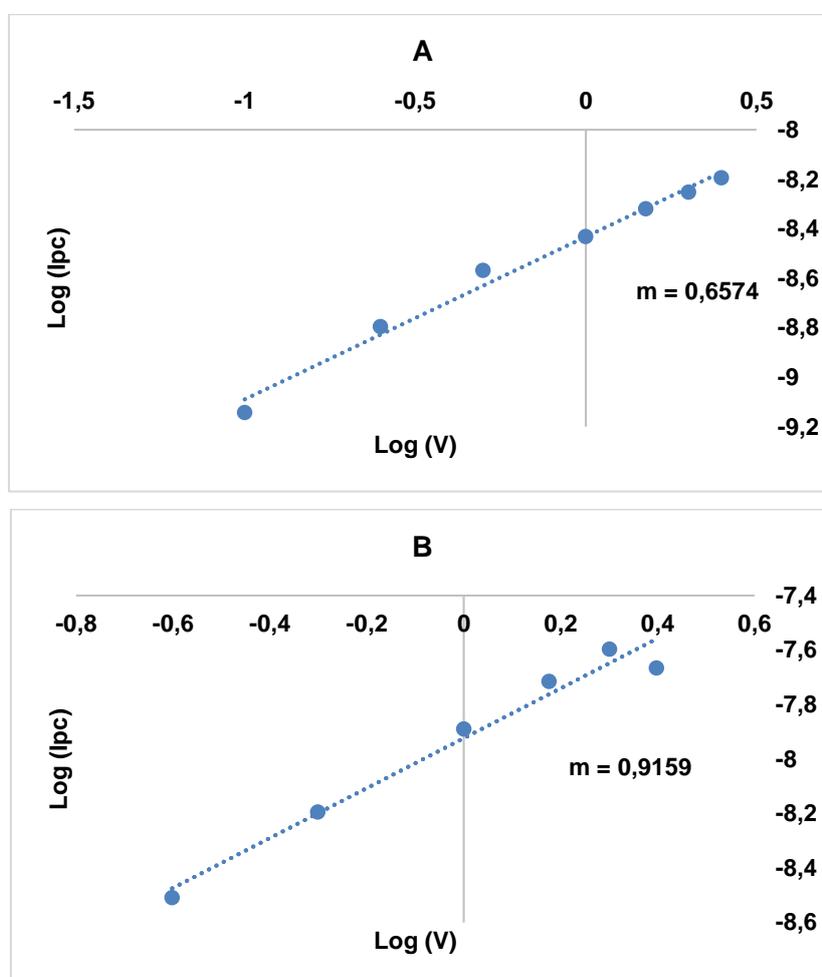
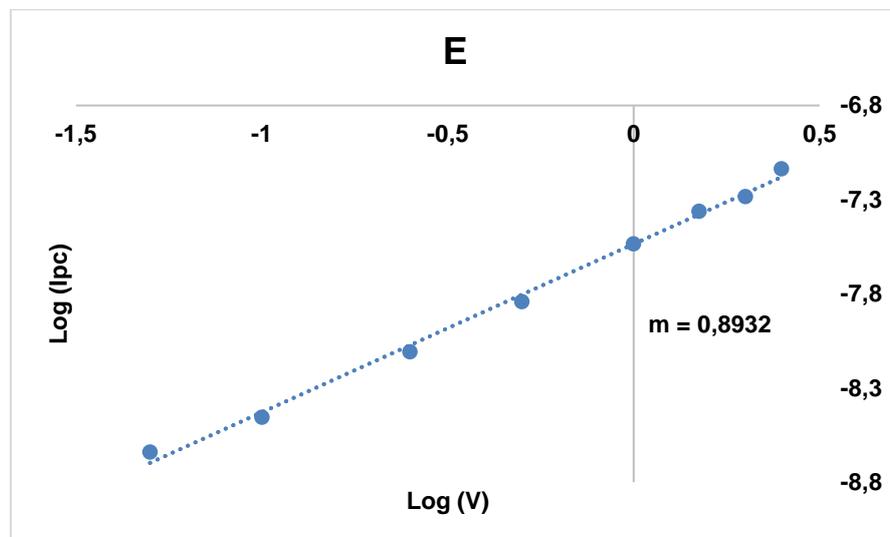
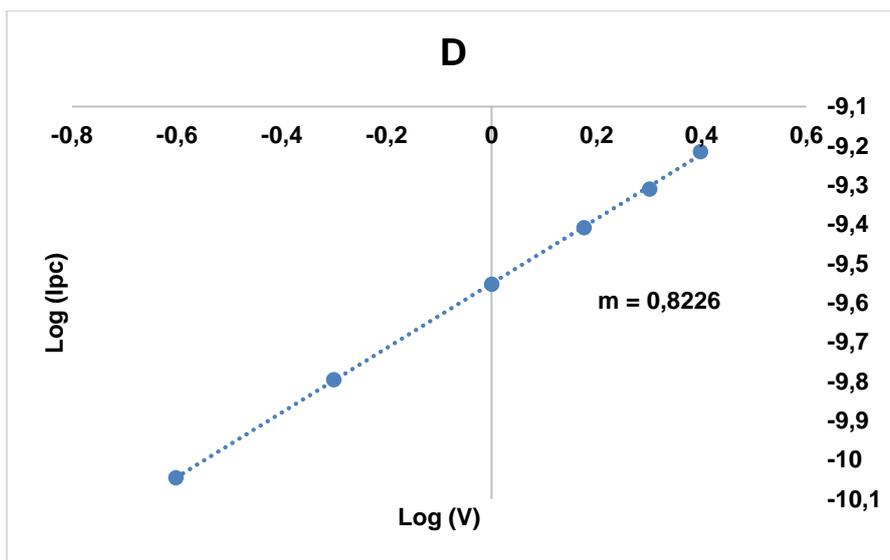
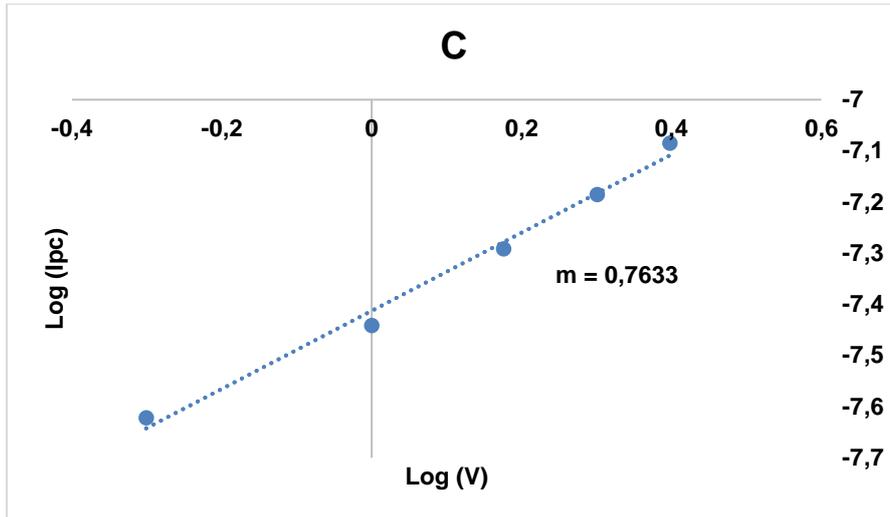


Figura 16: Dependencia del logaritmo de la intensidad catódica [μA] de la primera cupla en función del logaritmo de la velocidad de barrido (V) para SR10 (A) y SR12 (B).



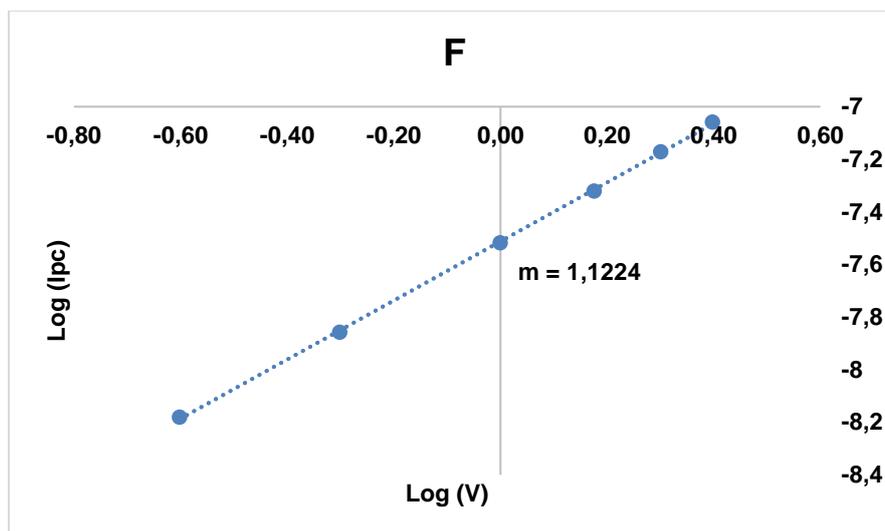


Figura 17: Dependencia del logaritmo de la intensidad catódica [μA] de la primera cupla en función del logaritmo de la velocidad de barrido (V) para SR02 (C), SR05 (D), SR04 (E) y SR08(F).

Tabla 2: Mecanismo de reducción de los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona y sus complejos con Pd y Pt.

Compuesto	Pendiente	Proceso
SR02	0,763	Mixto
SR05	0,822	Mixto
SR10	0,657	Mixto
SR12	0,915	Mixto
SR08	1,122	Adsorptivo
SR04	0,893	Mixto
NFX	0,487	Difusivo

Como se observa en la tabla 2, los compuestos en estudio presentan mayoritariamente procesos mixtos en las cuplas presentes en el rango de potencial de -0,2V a -0,8 V, a excepción de SR08 que mostró un carácter adsorptivo. Y para la señal que aparece a potenciales más negativos mostró ser un proceso difusivo (datos no mostrados).

1.2) Resonancia de espín electrónico (EPR)

Para conseguir más información respecto al mecanismo de reducción de la serie de compuestos en estudio y determinar si la reducción de estos involucra especies radicalarias, se realizó la reducción electroquímica *in situ* de los compuestos en las mismas condiciones de la voltametría cíclica. Sin embargo, no se obtuvo señal en EPR, lo cual indica que el tiempo de vida media es más bajo que el tiempo de recolección del espectro o el mecanismo de reducción no implica la formación de radicales libres. En consecuencia, los mecanismos propuestos en las figuras 12 y 13 no son apropiados. Por lo tanto, el mecanismo propuesto para la reducción de los ligantes híbridos y complejos metálicos implica en un primer paso la reducción de la cetona en posición 2 de la cumarina a alcohol por 2 electrones, aunque esto solo se ajusta a SR08, ya que fue el único compuesto que demuestra sufrir un proceso dielectrónico; el resto de compuesto no es posible dilucidar el mecanismo. No obstante, el segundo paso es aplicable a todos los compuestos y corresponde a la reducción del grupo tiosemicarbazona a tiourea y amina, también por dos electrones. Como se muestra en la figura 18.

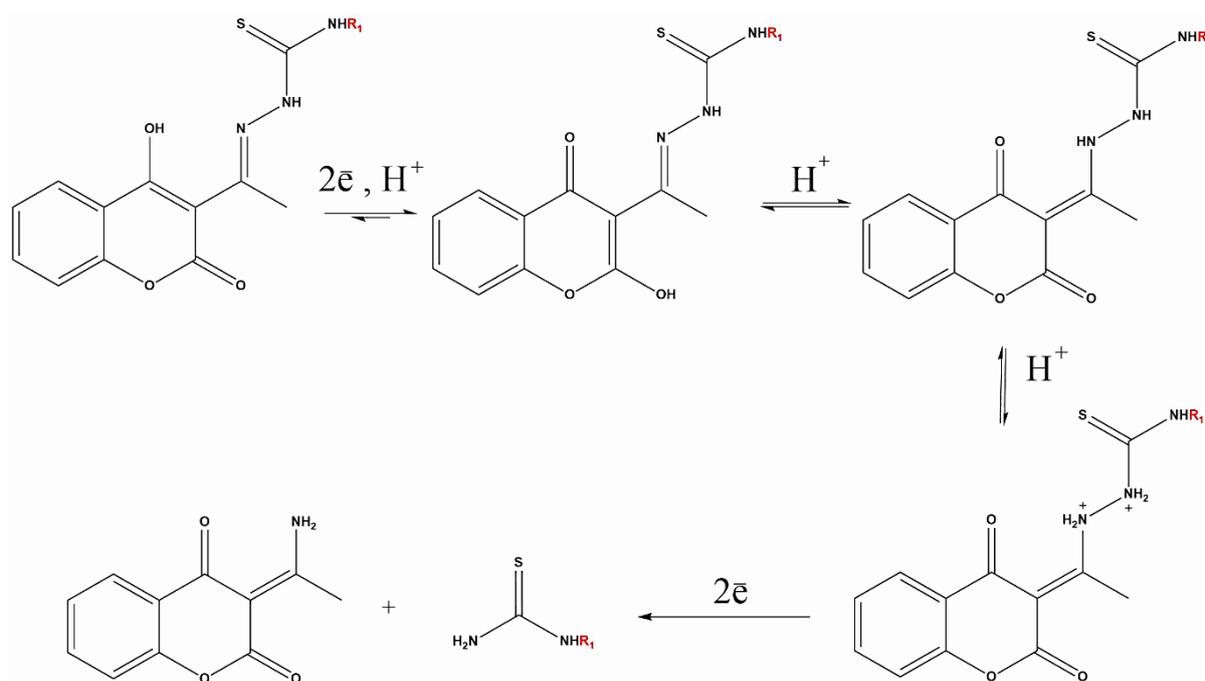


Figura 18: Propuesta de mecanismo de reducción de los ligantes híbridos [41, 49]

2) CÁLCULOS COMPUTACIONALES

2.1) Índices de Fukui [45]

Los índices de Fukui fueron calculados para los ligantes híbridos cumarina-tiosemicarbazona SR10 (metil) y SR12 (fenil) en DMSO, para obtener más información respecto a la susceptibilidad de los átomos del sistema a ser atacados por un nucleófilo (f^+). Los resultados se presentan en Anexo1; y en las figuras 19 y 20, se muestran los índices de Fukui de los átomos más relevantes para la elucidación del mecanismo de reducción de los ligantes libres.

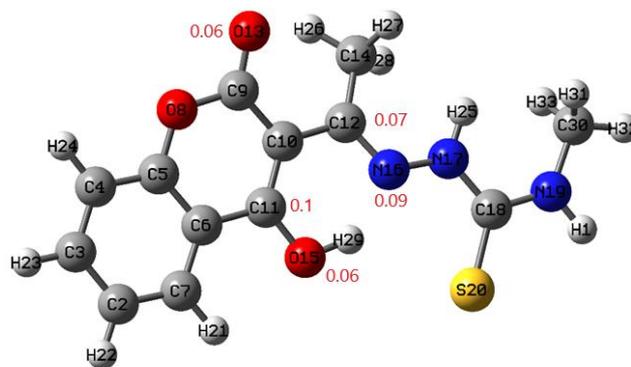


Figura 19: Asignación de los índices de Fukui más relevantes a los átomos más susceptibles a ataques nucleofílicos (f+) en el ligante híbrido cumarina-tiosemicarbazona SR10.

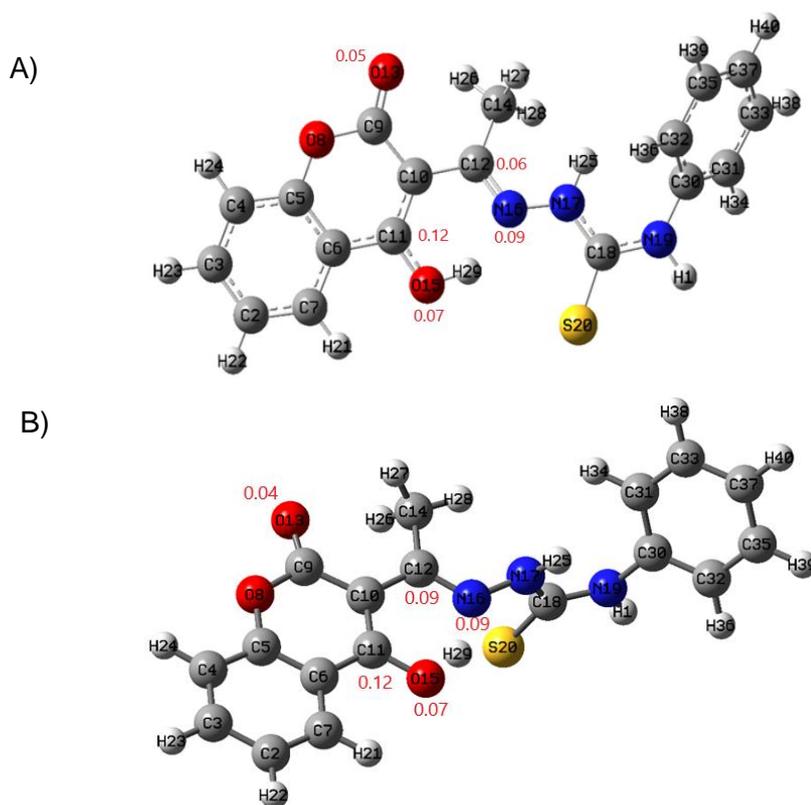


Figura 20: Asignación de los índices de Fukui más relevantes a los átomos más susceptibles a ataques nucleofílicos (f+) en el ligante híbrido cumarina-tiosemicarbazona SR12. A) calculado sin puente de H y B) con puente de H.

Los valores de los índices de Fukui positivos (f+)(Anexo 1), para ambos ligantes indican que la zona más probable de un ataque nucleofílico son el C11, C12, O15 y N16 (figura 19 y 20). En donde, el ligante SR12 aumentó su susceptibilidad a ataques nucleofílicos en comparación con SR10. Además, la densidad electrónica de N (17) en el ligante SR12 es mucho menor en comparación a SR10 (Anexo 1), evidenciado la influencia en la densidad electrónica del sustituyente enlazado a la fracción de tiosemicarbazona (R₁). Esta influencia puede explicar en parte los resultados obtenidos a través de voltametría cíclica, donde se observa que el ligante de SR10 tiene potenciales más negativos para la reducción del grupo tiosemicarbazona (tabla 1), debido a la repulsión de carga.

3) MEDICIONES BIOLÓGICAS

3.1) Actividad citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad de los compuestos sobre células de mamíferos (EaHy) y en parásitos tripomastigotes de la cepa Dm28c, proporcionados por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, la cuantificación de células viables se realizó a través del ensayo de reducción de sales de tetrazolio (MTT) a diferentes concentraciones de compuesto (ligante o complejo) para determinar la concentración de inhibición media (IC₅₀) para cada droga con una curva Dosis-Respuesta. Además, utilizó como control positivo el Tritón 100 para células y NFX para parásitos; y como control negativo células o parásitos sin tratamiento.

La citotoxicidad se determina a través de la disminución de células viables en función de la concentración del compuesto en cuestión y los resultados se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3: Valores obtenidos de concentración de inhibición media (IC₅₀) e índices de selectividad para cada compuesto en células mamíferas (EaHy) y parásitos Tripomastigotes de la cepa Dm28c.

COMPUESTO	EaHy	Tripomastigotes	índice de selectividad
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀ ^{EaHy} / IC ₅₀ ^{T.cruzi}
SR02/ [PdL ₁ PPh ₃]Cl	102,40 ± 0,02	200 ± 8	0,51
SR05/ [PtL ₁ PPh ₃]Cl	>200	213 ± 12	>0,94
SR10/ L ₁ , Metil	>200	>300	-
SR12/ L ₂ , Fenil	>200	>300	-
SR04/ [PdL ₂ PPh ₃]Cl	>200	>400	-
SR08/ [PtL ₂ PPh ₃]Cl	>200	64 ± 7	>3,15
NFX*	>200	10,0 ± 0,4	-

* [38]

Como se observa en la tabla 3, la serie de compuestos tiene baja actividad tripanocida en comparación al medicamento de uso clínico (NFX), al mismo tiempo, los compuestos presentan baja citotoxicidad en EaHy (fibroblastos), a excepción del SR02, que mostro ser tóxico para las células mamíferas EaHy.

Aunque, SR08 demostró ser el compuesto con mayor actividad tripanocida e índice de selectividad (IS= 3,15). No se puede considerar como un compuesto tripanocida potencial, ya que un índice de selectividad (IS) superior a 10 se considera favorable para ser considerado como potencial agente antiparasitario.

3.2) Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial

Con el fin de conseguir más información respecto al posible mecanismo de acción de muerte celular que generan los compuestos en estudio. Se optó por evaluar la variación de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), ya que los parásitos *T. cruzi* solo poseen una mitocondria, y por ende, tienen una única fuente energética.

La variación de potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) se evaluó mediante la cuantificación de un marcador fluorescente (TMRE), con tiempos de exposición de 2 horas y 40 min a una concentración de 100 μM .

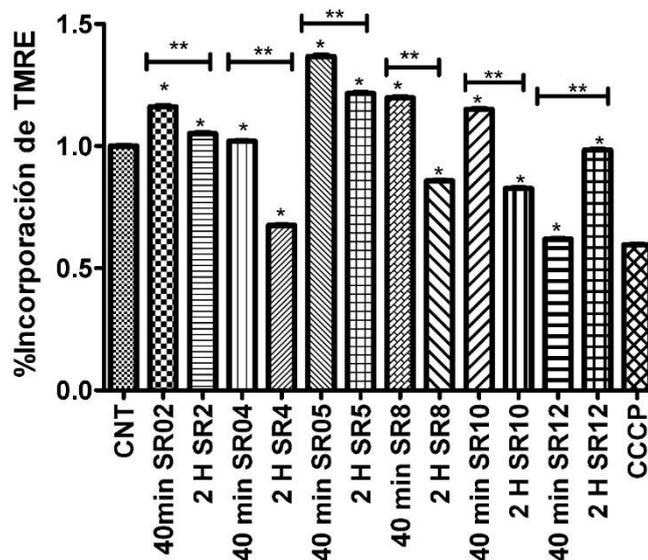


Figura 21: Efecto de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para cada compuesto (100 μM) y el estándar CCCP a 40 minutos y 2 horas de exposición.

De la figura 22 (c), se observa que una parte de los compuestos en estudio (SR04, SR08 y SR10) tuvieron una disminución de incorporación de la sonda TMRE a tiempos de exposición más largos, siendo más pronunciado para SR04, SR08 y SR10, siendo todos estos compuestos de fenil. Sin embargo, solo para SR08 los resultados concuerdan con la actividad biológica observada en la tabla 3, por lo que se podría postular este mecanismo como responsable de la actividad tripanocida del compuesto SR08. En cambio, el resto de los compuestos que presentaron actividad antiparasitaria (SR02 y SR05), se podría decir que su actividad no es producto de este mecanismo.

La diferencia entre la actividad biológica de los compuestos en estudio y los potenciales de membrana mitocondrial puede estar relacionada con la lipofilia y por ende con su biodisponibilidad. Con la finalidad de obtener información respecto a la biodisponibilidad de los compuestos se determinó la permeabilidad en membrana artificial.

4) LIPOFILIA

4.1) PAMPA (Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela)

Se realizó el ensayo PAMPA para obtener información de la biodisponibilidad de los compuestos y la facilidad de difusión de estos por una membrana artificial de fosfatidilcolina, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: Porcentaje de permeabilidad y permeabilidad efectiva en membrana artificial.

Compuesto	%PERMEABILIDAD	Pe (10^{-6} cm^{-1})
SR02	81,45	4,13
SR04	82,71	4,22
SR05	83,28	4,10
SR08	94,99	5,23
SR10	50,90	3,16
SR12	67,82	2,18

En tabla 4, se observa que los ligantes libres SR10 y SR12 presentan diferencia en la permeabilidad en membrana, relacionada directamente con la lipofilia de los compuestos (Log P: 2,1 y 3,7; respectivamente). Asimismo, los complejos tienen un mayor % de permeabilidad que los ligantes libres SR10 y SR12, lo que significa una mayor facilidad de atravesar la membrana por mecanismos pasivos (difusión). Esto se puede deber a la presencia del coligante trifenilfosfina, que posee un carácter lipofílico, lo que ayudaría al complejo a atravesar la membrana lipofílica. Además, la permeabilidad efectiva muestra que la diferencia de sustituyente en la fracción de la tiosemicarbazona posee influencia sobre la capacidad de difusión del compuesto, siendo mayor en los compuestos con sustituyente fenilo.

Cabe destacar que el compuesto con mayor % de permeabilidad fue el SR08 y al mismo tiempo presentó ser el complejo más activo de la serie (Tabla 1). Por lo que se puede presumir que su actividad está relacionada en parte con su mayor biodisponibilidad dentro del parásito.

Por otra parte, se observa una relación entre la permeabilidad en membrana con los valores de citotoxicidad determinados anteriormente (tabla 3). En donde, los complejos que presentan ser antiparasitarios (SR02, SR05 y SR08) mostraron una mayor permeabilidad que sus respectivos ligantes, lo que significa una mayor biodisponibilidad.

Considerando los resultados obtenidos en la citotoxicidad en células mamíferas y PAMPA, se destaca que, los complejos de platino fueron menos tóxicos que los de paladio en células mamíferas, a pesar de mostrar similar capacidad de difusión por la membrana. Esto podría deberse al centro metálico. A pesar de que ambos metales comparten características similares, existen estudios que indican que el paladio tiene tendencia a formar complejos más lábiles, lo que conlleva a una menor selectividad y una mayor toxicidad; además, se sabe que el platino tiene una gran afinidad a compuestos sulfurados, lo que lleva a pensar que los complejos de este metal son más estables y por ende menos tóxicos para la célula mamíferas [50].

Como se observó en la tabla 3 y 4 los compuestos tuvieron baja actividad y permeabilidad superior al 50%, donde destaca el compuesto SR08 que mostró la mejor selectividad de la serie, la más alta actividad y se logró identificar la alteración de potencial de membrana como mecanismo de acción.

Con la finalidad de obtener compuestos con mayor actividad tripanocida, en función a las estructuras estudiadas en este trabajo, se podría incorporar grupo halógeno o nitro idealmente sin alterar en gran medida la lipofilia. Otra opción, sería el remplazo del oxígeno por un bioisómero, como el azufre; lo que podría llevar a mayores interacciones con biomoléculas. Asimismo, podría el remplazo del centro metálico por oligoelementos, como el cobre (Cu) que ha sido utilizado para el tratamiento de cáncer, es esencial en las funciones biológicas y puede interactuar con biomoléculas.

CONCLUSIONES

- Los estudios electroquímicos sugieren que el mecanismo de reducción de los derivados híbridos cumarina-tiosemicarbazona no implica la generación de especies radicalarias. En donde, la determinación de los índices de Fukui permitió identificar los grupos funcionales más propensos a un ataque nucleofílico; siendo una herramienta que permite racionalizar los resultados obtenidos por métodos experimentales y proponer un posible mecanismo de reducción.
- En relación con la actividad antiparasitaria, la serie de compuestos presentó baja actividad tripanocida y no fueron tóxicos para las células mamíferas. Por otro lado, SR08 provocó una despolarización del potencial de la membrana mitocondrial y a su vez presentó actividad tripanocida. Por lo tanto, se postula que el mecanismo de acción implica la generación de estrés oxidativo; siendo la determinación de potencial de membrana mitocondrial eficiente en la determinación de este mecanismo de acción.
- En cuanto a la permeabilidad y lipofilia de los compuestos, los estudios realizados en membrana artificial (PAMPA) demostraron que los complejos híbridos cumarina-tiosemicarbazona de Pd y Pt son más permeables en comparación a sus respectivos ligantes. Además, se observó que la permeabilidad se ve relacionado con actividad tripanocida; siendo una alternativa para estudiar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Mbugua Njogu, y col. (2017). 4 - Designed Hybrid Compounds for Tropical Parasitic Diseases. *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*, Elsevier, 83-135. <https://www-sciencedirect-com.uchile.idm.oclc.org/science/article/pii/B9780081010112000040>
- [2] A. Rassi, y col.(2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*, 26(2), 275–9.
- [3] M.D. Chen Chao, y col. (2020). Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Volumen 1866 (5). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>
- [4] A.C. Pereira. (2019). Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. *The Lancet*. Volumen 393 (10180), 1486-1487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30288-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30288-0)
- [5] (20/05/2022). Enfermedad de Chagas. OPS, Sitio web: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- [6] (04/2023).La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). OMS Sitio web: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- [7] (05/2022).DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. . Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) Sitio web: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/index.html>
- [8] J.C. Haston & A.F.Camacho-Gonzales. (2023). 275 - Trypanosoma Species (Trypanosomiasis). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, Elsevier, Sixth Edition, pages 1402-1409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-75608-2.00275-5>
- [9] R. Salas Paola. (2020). Epidemiología de la enfermedad de Chagas: alta mortalidad y tasa de incidencia, Región de Coquimbo. *Revista chilena de infectología*, 37(4), 402-412. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000400402>
- [10] (2021). Chagas Disease. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). <https://dndi.org/wp-content/uploads/2022/11/DNDi-Factsheet-Chagas-2021.pdf>
- [11] J. Pérez-Molina, C. Crespillo-Andújar , P. Bosch-Nicolau. (2021). Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 39 (9). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.04.011>.
- [12] E.T.Ryan, J.R. Gutman, R.J Chancey. (2023).296 - Antiparasitic Agents. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, Elsevier, Sixth Edition, Pages 1598-1617.
- [13] C. Crespillo Andújar, y col. (2018). Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 24 (12). 1344-1344. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.006>
- [14] R.Martín-Escolano, M.J.Rosales., C. Marín. (2022). Biological characteristics of the *Trypanosoma cruzi* Arequipa strain make it a good model for Chagas disease drug discovery. *Acta Tropica*. Volume 236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106679>
- [15] S.R. Wilkinson , y col. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105(13), 5022–7. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0711014105>
- [16] W.H. Kawaguchi, y col.(2018). Efficacy and Safety of Chagas Disease Drug Therapy and Treatment Perspectives. *Chagas Dis - Basic Investig Challenges*. <https://www.intechopen.com/chapters/59725>

- [17] P. García-Huertas, y col. (2021). Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
- [18] María De Los Angeles Aravena Castro. (2016). Estudio de la actividad tripanocida y de los mecanismos de acción antiparasitaria de dos nuevas familias de nitrocompuestos: derivados de nitrofurano y nitroindazol. Universidad de Chile, Santiago, Chile. Tesis Doctoral. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140699/Estudio-de-la-actividad-tripanicida-y-de-los-mecanismos-de-accion-antiparasitaria.pdf?sequence=1>
- [19] Payel Das, Saradindu Saha, Somdeb Bose Dasgupta. (2021). The ultimate fate determinants of drug induced cell-death mechanisms in Trypanosomatids. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 15, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.01.003>.
- [20] E. Küpeli Akkol, et al (2020). Cumarinas y compuestos relacionados con la cumarina en la farmacoterapia del cáncer. *Cánceres*, 12 (7), 1959. <https://doi.org/10.3390/cancers12071959>
- [21] N.H. Nasab, F. Azimian, H.G. Kruger, S.J Kim. (2022). Acetylcoumarin in cyclic and heterocyclic-containing coumarins: Synthesis and biological applications. *Tetrahedron*. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2022.133158>
- [22] G. Arraché Gonçalves, y col. (2020). Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 203, 112514. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112514>.
- [23] F. Salgado, y col. (2021). Chemical and biological analysis of 4-acyloxy-3-nitrocoumarins as trypanocidal agents. *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 14 (3). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.102975>
- [24] J. Pozo-Martínez, y col. (2022). Synthesis and study of the trypanocidal activity of catechol-containing 3-aryl coumarins, inclusion in β -cyclodextrin complexes and combination with benzimidazole. *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 15 (3). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103641>
- [25] K. Pérez-Cruz, y col. (2018). Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 11 (4), 525-537. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.007>
- [26] Zhoupeng Li, y col. (2022). Pharmacological perspectives and molecular mechanisms of coumarin derivatives against virus disease. *Genes & Diseases*, 9, 1, 80-94. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.03.007>.
- [27] A. Rawat & A.V. Bhasker Reddy. (2022). Recent advances on anticancer activity of coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, Volume 5. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100038>
- [28] S. Zhang S, y col. (2022). Thiosemicarbazone N-Heterocyclic Cu(II) complexes inducing nuclei DNA and mitochondria damage in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 236. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111964>
- [29] D. Gambino & L. Otero. (2022). Facing diseases caused by trypanosomatid parasites: Rational design of pd and pt complexes with bioactive ligands. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.816266>
- [30] M.V.Oliveira Cardoso, y col. (2014). 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 86, 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>
- [31] J. Toloza González. (2016). Estudio Físicoquímico y Biológico de una serie de complejos metálicos con ligandos bioactivos contra Trypanosoma cruzi y células neoplásicas.

Universidad de Chile, Santiago, Chile. Tesis doctoral.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/142487>

[32] M. Fernández, y col. (2015). Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Volume 153, 306-301.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.018>

[33] P.M. Toro, y col. (2021). Comparison of chemical and biological properties of organometallic complexes containing 4- and 5-nitrothienyl groups. *Polyhedron*, Volume 193.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114872>

[34] A.A.A Al-Riyah, y col. (2022). Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of functionalised thiosemicarbazone ligands: Syntheses and reactivity, characterization and structural studies. *Polyhedron*, Volume 225. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.116079>

[35] M. Vieites, y col. (2008). Platinum(II) metal complexes as potential anti-Trypanosoma cruzi agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 5–6, 1033-1043.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.005>

[36] E.J. Anthony, y col. (2020). Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science*, 11(48), 12888-12917. <https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>

<https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>

[37] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 23939, Platinum. Retrieved December 7, 2022 from

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Platinum>

[38] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 23938, Palladium. Retrieved December 7, 2022 from

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palladium>

[39] J.D. Justim, L.M.C Bohs, B.B. Martins, y col. (2021). Caracterización electroquímica de derivados de isatina-tiosemicarbazona. *J Chem Sci*, 133, 124.

<https://doi.org/10.1007/s12039-021-01970-x>

[40] J. Gómez, y col. (2017). Ferrocenyl and cyrhetrenyl azines containing a 5-nitroheterocyclic moiety: Synthesis, structural characterization, electrochemistry and evaluation as anti-Trypanosoma cruzi agents. *Journal of Organometallic Chemistry*, Volume 839, 108-115.

<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.03.014>

[41] C. Olea-Azar, y col. (2006). ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 63 (1), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.04.011>

[42] T. Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 1–2, 55–63.

[43] J. Ortega Campos. (2020). Estudio fisicoquímico y biológico de complejos metálicos de platino y paladio con ligantes bioactivos contra Trypanosoma cruzi. Disponible en

<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/175283>

[44] R. Sierpe, y col. (2017). Construction of 6-thioguanine and 6-mercaptopurine carriers based on β -cyclodextrins and gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 177, 22-31.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861717309785>

[45] R. Ruiz, L.G. Calvo, J.P. Incháustegui, R. Pumachagua. (2013). Evaluación teórica de la reactividad química en especies indólicas 5-sustituido. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(2), 107-115. Recuperado en 08 de diciembre de 2022, de

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000200003&lng=es&tlng=es)

- [46] (2022). Mcule. Online drug discovery platform. <https://mcule.com/>
- [47] R.S. Nicholson & I. Shain. (1964). Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical Chemistry*, volume 36(4): p. 706-723.
- [48] Z. Stunić, M. Trkovnik, M. Laćan,. (1979). Polarographic study of 4-hydroxycoumarins with nitrogen-linked substituents in 3-position, and of 3-nitro-4-aminocoumarin. *Electrochemical Acta*, Volume 24, Issue 8, Pages 851-858. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(79\)87008-5](https://doi.org/10.1016/0013-4686(79)87008-5).
- [49] A.A. Eli, N.O. Sibel Yazar, B.D. Tulay, Ü. Bahri. (2021). Supramolecular Ni(II) complex aggregates with a circular linkage of intermolecular multi-hydrogen bonding frameworks based on thiosemicarbazone, and a Cu(II) complex. Synthesis, structural. DFT. electrochemical and antioxidant studies. *Polyhedron*, Volume 209, 115457. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115457>.
- [50] J. Toloza González. (2016). Estudio Físicoquímico y Biológico de una serie de complejos metálicos con ligandos bioactivos contra *Trypanosoma cruzi* y células neoplásicas. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/142487>

ANEXO

Anexo 1: índices de Fukui de los ligandos híbridos cumarina-tiosemicarbazona de metil (SR10) y fenil (SR12), respectivamente.

SR10		
L ₁ / R ₁ : Metil		
Atom	f+	f-
H(1)	0,02	-0,22
C(2)	0,01	0,15
C(3)	0,1	0,16
C(4)	0,03	0,13
C(5)	0,03	-0,14
C(6)	0	0,11
C(7)	0,07	0,1
O(8)	0,03	0,26
C(9)	0,01	-0,41
C(10)	0,02	0,28
C(11)	0,1	-0,22
C(12)	0,07	-0,14
O(13)	0,06	0,41
C(14)	-0,02	0,37
O(15)	0,06	0,35
N(16)	0,09	0,24
N(17)	-0,02	0,35
C(18)	0,02	-0,18
N(19)	0,03	0,33
S(20)	0,08	0,5
H(21)	0,02	-0,13
H(22)	0,03	-0,12
H(23)	0,03	-0,12
H(24)	0,03	-0,12
H(25)	0,01	-0,2
H(26)	0,01	-0,14
H(27)	0,03	-0,12
H(28)	0,02	-0,11
H(29)	0,01	-0,27
C(30)	-0,01	0,25
H(31)	0,01	-0,11
H(32)	0,02	-0,12
H(33)	0,01	-0,11

SR12					
L ₂ / R ₁ :Fenil					
Sin puente de H			Con puente de H		
um	f+	f-	Atom	f+	f-
1)	0,007	0,010	H(1)	0,010	0,010
C(2)	0,007	0,012	C(2)	0,010	0,030
C(3)	0,096	0,045	C(3)	0,100	0,040
C(4)	0,029	0,004	C(4)	0,030	0,010
C(5)	0,040	0,023	C(5)	0,030	0,020
C(6)	0,008	0,006	C(6)	0,000	0,010
C(7)	0,084	0,023	C(7)	0,080	0,000
O(8)	0,030	0,014	O(8)	0,030	0,020
C(9)	0,020	0,004	C(9)	0,000	-0,010
C(10)	0,039	0,080	C(10)	0,010	0,050
C(11)	0,124	0,034	C(11)	0,120	0,010
C(12)	0,060	0,039	C(12)	0,090	0,000
O(13)	0,047	0,070	O(13)	0,060	0,070
C(14)	-0,010	-0,008	C(14)	-0,010	-0,010
O(15)	0,070	0,039	O(15)	0,060	0,020
N(16)	0,086	0,058	N(16)	0,070	0,010
N(17)	-0,010	0,113	N(17)	-0,020	0,030
C(18)	0,024	-0,040	C(18)	0,000	-0,010
N(19)	0,019	0,026	N(19)	0,010	0,070
S(20)	0,067	0,320	S(20)	0,040	0,390
H(21)	0,018	0,008	H(21)	0,020	0,010
H(22)	0,018	0,009	H(22)	0,030	0,020
H(23)	0,020	0,009	H(23)	0,030	0,020
H(24)	0,019	0,009	H(24)	0,030	0,020
H(25)	0,009	0,021	H(25)	0,010	0,020
H(26)	0,010	0,011	H(26)	0,020	0,010
H(27)	0,022	0,017	H(27)	0,020	0,020
H(28)	0,016	0,014	H(28)	0,020	0,000
H(29)	0,009	0,000	H(29)	0,010	0,000
C(30)	-0,005	-0,013	C(30)	0,000	-0,020
C(31)	0,007	0,008	C(31)	-0,010	0,010
C(32)	0,002	0,000	C(32)	0,020	0,020
C(33)	0,002	0,005	C(33)	0,020	0,010
H(34)	0,003	0,004	H(34)	0,000	0,000
C(35)	0,003	0,005	C(35)	0,010	0,010
H(36)	0,002	0,002	H(36)	0,010	0,010
C(37)	0,009	0,010	C(37)	0,030	0,040
H(38)	0,003	0,003	H(38)	0,010	0,020
H(39)	0,002	0,003	H(39)	0,010	0,020
H(40)	0,002	0,003	H(40)	0,010	0,020

Anexo 2: Simulación de propiedades del compuesto SR10.

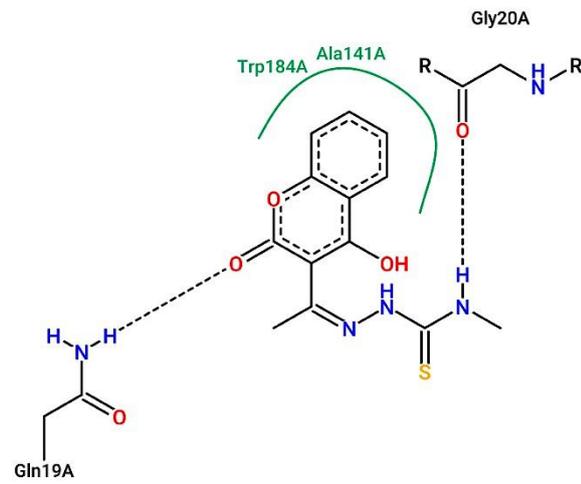
Property	Value
Mass	291.3277
logP	2.0983
H-bond acceptors	6
H-bond donors	3
Rotatable bonds	4
PSA	118.9500
RO5 violations	0
RO3 violations	3
Refractivity	80.9734
Atoms	33
Rings	2
Heavy atoms	20
Hydrogen atoms	13
Heteroatoms	7
N/O atoms	6
Inorganic atoms	0
Halogen atoms	0
Chiral centers	0
R/S chiral centers	0
Unknown chiral centers	0
Undefined chiral centers	0
Stereo double bonds	1
Cis/trans stereo double bonds	1
Unknown stereo double bonds	0
Undefined stereo double bonds	0

Anexo 3: Simulación de propiedades del compuesto SR12

Property	Value
Mass	353.3967
logP	3.6731
H-bond acceptors	6
H-bond donors	3
Rotatable bonds	5
PSA	118.9500
RO5 violations	0
RO3 violations	5
Refractivity	102.1914
Atoms	40
Rings	3
Heavy atoms	25
Hydrogen atoms	15
Heteroatoms	7
N/O atoms	6
Inorganic atoms	0
Halogen atoms	0
Chiral centers	0
R/S chiral centers	0
Unknown chiral centers	0
Undefined chiral centers	0
Stereo double bonds	1
Cis/trans stereo double bonds	1
Unknown stereo double bonds	0
Undefined stereo double bonds	0

Anexo 4: Simulación en cruzipaína de *T. cruzi* de las posibles interacciones ligante-sitio activo en mcule.com . Donde (A) es SR10 (score: 6.4) y (B) es SR12 (score: 6.8).

A)



B)

