



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIOS DE BIOELECTROQUÍMICA, FARMACOQUÍMICA Y
TOXICOLOGIA**

**“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA
CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 2-(O-NITROFENIL)-
BENZIMIDAZOL Y N-BENZOIL-2-(O-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL”**

**PROFESOR PATROCINANTE:
ALEJANDRO ÁLVAREZ LUEJE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**

**DIRECTORES DE MEMORIA:
ALEJANDRO ÁLVAREZ LUEJE
MARCELO KOGAN B.
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

CRISTIÁN SALVADOR QUEZADA ABURTO

SANTIAGO DE CHILE

2007

*A mi Madre, Padre y familia
por su dedicación, paciencia y apoyo*

Agradecimientos

Quiero agradecer un primer lugar a mis Padres, por su paciencia y apoyo para seguir adelante y así poder llegar a esta instancia de término que junto a ellos anhele, a mis hermanos por confiar en mí para llegar a esta meta y a mis tíos y tías, especialmente a mi tía María.

A mis profesores guía Alejandro Álvarez, por dar la posibilidad de realizar este trabajo, su dedicación para formarme como profesional y por la confianza que depositada en mí y Marcelo Kogan por su ayuda en la realización de esta memoria aportando siempre con su experiencia.

A mis amigos por soportarme "gran trabajo", por comprenderme en casi todas las cosas, además por todos los momentos vividos, las alegrías, penas, por el humor diferente y dedicarme la frase celebre " el que titubea pierde".

A mis compañeras y amigas de laboratorio, Libby y Lorena, por su colaboración, harta paciencia y aguantar mi genio " y yo también por aguantarlas".

Por ultimo agradecimientos a Fondecyt que financio esta memoria.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
1. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Materiales	10
2.1.1 Compuestos estudiados	10
2.1.2 Reactivos y disolventes	10
2.1.3 Disoluciones tampón	11
2.1.4 Material de vidrio	12
2.1.5 Otros materiales	12
2.1.6 Equipos.....	12
2.2 Métodos	13
2.2.1 Síntesis.....	13
2.2.2 Caracterización electroquímica	14
2.2.3 Desarrollo de la metodología electroanalítica	18
2.2.4 Caracterización espectrofotométrica	20
2.2.5 Desarrollo de la metodología espectrofotométrica	22
2.2.6 Caracterización cromatográfica	23
2.2.7 Desarrollo de la metodología cromatográfica	24
2.2.8 Modelado molecular	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1 Caracterización electroquímica	28
3.1.1 Polarografía de pulso diferencial (PPD)	28
3.1.2 Polarografía tast (PTAST)	30
3.1.3 Voltametría cíclica (VC).....	33
3.2 Caracterización espectroscópica UV-Vis	35
3.3 Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación.....	40
3.3.1 Estudios de selectividad	40
3.3.2 Curvas de calibración	44
3.3.3 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)	49
3.3.4 Estudio de repetibilidad	49
3.3.5 Estudio de reproducibilidad	50
3.4 Aplicación de las metodologías analíticas	50
3.4.1 Estudio de estabilidad hidrolítica de BNB por PPD	50
3.4.2 Determinación de coeficiente de partición (log P_{ow})	57
3.4.3 Determinación de la constante de permeabilidad efectiva [P_e]	58
3. 5 Modelado molecular	58
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
5. REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

En esta Memoria se presenta el desarrollo y la puesta punto de metodologías analíticas reproducibles y selectivas, y su posterior aplicación en estudios de degradación de 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB). Dichos estudios se llevaron a cabo usando las técnicas de polarografía de pulso diferencial (PPD), polarografía tast (PTAST), voltametría cíclica (VC), espectrofotometría UV-Vis, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y además estudios computacionales de modelamiento molecular.

En una primera etapa se llevó a cabo el estudio de influencia del pH por PPD y PTAST. En amplio rango de pH para ambos compuestos, estos exhiben dos señales de reducción: una señal principal debida a la reducción del grupo nitro y una secundaria, probablemente correspondiente al enlace azometino presente en el anillo benzimidazólico. Ambas señales son dependientes de pH, desplazándose hacia potenciales más negativos mientras más alcalino es el pH.

En una segunda etapa se desarrollaron tres metodologías analíticas para la cuantificación de los compuestos en estudio (PPD, HPLC y espectrofotometría UV-Vis), las cuales exhibieron valores adecuados de reproducibilidad ($CV < 4.5\%$) y repetibilidad ($CV < 4\%$), presentando linealidad en un amplio rango de concentración (1.0×10^{-6} M a 1.0×10^{-4} M) para ambos compuestos.

Además, por medio de la técnica de PPD se llevó a cabo el estudio de la cinética de degradación hidrolítica de BNB, a distintos valores de pH y temperaturas, encontrándose una cinética de pseudo orden uno en las condiciones ensayadas. Por otra parte, a pH 5.0 el compuesto presenta su máxima estabilidad, con $t_{1/2} = 39$ horas. Por último, se determinó la energía de activación para este compuesto, presentando un valor de 14.90 Kcal/mol a pH 7.4.

Mediante VC se completó la caracterización redox para NB, estudiando la influencia del pH y de la velocidad de barrido. Los voltamperogramas de NB en medio

acuoso muestran señales irreversibles, presentando dos señales de reducción al igual que en PPD.

Por espectrofotetría UV-Vis se determinaron las constantes de áidez para cada compuesto, los grupos responsables de dichas constantes son los nitrógenos ubicados en el anillo imidazólico en ambos casos, para estos grupos se obtuvieron valores de pK_a de 5.69 (-N=C-) y 11.38 (-NH) para NB y de 4.90 (-N=C-) para BNB.

Empleando HPLC se determinaron los coeficientes de partición respectivos, presentando valores de $\log P$ de 2.2 para NB y de 3.1 para BNB. Estos valores son coherentes con el elevado carácter apolar de los compuestos en estudio.

Siguiendo con la caracterización de NB y BNB, se realizó la determinación de la constante de permeabilidad efectiva [P_e], mediante el ensayo PAMPA, utilizando espectrofotetría UV-Vis y HPLC para su cuantificación, encontrándose valores de 0.8×10^{-5} cm/seg y 1.2×10^{-5} cm/seg, respectivamente.

Finalmente se realizó un estudio computacional de modelamiento molecular, para poder así dilucidar la conformación espacial de mínima energía de los compuestos en estudio. Para ello se realizó una búsqueda conformacional para encontrar los mínimos globales siguiendo un protocolo de templado simulado iterativo (TSI). Para evaluar si las estructuras obtenidas son estables en un entorno similar al del agua y en función del tiempo se realizó una simulación de dinámica molecular. Para evaluar si existen puentes de hidrógeno intramoleculares, se estudió la distancia entre el protón (-NH) y el grupo nitro (NO_2) encontrándose valores de 3 Å a 4.5 Å, lo cual implica que no hay formación de puente de hidrogeno intramolecular entre estos dos grupos. En el caso de BNB se evaluó el grado de interplanaridad existente entre los anillos benzimidazol y los sustituyentes, encontrándose que no existe coplanaridad de los mismos.

“DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 2-(O-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL AND N-BENZOIL-2-(O-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL”

SUMMARY

In this Thesis the development and application of reproducible and selective analytical methodologies, to characterize 2-(o-nitrofenil)-benzimidazol (NB) and N-benzoil-2-(o-nitrofenil)-benzimidazol (BNB) were carried out. To get these purposes, differential pulse polarography (DPP), fast polarography (PTAST), cyclical voltammetry (CV), UV-Vis spectrophotometric and high performance liquid chromatography (HPLC) were employed. In the characterization of NB and BNB molecular modelling computational studies were included.

In the first step, a study of pH influence by DPP and PTAST was carried out. In wide range pH studied, both compounds exhibited two reduction signals, a main signal due to the reduction of the nitro group and secondary one, probably corresponding to the azometine moiety present in the benzimidazole ring. Both signals were pH dependent, shifting cathodically with the pH increases.

In the second step analytical methodologies for the quantification of the compounds (DPP, UV-vis spectrophotometry and HPLC) were developed, they exhibited suitable values of reproducibility (CV<4.5%) and repeatability (CV<4%). In addition, linearity in a wide range of concentration (1.0×10^{-6} M to 1.0×10^{-4} M) for both compounds was obtained.

Furthermore by DPP the study of the hydrolytic degradation of BNB was carried out, at different pH and temperatures, finding a pseudo first order kinetic in the experimental conditions assayed. In addition, BNB present the highest stability at pH 5.0, with $t_{1/2} = 39$ hours. Furthermore, the calculated activation energy for this compound was 14.90 Kcal/mol at pH 7.4.

By means of CV the redox characterization for NB was accomplished changing pH and scan rate. NB voltammograms in aqueous medium showed irreversible signals as had been previously observed by DPP.

By UV-Vis spectrophotometry the dissociation constants for both compounds were determined. pKa values of 5.69 (N=C-) and 11.38 (NH) for NB and of 4.90 (N=C-) for BNB were obtained.

Values of coefficients of partition of 2.2 for NB and 3.1 for BNB were obtained using HPLC. These values were according with chemical structures of both compounds.

The constant of effective permeability [Pe] were determinate by using PAMPA test and UV-Vis spectrophotometry and HPLC, obtaining values of 0.8×10^{-5} cm/s and 1.2×10^{-5} cm/s for NB and BNB, respectively.

Finally, a molecular modeling study was carried out to find the low energy conformations that adopt the compounds. A conformational search following an Iterative simulated protocol (TSI) was performed. The global minima of both conformers were found. To determine if these structures are stable within the time and in an aqueous environment, molecular dynamic simulations were carried out. In order to determine if intramolecular hydrogen bonds are present, the distance between the proton (-NH) and the nitro group (NO₂) was 3 Å - 4.5 Å for the NB conformers, which indicate that intramolecular hydrogen bond between these two groups is not present. In the case of BNB the degree of interplanarity between the rings benzimidazole and benzoile molecule was evaluated, observing that they are not coplanar.

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de nuevos compuestos con fines farmacéuticos son evaluadas en una primera etapa las propiedades *in vitro*, incluyendo su caracterización física y química. Esto involucra la determinación de parámetros físicos como punto de fusión, tamaño de partícula, densidad, polimorfismo, etc. La caracterización química incluye la determinación del pK_a , $\log P$, solubilidad, perfil de pH en función de la solubilidad y perfil estabilidad en función del pH. Junto con estas propiedades fisicoquímicas, también se realizan rastreos *in vitro* (screening), por ejemplo, empleando células Hela¹ o también células Caco-2^{2,3} o ensayos fisicoquímicos (*parallel artificial Membrane Assay*, PAMPA)⁴ para determinar las características de permeabilidad y susceptibilidad de diferentes enzimas metabolizantes. De esta forma, rápidamente y a un bajo costo se obtiene un perfil farmacéutico de la sustancia bajo estudio.

En esta etapa preliminar de investigación de sustancias de síntesis con potencial actividad biológica, el desarrollo de metodologías analíticas cuali y cuantitativas, selectivas y reproducibles, es necesario tanto para la cuantificación y caracterización de las sustancias en cuestión en distintas matrices (con vista a las futuras aplicaciones en ensayos biológicos), como para la caracterización química, determinación de la estabilidad, pK_a , $\log P$.

En este sentido, la presente Memoria de Título se enmarca en esta área del conocimiento y se centra fundamentalmente en el desarrollo de metodologías analíticas y su aplicación a la cuantificación y caracterización de unos nuevos compuestos sintéticos con potencial actividad biológica: 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB) (Figura 1), los cuales han sido seleccionados debido a que en su estructura se incluyen por una parte, el núcleo benzimidazólico y por otra, un sustituyente nitroaromático, ambos de reconocida y variada actividad biológica. Es así, como el núcleo benzimidazólico se encuentra presente en distintos fármacos para el tratamiento de patologías muy diversas. Por ejemplo, algunos benzimidazoles son drogas de elección en el tratamiento de diversas parasitosis⁵, patología característica de áreas tropicales con una fuerte incidencia en

los perfiles de morbilidad y mortalidad. También han sido estudiados como antibacterianos⁶, antifúngicos⁷, antivirales⁸, antineoplásicos⁹ y más recientemente como antagonistas de la hormona liberadora luteinizante¹⁰

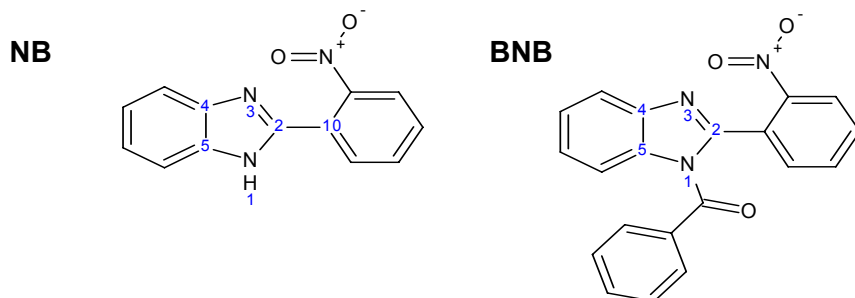


Figura 1. Estructuras químicas de 2-(o-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(o-nitrofenil)-benzimidazol (BNB).

Por otra parte, los compuestos nitroaromáticos son extensamente usados como productos farmacéuticos, pesticidas y explosivos^{11,12} El grupo nitro sobre un anillo aromático ejerce un fuerte efecto aceptor de electrones, disminuyendo la densidad electrónica del anillo. Por otra parte, en el grupo nitro el exceso de la carga electrónica está localizada principalmente en los átomos oxígeno, mientras que el átomo de nitrógeno es deficiente en electrones. Como consecuencia, los compuestos nitroaromáticos muestran una elevada reactividad para el ataque de nucleófilos en carbonos aromáticos, así como para reacciones con agentes reductores¹³. De ahí, por ejemplo, que el nitrobenceno es un representante clásico de tóxicos electrofílicos. Actualmente, los compuestos nitroaromáticos son de gran interés debido a su grado variable de toxicidad, como por ejemplo, la mutagenicidad y la carcinogenicidad¹⁴.

Para manifestar sus propiedades terapéuticas y/o citotóxicas, la mayor parte de nitroaromáticos debería sufrir la mono o bi reducción enzimática en el organismo. La mono reducción de nitroaromáticos es con frecuencia catalizada por flavoenzimas deshidrogenasas-electrontransferasas, por ejemplo, NADPH: citocromo P-450 reductasa¹⁵⁻¹⁷ y nitroreductasas bacterianas sensibles a oxígeno¹⁸.

En general, los nitrocompuestos son buenos candidatos para interferir con el metabolismo de oxígeno, por medio de sus correspondientes aniones radicales¹⁹. En condiciones aeróbicas, la monoreducción electrónica de compuestos nitroaromáticos a su correspondiente anión radical provocan su nueva oxidación por oxígeno con la formación de superóxido y, posteriormente, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La reducción de dos electrones de los nitroaromáticos a nitroso compuestos y, posteriormente a hidroxilaminas, es catalizado en mamíferos por NAD(P)H:quinona reductasa^{20,21} y nitroreductasas bacterianas insensibles a oxígeno²².

Como ya se ha comentado, debido a la importancia que tiene el núcleo heterocíclico benzimidazólico en química medicinal, existen variadas rutas sintéticas para su obtención. En nuestro caso, la síntesis de los compuestos será realizada de acuerdo a un procedimiento previamente descrito por Pessoa-Mahana²³, a partir de *o*-nitrobenzaldehído y posteriormente, haciendo reaccionar el 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol obtenido con el correspondiente cloruro de benzoilos a 25°C en tetrahidrofurano²⁴.

La inclusión de los grupos funcionales en la estructura benzimidazólica, además de incrementar la actividad biológica del compuesto, también nos proporcionará la posibilidad de contar con más alternativas analíticas para su estudio, sobre la base de las propiedades fisicoquímicas, estructurales, espectroscópicas y electroquímicas. En este sentido, y como se comentó en el párrafo anterior, debido a la química redox del grupo nitro, su reducción puede jugar un rol activo en distintos aspectos, como en las determinaciones analíticas, en generación, estabilidad y reactividad del radical libre. En este sentido, las técnicas electroquímicas serán de gran utilidad para el estudio de las moléculas propuestas, por tratarse de sustancias nitroaromáticas.

El estudio de estabilidad de un compuesto con potencial actividad farmacológica es uno de los estudios que se debe llevar a cabo en la fase exploratoria. Existen múltiples estudios en la literatura internacional respecto a este punto²⁵⁻²⁷. Además, el advenimiento de nuevas técnicas analíticas y el desarrollo tecnológico de

nuevos equipamientos que facilitan la cuantificación y el desarrollo de ensayos de estabilidad y de dilucidación de productos de degradación de los mismos, ha producido un gran impacto en el área farmacéutica; tal es el caso, por ejemplo, de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección de arreglo de diodos, la cual permite la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla. En este sentido, cabe recordar que para la verificación de la estabilidad, se requiere de métodos analíticos que permitan determinar el principio activo intacto, como también los potenciales productos de degradación, y que a la vez sean apropiados en cuanto a la sensibilidad, exactitud y reproducibilidad, y de aplicabilidad en presencia de sustancias auxiliares.

Por otra parte la biodisponibilidad de una sustancia y su acceso al blanco terapéutico son consideraciones importantes en el diseño racional de nuevos fármacos. Antes de que el fármaco pueda generar un efecto, por ejemplo si es administrada oralmente, por lo general tiene que pasar una serie de barreras (p. ej. membranas biológicas) por difusión pasiva y/o mediada por transportadores. Un factor que influye en la anfipaticidad de una droga es el pH, ya que dependiendo del mismo la molécula se puede encontrar formando especies hidrofílicas o hidrofóbicas. En este contexto, la afinidad de la molécula de fármaco para el sitio de interés, y su capacidad de partición en un ambiente lipofílico a distintos valores de pH, tienen que ser cuantificados para una predicción apropiada de su capacidad de actuar recíprocamente con el objetivo biológico y de ahí ser eficaz²⁸.

Por muchos años el coeficiente de partición 1-octanol/agua (K_{ow} , o expresado como $\log P_{ow}$) ha sido usado como una medida de lipofilidad y convencionalmente, la media estándar de la hidrofobicidad de un compuesto es el coeficiente de partición octanol-agua. K_{ow} es la proporción de equilibrio de la concentración en una fase octanol y su concentración en fase acuosa²⁹ y está estrechamente relacionada con la solubilidad acuosa de un compuesto³⁰ (por ejemplo, para un compuesto A se define como: $K_{ow} = [A]_{oct}/[A]_{agua}$).

Existen tres métodos estándar para obtener el K_{ow} de un compuesto. La clásica medición experimental, ya sea el método “slow stirring” o “shake flask”³¹, la cual está restringida a compuestos con $\log K_{ow} < 5$. El segundo método esta basado en una relación estructura actividad cuantitativa molecular (QSAR), ampliamente estudiada por Hansch, Leo, y otros³²⁻³⁷. Pese a que es popular para compuestos farmacéuticos, este método no puede ser usado sin información estructural. El tercer método está basado en la correlación de K_{ow} con tiempos de retención HPLC en fase reversa^{33,34} y esencialmente se trata de obtener relaciones lineales entre $\log K'$ (factor de capacidad) y $\log K_{ow}$ con compuestos estándar^{35,36}.

Los ensayos que predicen la absorción pasiva de fármacos se han hecho cada vez más importantes en el proceso de descubrimiento de éstos. La capacidad de una molécula para ser absorbida, es uno de los aspectos más importantes en la decisión si la molécula es un potencial candidato líder. Ensayos celulares, como aquéllos usando HeLa y/o Caco-2, comúnmente son usados como un modelo para la absorción de drogas; sin embargo, la técnica emplea mucha mano de obra y a menudo es realizada tarde en el proceso de descubrimiento de éstas. Existen diferentes opciones de ensayos *in vitro* disponibles para predecir la absorción de fármacos, incluyendo el ensayo de permeabilidad³⁷, que usa una membrana de hexadecano como una barrera lipofílica, y un método conocido como PAMPA³⁸ (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), que usa una membrana lipídica para simular la bicapa lipídica de distintos tipos de células, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Este ensayo de permeabilidad no celular es relativamente rápido (4-24 horas) y de bajo costo. En general, son usados cada vez con mayor frecuencia para determinar las propiedades de permeabilidad pasiva transcelular de compuestos potencialmente medicinales. La mayoría de los fármacos entran en la circulación sanguínea por difusión pasiva a través del epitelio intestinal³⁹. Por consiguiente, los ensayos de permeabilidad miden el transporte pasivo por barreras lipofílicas, éstos tienen correlación con los valores de absorción en humanos o con provenientes de métodos publicados.

Por otra parte, el parámetro de acidez pK_a es de suma importancia en la caracterización biofísica de un compuesto, y de ayuda para predecir el comportamiento

de una sustancia *in vivo*. Debido a que existe una correlación entre el pK_a y la solubilidad de una sustancia en diferentes medios, es posible hacer predicciones referentes a la biodisponibilidad de miembros individuales de compuestos de una serie de congéneres⁴⁰. Específicamente, la farmacocinética y la toxicidad (ADMET: absorción, distribución, metabolismo, excreción, toxicidad) de xenobióticos dependen de su pK_a . Por lo tanto, las aproximaciones modernas para buscar nuevas drogas, requieren un rápido acceso a valores de pK_a de las drogas candidatas, por ejemplo, obtenidas por química combinatoria⁴¹.

La determinación de pK_a se hace en forma rutinaria por titulaciones pH-métricas y análisis espectrofotométrico⁴². Sin embargo, estos procedimientos tienen limitaciones, tales como pobre solubilidad de los compuestos o falta de cromóforo, tal que las formas ionizadas y no ionizadas exhiban diferentes espectros. Debido a que muchos compuestos de interés farmacéutico tienden a tener una baja solubilidad en agua y usualmente no están disponibles en una forma de alta pureza, estas técnicas no son prácticas para todos los compuestos.

En base a los antecedentes expuestos, en esta Memoria de Título se propone el desarrollo de metodologías analíticas cromatográficas, espectroscópicas y electroquímicas, con vista a ser aplicadas en el estudio de la caracterización de 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB), en lo que se refiere a determinación de parámetros fisicoquímicos de interés farmacéutico, como por ejemplo pK_a y $\log P_{ow}$, estabilidad, ensayos de permeabilidad.

Además se llevaron a cabo estudios de modelado molecular para la determinación de la conformación espacial. Esta metodología se basa en la aplicación directa de las ecuaciones de Newton o de Langevin, para describir la evolución temporal de un sistema. Utilizando las leyes de la mecánica clásica se pueden predecir la posición que ocupará y la velocidad que tendrá cada una de las partículas en un tiempo determinado. Analizado sucesivamente en el tiempo la fuerza sobre cada partícula y haciendo una estimación de su posición y velocidades futuras, se pueden

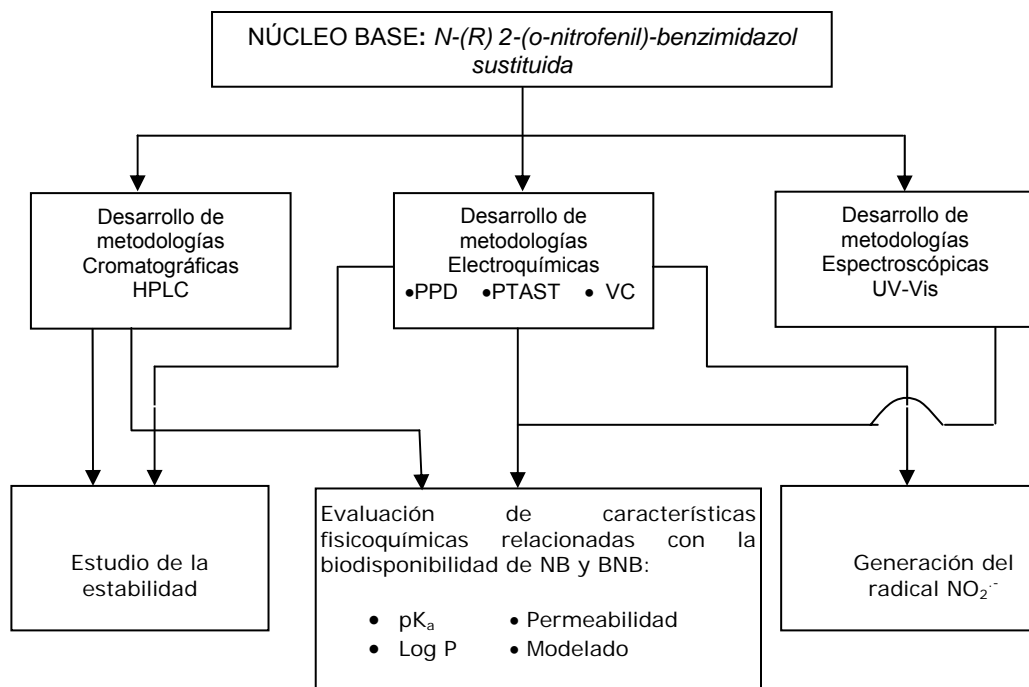
obtener un conjunto de estructuras que representan la evolución temporal del sistema a una temperatura determinada.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el OBJETIVO GENERAL de esta Memoria es *“incrementar el conocimiento básico respecto a una nueva serie de compuestos con potencial actividad biológica, a través del desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación y caracterización de dos compuestos pertenecientes a la serie homóloga 2-(o-nitrofenil)-benzimidazólica.*

En función del objetivo general descrito, se plantean los siguientes OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Implementar metodologías electroanalíticas Polarografía de pulso diferencial (PPD), Polarografía Tast (PTAST), cromatográficas (HPLC) y espectrofotométricas (UV-Vis), a objeto de contar con herramientas analíticas selectivas para la identificación y cuantificación de los compuestos en estudio.
2. Caracterizar los compuestos en estudio, haciendo uso de las herramientas analíticas previamente desarrolladas, de tal forma de determinar sus pK_a , $\log P_{ow}$, características de permeabilidad, comportamiento redox y estabilidad. Dentro de este objetivo se propone realizar un modelado molecular, que brindará información acerca de la distribución de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, lo cual se relaciona con la anfipaticidad de la molécula y también con sus características de permeabilidad.

A continuación se presenta un esquema resumido de lo propuesto en la presente Memoria:



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Compuestos estudiados

- a) Fórmula global : $C_{13}H_9N_3O_2$
 Nomenclatura : 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB)
 Peso molecular : 239,06 g/mol
 Punto fusión : 277-278.5°C
- b) Fórmula global : $C_{20}H_{13}N_3O_3$
 Nomenclatura : N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB)
 Peso molecular : 343,33 g/mol
 Punto fusión : 161° C

2.1.2 Reactivos y disolventes

1,2-fenilendiamina, p.s., Sigma Aldrich
Acetonitrilo (99.0%) p.a., Merck
Ácido acético glacial (CH_3COOH) (100.0 %) p.a. Merck.
Ácido benzoico ($C_7H_6O_2$) p.a., Merck
Ácido bórico (H_3BO_3) p.a., Merck
Ácido clorhídrico (HCl) (36.5%) p.a Equilab
Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) (85.0%) p.a., Merck
Agua calidad HPLC (Milli-Q)
Almidón, calidad técnica
Avicel PH 101, calidad técnica
Benzofenona, p.a., Sigma Aldrich
Bromuro de clidinio (99.0%), Recalcine.
Cloruro de benzoilo, p.s., Merck
Cloruro de potasio p.a. Merck
Difenilamina, May & Baker Ltd.
Dimetilsulfoxido (DMSO), p.a., Merck

Dióxido de titanio, calidad técnica
Etanol absoluto (etanol) (99.8%) p.a., Merck
Fenantreno estándar para microanálisis, Fisons instruments s.p.a.
Fosfolípido (L- α -fosfatidilcolina), (99.0%), Sigma
Fosfato de sodio dibásico anhidro, p.a., Merck
Helio extrapuro AGA
Hidróxido de sodio (NaOH) (pellets) p.a. Merck
Hidróxipropilcelulosa, calidad técnica
Hidróxipropilmetilcelulosa, calidad técnica
Lactosa, calidad técnica
Metanol calidad HPLC, Merck
Mercurio metálico extrapuro
N,N-dimetilformamida (DMF) p.a. Merck
N-dodecano, (99.5%), EMD Chemicals.
Naftaleno, calidad técnica
Nitrato de potasio, p.a., Fluka
Nitrógeno extrapuro AGA
 α -nitrobenzaldehído, p.s., Sigma Aldrich
PEG 400, calidad técnica
PEG 4000, calidad técnica
Perclorato de tetrabutilamonio p.a., Fluka
Sorbitol, calidad técnica
Tabletas buffer fosfato salino, Sigma Aldrich
Talco, calidad técnica
Timol, calidad técnica
Tiopental sódico estándar.

2.1.3 Disoluciones tampón

Tampón Britton-Robinson 0.1M
Tampón fosfato 0.05 M pH 4.50
Tampón fosfato 0.01 M pH 7.40

2.1.4 Material de vidrio

Todo el material de vidrio transparente y ámbar utilizado fue clase A.

2.1.5 Otros materiales

Pipetas automáticas, eppendorf Research de volumen variable 0.5-1.000 μL .

Jeringa de inyección Hamilton de 25 μL .

Viales ámbar de 2 mL, Hewlett Packard.

Sellos de viales, Hewlett Packard.

Engargoladora, Hewlett Packard.

Desengargoladora, Hewlett Packard.

Placa aceptor de sistema PAMPA: Millipore-IP Multiscreen, tamaño de poro 0,45 μm , membrana PVDF, no estéril.

Placa dador de sistema PAMPA: Millipore-IP Multiscreen, no estéril.

2.1.6 Equipos

a) Sistema voltamperométrico

Metrohm, procesador 693 VA

Electrodo de trabajo: Goteo de mercurio (EGM); Metrohm.

Electrodo de referencia: Calomelano saturado, Metrohm.

Electrodo auxiliar: Platino, Metrohm

Celda polarográfica de 25 mL, Metrohm.

Computador 486 DTK computer, modelo Multi Sync 4D, con programa de adquisición y tratamiento de datos Stand VA 693.

Estación de trabajo Bioanalytical System (BAS), CV-50W.

Computador Pentium, con programa de adquisición y tratamiento de datos CV-50W

b) Sistema cromatográfico

Bomba WatersTM 600 Controller Millipore Model Code 6CE

Detector con arreglo de fotodiodos WatersTM 996

Columna cromatográfica Kromasil 100-5C-18 (4.6 mm×150 mm)

Precolumna C18 $\mu\text{Bondapak}$ (30 mm×4.6 mm)

Inyector Rheodyne de 20 μ L.

Horno columna, Waters™ 600

Computador Pentium II con programa de adquisición y tratamiento de datos

MILLENIUM versión 3.05

c) Espectrofotómetro (UV-VIS)

Espectrofotómetro UV-VIS Unicam UV2

Celdas de cuarzo de paso óptico 10 mm

Computador Pentium III, con programa de adquisición y tratamiento de datos

VISION2.2

d) Equipos de uso general

Balanza analítica de precisión, Precisa 40SM-200A (sensibilidad 0.01 mg)

Agitador magnético, Heidolph MR 3002

Medidor de pH, WTW pMX 537

Sistema purificador de agua, Milli-Q *Ultra-Pure Water System*

Baño de Ultrasonido, Branson 2210

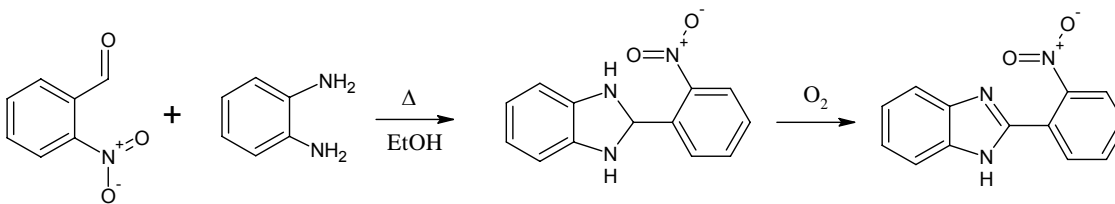
Estufa WTC Bindert

Agitador Heidolph DSG 304

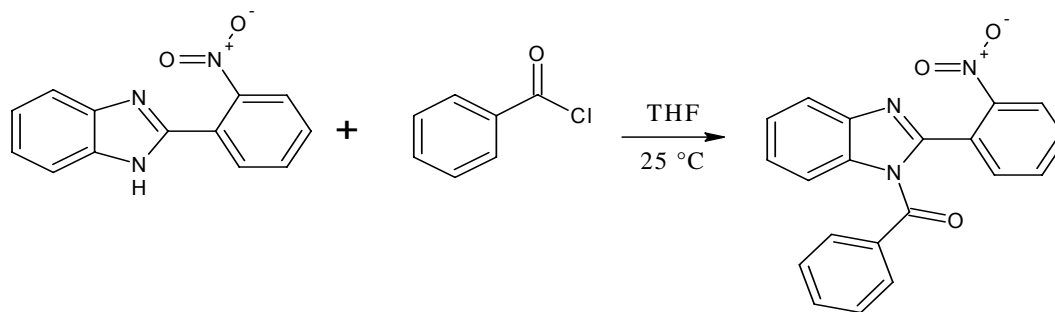
2.2 Métodos

2.2.1 Síntesis

a) La síntesis de 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol se realizó por ciclación entre *o*-nitrobenzaldehído y 1,2-fenilendiamina en etanol en cantidades equimolares, seguida de una oxidación del producto obtenido, de acuerdo al siguiente esquema sintético:



b) La síntesis de N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol se realizó por reacción de transacilación entre 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol con cloruro de benzoilo en THF, en cantidades equimolares, de acuerdo al siguiente esquema sintético:



2.2.2 Caracterización electroquímica

A. Preparación de disoluciones

a) *Tampón Britton-Robinson 0.1 M*

Se disolvieron 6.20 g de H_3BO_3 en agua Milli-Q con ayuda de ultrasonido en un matraz aforado de 1000 mL. Se agregó 6.8 mL de ácido ortofosfórico, 5.8 mL de ácido acético y se completó volumen con agua Milli-Q. Esta disolución Britton-Robinson 0.1M permite trabajar en un rango de pH entre 2.0 y 12.0.

b) *Disolución stock de los compuestos en estudio*

Se pesó exactamente alrededor de 2.39 mg y 3.43 mg de NB y BNB, respectivamente, los cuales fueron disueltos en etanol con ayuda de ultrasonido y luego llevados a un volumen final de 10.0 mL en un matraz aforado, para obtener una disolución 1×10^{-3} M.

B. Polarografía de pulso diferencial (PPD)

a) *Disolución de trabajo*

Se transfirieron 2.5 mL de disolución stock de cada compuesto en estudio en etanol a un matraz aforado de 25 mL y se completó volumen con disolución tampón etanol/tampón Britton-Robinson (30:70), resultando una disolución de concentración de 1×10^{-4} M.

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo fueron burbujeadas con nitrógeno durante 10 minutos en la celda polarográfica, previo a la medición.

La temperatura de trabajo fue la temperatura ambiental.

Los electrodos usados fueron:

Electrodo de trabajo : Goteo de mercurio (EGM), Metrohm.

Electrodo de referencia : Electrodo de calomelano saturado, Metrohm

Electrodo auxiliar : electrodo de platino, Metrohm

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad : 2.5-10 μ A

Rango de potencial : 0 a -1800 mV

Tiempo de goteo : 0.60 s

Altura de pulso : -50 mV

Retardo de pulso : 40 ms

Incremento de potencial : 6 mV

c) Estudio de la influencia del pH

Se determinó el comportamiento electroquímico en el rango de pH 3.0 - 12.0 a las disoluciones de trabajo 1×10^{-4} M. de NB y BNB. Se incrementó el pH en 0.5 unidades, a partir de pH 3.0 hasta pH 12.0, empleando soluciones concentradas de NaOH y HCl. Para cada pH se realizó medición por duplicado, registrando el respectivo polarograma.

C. Polarografía tast (PTAST)

a) Disolución de trabajo

Se siguió la misma metodología descrita en el punto **2.2.2, B. a)**

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo, en la celda polarográfica, fueron burbujeadas con nitrógeno durante 10 minutos, previo a la medición.

La temperatura de trabajo fue la temperatura ambiental.

Los electrodos usados fueron:

Electrodo de trabajo : Goteo de mercurio (EGM), Metrohm

Electrodo de referencia : Electrodo de calomelano saturado, Metrohm

Electrodo auxiliar : electrodo de platino, Metrohm

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad : 2.5 -10 μ A

Rango de potencial : 0 a -1800 mV

Tiempo de goteo : 0.60 s

Incremento de potencial : 6 mV

c) Estudio de la influencia del pH

Se siguió misma metodología descrita en el punto **2.2.2 B. c)**

D. Voltamperometría cíclica

a) Disolución stock

Se pesó exactamente cerca de 11.95 mg y 6.86 mg de NB y BNB, los cuales fueron disueltos en etanol o dimetilformamida, con ayuda de ultrasonido y luego llevados a un volumen final de 5.0 y 2.0 mL respectivamente en un matraz aforado, para obtener una disolución 1×10^{-2} M.

b) Disolución de trabajo

Se transfirieron 1.0 mL de disolución stock de cada compuesto en estudio en etanol a un matraz aforado de 10 mL y se completó volumen con disolución tampón etanol/ Britton-Robinson (30:70), resultando una disolución de concentración de 1×10^{-3} M.

En el caso de medio no acuoso transfirieron 1.0 mL de disolución stock de compuesto en estudio en dimetilformamida a un matraz aforado de 10 mL y se completó volumen con disolución de perclorato de tetrabutilamonio 0.1 M en dimetilformamida, resultando una disolución de concentración de 1×10^{-3} M.

c) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo, en la celda polarográfica, fueron burbujeadas con nitrógeno durante 10 minutos, previo a la medición.

La temperatura de trabajo fue la temperatura ambiental.

Los electrodos usados fueron:

Electrodo de trabajo	: Gota colgante de mercurio (EGC), BAS, CV-50W
Electrodo de referencia	: Electrodo de calomelano saturado BAS, CV-50W
Electrodo auxiliar	: electrodo de platino BAS, CV-50W

d) Estudio de la influencia del pH y medio de trabajo

En medio acuoso se determinó el comportamiento electroquímico a disoluciones de trabajo 1×10^{-3} M de NB a tres valores de pH distintos: 3.0, 7.0 y 10.0. Se llevó a pH empleando soluciones concentradas de NaOH y HCl. El barrido se efectuó hacia potenciales negativos a partir de 0 mV hasta -2000 mV, variando la velocidad de barrido desde 100 mV/s hasta 10 V/s. Para cada pH y cada velocidad se registró el voltamperograma correspondiente.

E. Estudio cinético mediante polarografía de pulso diferencial (PPD)

a) Disolución de trabajo

Se siguió misma metodología descrita en el punto 2.2.2, B. a)

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo, en la celda polarográfica, fueron burbujeadas con nitrógeno durante 5 minutos, previo a la medición y para luego seguir realizando las mediciones de la disolución cada 20 minutos.

Las temperaturas de trabajo fueron de 25°C, 40°C y 66°C mantenidas con baño termostático en la celda polarográfica para las dos primeras temperaturas. En el tercer caso se realizó en viales sellados en estufa y se fue midiendo en intervalos de tiempo de 10 minutos.

c) Determinación del orden de reacción

Dentro de los métodos existentes para determinar orden de reacción se escogió el método gráfico⁴³. Si se grafica la concentración remanente *versus* el tiempo y la resultante del gráfico es una línea recta, se trata de reacción de orden cero. Si se grafica el logaritmo natural de la concentración remanente *versus* el tiempo y el resultado es una línea recta, se trata de una reacción de orden uno. Ahora bien, si se

grafica el inverso de la concentración remanente *versus* tiempo y se obtiene una recta, se trata de una reacción de orden dos.

d) Determinación de la vida media

Vida media ($t_{1/2}$), es el tiempo necesario para que reaccionen la mitad de las sustancias iniciales presentes, es decir, el tiempo necesario para que se reduzca a la mitad la concentración inicial de las sustancias iniciales.

Para una reacción de primer orden, la vida media viene dada por ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1} \quad t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Donde:
k= pendiente de la recta para cinética de orden uno

e) Determinación de la energía de activación

La energía de activación es un factor determinante de la velocidad de la reacción. La determinación de este parámetro se realizó utilizando el modelo de Arrhenius, a través de la gráfica de $\ln k$ (*pendiente de la recta de cinética*) *versus* $1/T$ (temperatura), que viene dada por la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2} \quad \ln k = -\frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln A$$

Donde:
 E_a = energía de activación
R= constante de los gases ideales 1.98 cal/K · mol
T= temperatura °K
A= factor de frecuencia de colisiones

Haciendo a representación grafica de $\ln k$ frente $1/T$, se obtiene una recta de cuya pendiente se puede obtener el valor de la energía de activación.

2.2.3 Desarrollo de la metodología electroanalítica

A. Polarografía de pulso diferencial

a) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de NB y BNB, de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 1×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. Alícuotas

de cada disolución stock de NB y BNB fueron transferidas a un matraz de 25 mL, completando volumen con etanol/tampón Britton-Robinson (30:70). Se ajustó el pH para cada una de las soluciones de trabajo a pH 4.0 y pH 5.0 para NB y BNB, respectivamente. Estas soluciones fueron medidas por polarografía de pulso diferencial.

b) Estudio de repetibilidad⁴⁴

Se midieron 10 veces consecutivas, por la técnica de polarografía de pulso diferencial, 25 mL de disoluciones de trabajo de 7×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 3×10^{-6} M de NB y BNB, etanol/tampón Britton-Robinson (30:70) a pH 4.00 y pH 5.00 respectivamente. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la corriente de pico de la señal obtenida.

c) Estudio de reproducibilidad

Se midieron 10 veces consecutivas, repitiendo estudio de repetibilidad, por la técnica de polarografía de pulso diferencial, variando el día de medición y el operador.

d) Límite de detección y límite de cuantificación

Para la estimación del límite de detección y cuantificación⁴⁵ se procedió como sigue:

- * A partir de la curva de calibración se obtuvo el valor de la pendiente de la recta (m).
- * Se midió por duplicado cuatro soluciones en el rango inferior de la curva de calibración (2×10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 5×10^{-6} M). Para estas cuatro soluciones se obtuvo los valores promedios de la corriente de pico (\bar{X}_{ip}) y la desviación estándar (σ).
- * Se representó gráficamente \bar{X}_{ip} versus la concentración de la muestra y se determinó la ecuación de la nueva recta. Al extrapolar la respuesta a concentración cero se obtuvo la respuesta del blanco (Y_{bl}).
- * Se representó gráficamente σ versus la concentración de muestra y al extrapolar la respuesta a concentración cero, se obtuvo el valor de la respuesta de la desviación estándar del blanco (σ_{bl}).

El límite de detección (LD) (Ecuación 3) y el límite de cuantificación (LC) (Ecuación 4) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

Ecuación 3
$$LD = \left(\frac{Y_{bl} + 3 \sigma_{bl}}{m} \right)$$

Donde,
m= pendiente de curva de calibración. Parámetro indicativo de la sensibilidad del método analítico.
Y_{bl}= respuesta del blanco
σ_{bl}= desviación estándar del blanco

Ecuación 4
$$LC = \left(\frac{Y_{bl} + 10 \sigma_{bl}}{m} \right)$$

e) Estudio de interferentes

i) Disolución de trabajo

Se transfirieron 2.5 mL de disolución stock de NB y BNB a un matraz aforado de 25 mL y se completó volumen con disolución tampón etanol/ Britton-Robinson (30:70), ajustada a pH 4.00 y pH 5.00 respectivamente, resultando una disolución de concentración de 1×10^{-4} M.

ii) Condiciones de trabajo

A las disoluciones de trabajo, se adicionaron distintos excipientes (almidón, Avicel PH101, dióxido de titanio, Explotab, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, PEG 400, PEG 4000, sorbitol, talco), a las cuales se registró su respuesta electroquímica frente a estos distintos excipientes por polarografía de pulso diferencial.

2.2.4 Caracterización espectrofotométrica

A. Preparación de disoluciones

a) Tampón Britton-Robinson 0.1 M

Se procedió de igual forma que en **2.2.2 A.a)**

b) Disolución stock de los compuestos en estudio

Se procedió de igual forma que en **2.2.2 A.b)**

c) Disolución blanco

Se realizó con etanol/ tampón Britton-Robinson 0.1 M (30:70)

B. Determinación de la constante de disociación [K_a]

A partir de una disolución 5×10^{-5} M de NB y BNB se estudió la influencia del pH sobre su comportamiento espectral en un rango de pH de 2 a 12, utilizando como disolvente una disolución etanol/tampón Britton-Robinson (30:70), a la cual se fue incrementando el pH en 0.5 unidades, empleando soluciones concentradas de NaOH o HCl, según sea necesario, hasta alcanzar el pH requerido.

Las soluciones preparadas a cada pH fueron medidas en el espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico, efectuando un barrido de longitud de onda entre 200 y 400 nm.

Los resultados derivados del estudio de la influencia del pH en el comportamiento espectral de NB y BNB permitieron la determinación del pK_a aparente, mediante la utilización de la ecuación de Henderson - Hasselbach modificada⁴⁶:

Ecuación 5

$$pH = pK_a + \log \left[\frac{A_{max} - A}{A - A_{min}} \right]$$

Donde:
 A_{max} = máxima absorbancia observada en el rango de pH escogido
 A_{min} = mínima absorbancia observada en el rango de pH escogido
 A = absorbancia al pH de la disolución en el rango de pH escogido

Haciendo la representación gráfica de pH *versus* $\log (A_{max} - A)/(A - A_{min})$ se obtiene una recta cuyo intercepto es el valor de pK_a .

C. Determinación de la constante de permeabilidad efectiva [P_e]

Esta determinación se realizó mediante el ensayo de *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (PAMPA)⁴⁷, para lo cual se ensayaron tres concentraciones para NB (5×10^{-6} M, 7×10^{-6} M, 1×10^{-5} M) y otras tres para BNB (5×10^{-5} M, 7×10^{-5} M, 1×10^{-4} M). Se prepararon 5.0 mL de cada una con un contenido de 1% de dimetilsulfóxido, completando volumen con tampón fosfato salino 0.01 M pH 7.4. De estas soluciones se tomaron 280 μ L y se adicionaron en el compartimiento dador de la placa del sistema PAMPA, sobre esta se puso la placa aceptora del sistema, a la cual se colocan 4 μ L de fosfolípido (L- α -fosfatidilcolina) disuelto en N-dodecano para emular barrera hematoencefalica, luego se adicionan en el compartimiento dador 280 μ L de tampón fosfato salino 0.1 M pH 7.4 y se deja incubar a una temperatura de 25°C por 4 y 16

horas. De la misma forma se procedió con las sustancias control, las cuales fueron tiopental 40µg/mL como control positivo y bromuro de clidinio 800µg/mL, como control negativo. La cuantificación se realizó por espectrofotometría, realizando las mediciones a 270 nm y 253 nm para NB y BNB, respectivamente. En el caso de NB las soluciones antes de la medición fueron llevadas a pH 3.0 con 110 µL de HCl 0.1 N. La determinación de la permeabilidad efectiva se efectuó con la siguiente ecuación⁴⁸.

Ecuación 6

$$P_e = \frac{-218.3}{t} \log \left[1 - \frac{2C_{a(t)}}{C_{d(t_0)}} \right] \bullet 10^{-6} \text{ cm / s}$$

Donde:
t = tiempo de incubación
C_{a(t)} = Concentración celda aceptor en el tiempo
C_{d(t₀)} = Concentración celda dadora tiempo cero

A partir de valores de permeabilidad efectiva según Li Di y cols. para la predicción de la capacidad de presentar transporte pasivo *in vivo* de diferentes compuestos a través de la barrera hematoencefalica, se diseñó la siguiente tabla para los valores de permeabilidad efectiva y su transporte a través de membrana en el SNC. (Tabla 1).

Tabla 1: Predicción de transporte *in vivo* a partir de valores de P_e para el ensayo PAMPA

Permeabilidad efectiva [P _e]	Transporte interior SNC
> 0.4×10 ⁻⁵ cm/seg	Transporte SNC positivo
0.2×10 ⁻⁶ – 0.4×10 ⁻⁶ cm/seg	Transporte SNC cuestionable
< 0.2×10 ⁻⁶	Transporte SNC negativo

2.2.5 Desarrollo de la metodología espectrofotométrica

A. Espectroscopia UV- Vis

a) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de NB y BNB de concentración 1×10⁻³ M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 1×10⁻⁶ M hasta 1×10⁻⁴ M. Alícuotas

de la disolución stock de NB y BNB fueron transferidas a un matraz de 5 mL, completando volumen con etanol/tampón Britton-Robinson (30:70). Se ajustó el pH para cada una de las disoluciones de trabajo de NB y BNB a pH 3.0 y pH 5.0, respectivamente. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 270 nm y 253 nm para NB y BNB, respectivamente.

b) Estudio de repetibilidad

Se procedió de igual forma que en **2.2.3 A.b)**. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la señal obtenida experimentalmente a 270 nm y 253 nm para NB y BNB, respectivamente.

c) Estudio de reproducibilidad

Se repite estudio de repetibilidad, por la técnica de UV-Vis, variando el día de medición y el operador.

d) Limite de detección y limite de cuantificación

Para la estimación del limite de detección y limite de cuantificación se siguió metodología descrita en el punto **2.2.3, A., d)**

2.2.6 Caracterización cromatográfica

A. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

a) Preparación de disolución tampón fosfato 0.05 M pH 4.5

Se disolvió 7.09 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en 500 mL de agua desionizada (Milli-Q), ajustando a pH 4.5 con ácido fosfórico. Se completó a un volumen final de 1000.0 mL con agua desionizada.

b) Disolución stock

Se procedió de igual forma que en **2.2.2 A.b)**

B. Determinación del coeficiente de partición $[P]^{49,50}$

Para la determinación de este parámetro se realizó una curva de calibración de log P versus log k (k= factor de capacidad). Para tal efecto se seleccionaron seis sustancias

de referencia de coeficiente de partición octanol/agua conocidos, cercanos al coeficiente de partición estimado para NB y BNB (obtenidos en HyperChem 6.01, basado en el método de *Ghose, Pritvchett y Crippen*).

Se prepararon disoluciones de las sustancias de referencia, NB y BNB en una mezcla de metanol/agua (75:25), quedando de una concentración final de aproximadamente 1×10^{-4} M. Para finalizar a la disolución resultante se agregó 0.0080g de KNO_3 , como sustancia que no se retiene en la columna, con el fin de poder calcular posteriormente los parámetros de interés.

Las soluciones resultantes se monitorearon en las siguientes condiciones experimentales del método cromatográfico:

- * Fase Móvil : metanol/ agua (75:25)
- * Flujo : 1.0 mL/min.
- * Volumen de inyección : 20 μL
- * Temperatura : 25°C

Posteriormente se calculó el factor de capacidad para cada compuesto y se realizó la curva de calibración $\log P_{ow}$ versus $\log k$.

C. Determinación de la constante de permeabilidad efectiva [P_e]

Se procedió de igual forma que en **2.2.4 C**, para luego ser cuantificadas usando las respectivas curvas de calibración obtenidas en el método cromatográfico.

2.2.7 Desarrollo de la metodología cromatográfica

A. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

a) Estudios de estabilidad acelerada

i) Hidrólisis ácida

Se tomaron 3.0 mL de disolución stock de NB y BNB por separado y se llevaron a volumen final de 5.0 mL con HCl 36.5% en un matraz aforado. Luego se transfirió a un balón de destilación de 25.0 mL, conectado a un tubo refrigerante y se calentó a reflujo por tres horas.

ii) Hidrólisis básica

Se tomaron 3.0 mL de disolución stock de NB y BNB por separado y se llevaron volumen final de 10.0 mL con NaOH 1N en un matraz aforado. Luego se transfirió a un balón de destilación de 25.0 mL, conectado a un tubo refrigerante y se calentó a reflujo por una hora.

iii) Fotólisis

Para realizar la fotólisis de los fármacos se utilizó una cámara oscura, la cual se mantuvo a temperatura constante (25°C). Las disoluciones a fotolizar (soluciones stock), fueron transferidas alrededor de 3 mL de ellas por separado a una cubeta de cuarzo, las cuales fueron dispuestas frente a la fuente de radiación, luz UV a 15 cm de la muestra, por un tiempo de 2 horas y 17 horas (1.2×10^{19} cuantos/seg., determinado usando el actinómetro químico de ferrioxalato de potasio)⁵¹

Además se dejó una muestra de disolución stock a fotolizar con luz día por un periodo de una semana.

b) Ensayo de aptitud del sistema⁵²

Se prepararon 10 mL de una disolución en la que contenía NB o BNB y los productos de estudio de estabilidad acelerada (fotólisis, hidrólisis ácida e hidrólisis básica) y precursor(es) de síntesis (nitrobenzaldehído para NB y NB para BNB). Para finalizar, a la disolución resultante se adicionó 0.0080g de KNO_3 como sustancia que no se retiene en la columna, a fin de poder calcular los parámetros de interés.

Posteriormente se monitoreó la disolución resultante por HPLC, ensayándose distintas proporciones de acetonitrilo/agua, metanol/agua, acetonitrilo/tampón fosfato 50 mM, pH 4.5, donde se fue aumentando la proporción de fase orgánica en la fase móvil desde una proporción 20/80 a 80/20 (acetonitrilo/agua y/o tampón fosfato pH 4.50, metanol/agua y/o tampón fosfato pH 4.5), a fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas de trabajo.

En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α). Finalmente, luego del desarrollo de este estudio y el análisis de los diferentes parámetros, se obtuvieron las condiciones óptimas experimentales para el método cromatográfico.

c) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de NB y BNB, de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 1×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. Alícuotas de la disolución stock de NB y BNB fueron transferidas a un matraz de 2 mL, completando volumen con etanol.

d) Estudio de repetibilidad

Se procedió de igual forma que en **2.2.3 A.b)**. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la señal obtenida experimentalmente a 270 nm y 250 nm para NB y BNB, respectivamente.

e) Estudio de reproducibilidad

Se repite estudio de repetibilidad, por la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia, variando el día de medición y el operador.

f) Límite de detección y límite de cuantificación

Para la estimación del límite de detección y límite de cuantificación se siguió metodología descrita en el punto **2.2.3, A., d)**.

2.2.8 Modelado molecular

A. Dinámica molecular⁵³

Para iniciar una dinámica molecular (DM) se debe indicar las coordenadas iniciales y velocidades iniciales. Las coordenadas se pueden obtener de una estructura minimizada, mientras que las velocidades se calculan aleatoriamente siguiendo una distribución de Maxwell a la temperatura de referencia.

Un punto clave para que se pueda aplicar en la práctica esta metodología es el tiempo de integración, puesto que esto implica el uso de cálculos numéricos, así que estos han de ser pequeños. Este tiempo viene dado por la escala temporal de los movimientos más rápidos en la simulación, que corresponden al *stretching* de los enlaces. Esto implica que el tiempo de integración sea del orden de los femtosegundos. Como consecuencia, la escala de tiempo real que se puede conseguir en la simulación es del orden de varios nanosegundos, teniendo en cuenta que la duración de la

simulación involucra la realización de miles de cálculos para evaluar la energía potencial de las diferentes conformaciones.

Para este protocolo se utilizó el campo de fuerzas de AMBER implementado en Discover 3.0. Después de un periodo de equilibrio de 50 ps se realizó una dinámica en el vacío a 298° K y por un periodo de 1 ns, en pasos de 1 fs. Se empleó una constante dieléctrica dependiente de la distancia ($\epsilon = 4r$). Durante toda la dinámica se comprobó que no existiera una variación considerable en la temperatura y la energía total del sistema.

En los conformeros obtenidos para NB se estudiaron las distancias entre el protón (-NH) y el grupo nitro (NO_2), y los ángulos dihedros entre la estructura benzimidazólica y el sustituyente *o*-nitrofenilo. Para los conformeros de BNB se estudiaron los ángulos dihedros entre la estructura benzimidazólica y el sustituyente N-benzoilo, y la estructura benzimidazólica el sustituyente *o*-nitrofenilo. Además, para BNB se estudió la interplanaridad entre la estructura benzimidazólica el sustituyente N-benzoilo, y la estructura benzimidazólica el sustituyente *o*-nitrofenilo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización electroquímica

3.1.1 Polarografía de pulso diferencial (PPD)

NB y BNB en mezcla hidroalcohólica (etanol/tampón Britton-Robinson 0.1M: 30/70), presentan señales de reducción sobre el electrodo de goteo de mercurio (EGM), presentando una respuesta catódica bien definida en un rango de pH (3-12) para NB y en un rango de pH (3-9) para BNB, debido a problemas de estabilidad para este compuesto(Figura 2).

En los rangos estudiados de pH se observan dos señales de reducción, la señal 1 debido a la reducción del grupo nitro y la señal 2, probablemente correspondiente al enlace azometino⁵⁴. Ambas señales son pH dependientes, desplazándose progresivamente hacia potenciales más negativos mientras más alcalino es el pH.

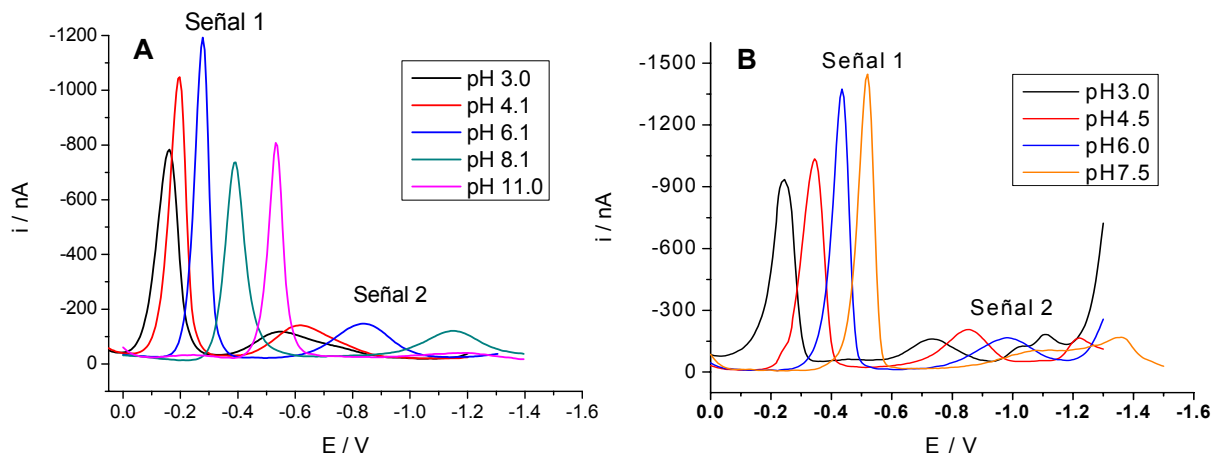


Figura 2. Polarogramas de pulso diferencial de (A) NB y (B) BNB en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a distintos pH.

Comparando la reducción entre ambos compuestos se puede apreciar una diferencia en el potencial de reducción de señal 1 entre siendo BNB más difícil de reducir en ~ 50 mV; esto puede ser explicado a un aumento de la densidad electrónica en la estructura de BNB, por el sustituyente en la posición 2, el cual NB no lo posee, lo

que dificulta la reducción del grupo nitro para BNB, este efecto será explicado con mayor detalle con dinámica molecular.

La evolución de los potenciales de pico (E_p) con el pH del medio de ambos compuestos (Figura 3) presentan puntos de quiebre: para NB a pH 4.5 y pH 9.00 (en señal 1) y a pH 4.0 y 8.5 (en señal 2) y para BNB hay un quiebre a pH 4.0 (en señal 1) y a pH 4.5 (en señal 2), lo cual tendría directa relación con la protonación-desprotonación de los nitrógenos ubicados en el anillo imidazólico. En el caso de NB el primer quiebre puede deberse a la protonación-desprotonación del nitrógeno en posición 3 para ambas señales y el segundo quiebre a la protonación-desprotonación del N-H en posición 1 para ambas señales (Ver figura 1). En el caso de BNB, este quiebre se debería a la protonación-desprotonación del nitrógeno en posición 3 (Ver figura 1).

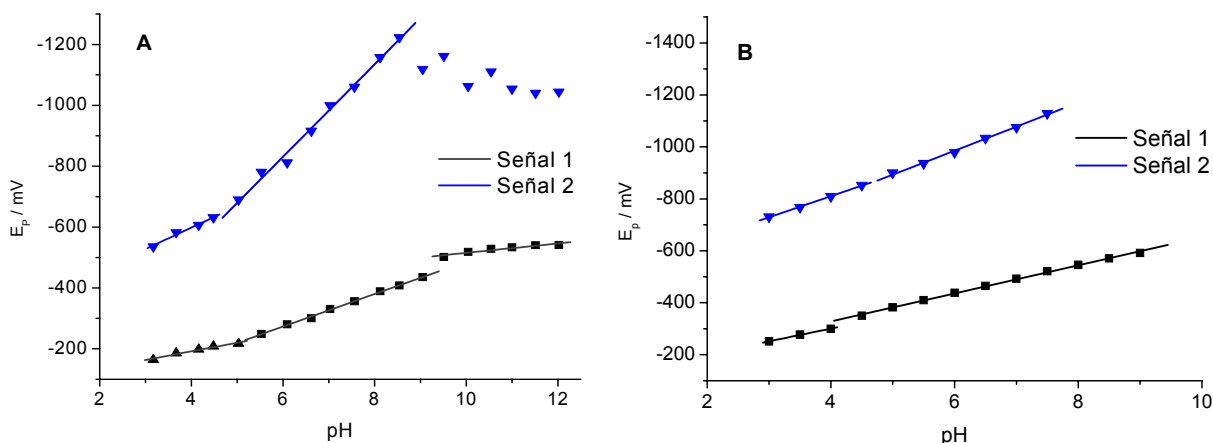


Figura 3. Dependencia del potencial de pico (E_p) con el pH en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1M (30/70). **(A)** NB **(B)** BNB

Graficando la evolución de las corrientes de pico (I_p) con el pH (Figura 4), se puede observar para NB un incremento no lineal de I_p hasta pH 5.0, desde este pH en adelante se puede observar una disminución de I_p hasta pH 9.0, y desde pH 10.0 en adelante hay un incremento en I_p . Esto se podría explicar, como en el caso anterior, a protonación-desprotonación de los nitrógenos en el anillo imidazólico. Para el caso de BNB se observa un incremento de I_p no lineal hasta pH 6.5, desde este pH en adelante

se observa un decremento de I_p hasta pH 9.0 y de este pH en adelante no se puede realizar debido a la inestabilidad de BNB. Al igual que en el caso anterior, estos incrementos y decrementos de la I_p podrían tener una relación con la protonación-desprotonación en el anillo imidazólico.

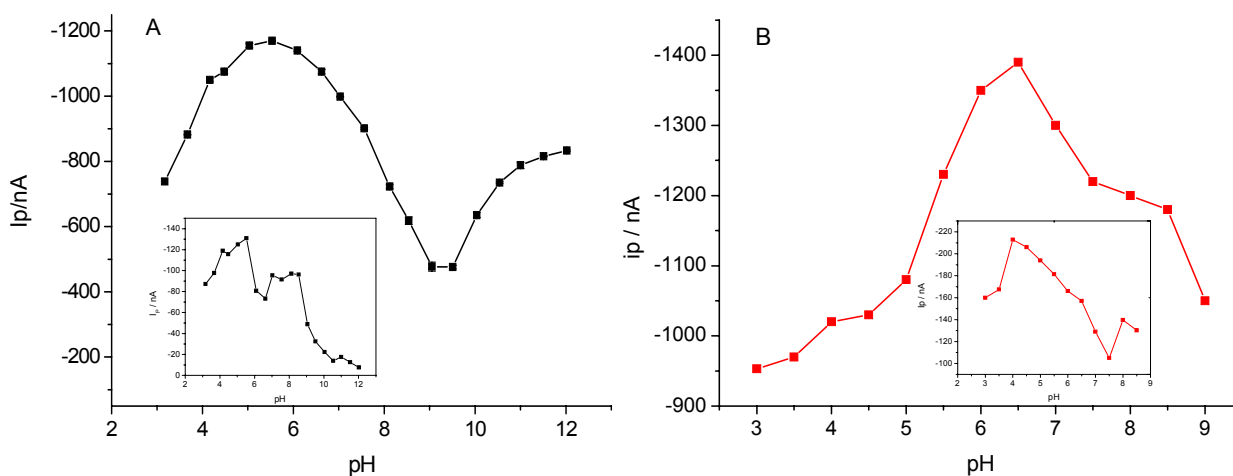


Figura 4. Dependencia de corriente de pico (I_p) con el pH en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70). **(A)** Señal 1 de NB **(B)** señal 1 de BNB. Insertos: señal 2.

3.1.2 Polarografía tast (PTAST)

El estudio de la influencia del pH sobre la reducción de NB realizado por PTAST, presenta una respuesta catódica bien definida en un amplio intervalo de pH (3-12) (Figura 5), se pueden apreciar dos ondas polarográficas, una primera onda (señal 1) bien definida en todo rango de pH, mientras que la segunda onda (señal 2) no se define completamente en todos los pH. Además se puede apreciar que ambas ondas son pH dependientes, de igual forma que en PPD. Para el caso de BNB también se pueden apreciar dos ondas polarográficas en el rango de pH estudiado: la señal 1 bien definida en todo el rango de pH, y una segunda onda (señal 2) poco definida. Además, al igual que en PPD, ambas son pH dependientes.

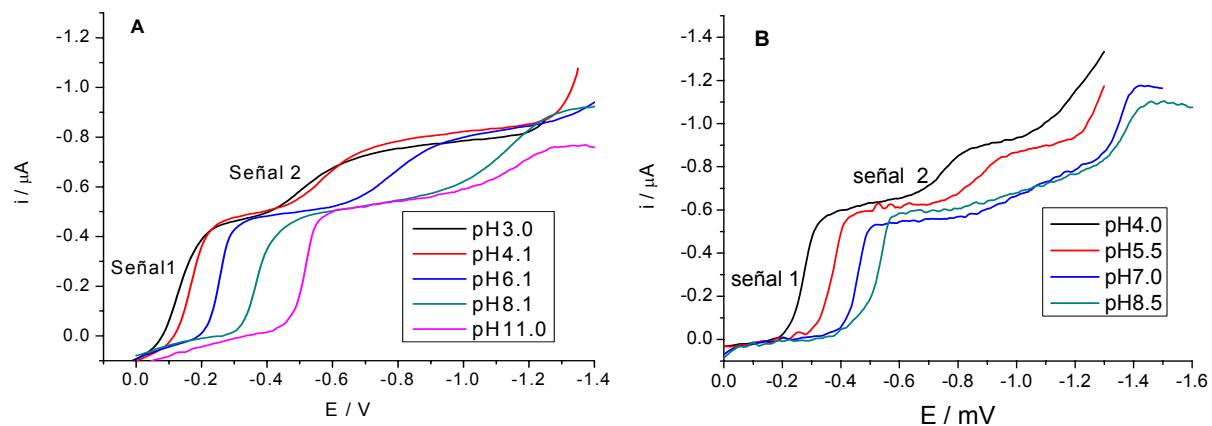


Figura 5. Polarogramas tast de **(A)** NB y **(B)** BNB en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a distintos pH.

La evolución del potencial de media onda ($E_{1/2}$) respecto a las variaciones de pH (Figura 6), al igual que por la técnica PPD, muestra un comportamiento lineal con el pH, presentando quiebres en la recta de NB a pH 4.5 y pH 9.0. Como se explicó anteriormente, estos quiebres se deberían al equilibrio de protonación-desprotonación de los nitrógenos ubicados en el anillo imidazólico. En el caso de BNB hay un cambio en el punto pH de este quiebre de pH 4.0 a pH 5.5.

Además la respuesta de la corriente límite (i_{lim}) con el pH para ambos compuestos presenta un comportamiento independiente de la acidez del medio (Figura 7). Como la corriente límite de una transferencia de electrones está directamente relacionada con el mecanismo involucrado y además es una expresión cuantitativa de la velocidad con que ocurre una transferencia de electrones en la interfase electrodo-disolución, y no así la corriente obtenida por PPD, se puede apreciar que en el rango de pH estudiado en ambos compuestos de estudio el mecanismo de transferencia de electrones es el mismo y a una misma velocidad⁵⁵.

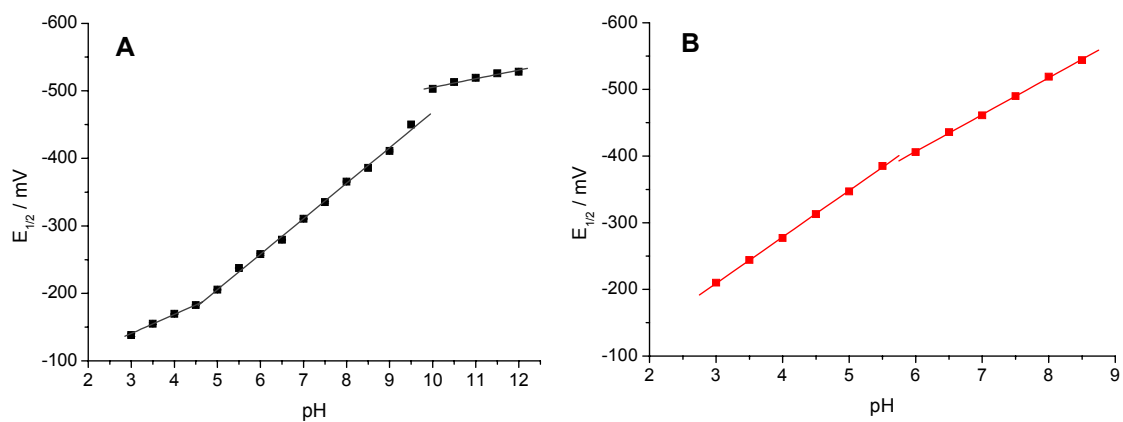


Figura 6. Dependencia de potencial de media onda ($E_{1/2}$) con el pH en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70). **(A)** NB **(B)** BNB.

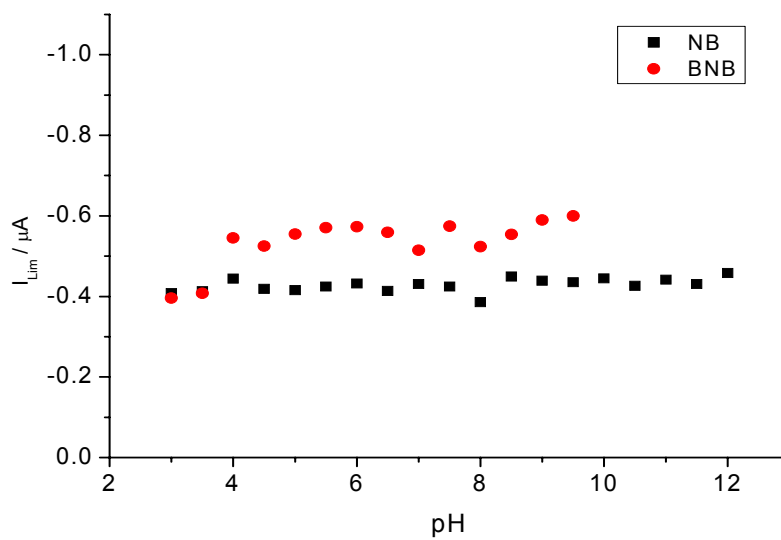


Figura 7. Dependencia de corriente limite (I_{Lim}) con el pH de NB y BNB en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70).

3.1.3 Voltametría cíclica (VC)

Con el fin de completar los estudios electroquímicos básicos de NB, se empleó VC con electrodo de gota colgante de mercurio (EGC) como electrodo de trabajo. El estudio se realizó en medio acuoso a diferentes velocidades de barrido (V_b 0.1 V/s hasta 10 V/s), realizándose a tres valores de pH: 3.0, 7.0 y 10.0.

Los voltamogramas de NB en medio acuoso muestran señales irreversibles, que se desplazan hacia potenciales más negativos con el pH. A pH 3.0 y pH 7.0, igual a lo observado por PPD, se presentan dos señales de reducción, una primera señal a potenciales más positivos, correspondiente a la reducción del grupo nitro vía cuatro electrones⁵⁶ y una segunda señal a potenciales más negativos, probablemente correspondiente al enlace azometino. A pH 10.0 se observa sólo una señal de reducción, la cual correspondería a la reducción del grupo nitro (Figura 8), además a pH 7.0 y pH 10 se aprecia una señal de oxidación debida al derivado hidroxilaminico.

El comportamiento de la variación de la corriente respecto al incremento de la velocidad de barrido del experimento, representados en un gráfico de $\log I_p$ vs $\log V_b$ nos entrega información acerca de la naturaleza del proceso redox. Si la pendiente del gráfico tiende a 1, el proceso está controlado por la adsorción de la especie electroactiva sobre el electrodo de trabajo. Por otra parte, si la pendiente es cercana a 0.5 el proceso es controlado por la difusión⁵⁷.

Para NB a los distintos pH estudiados, las señales presentan pendientes cercanas a 0.5 valores que indican que los procesos de reducción tienen un control difusivo (Figura 9). En tabla 2 se presenta un resumen de los valores obtenidos

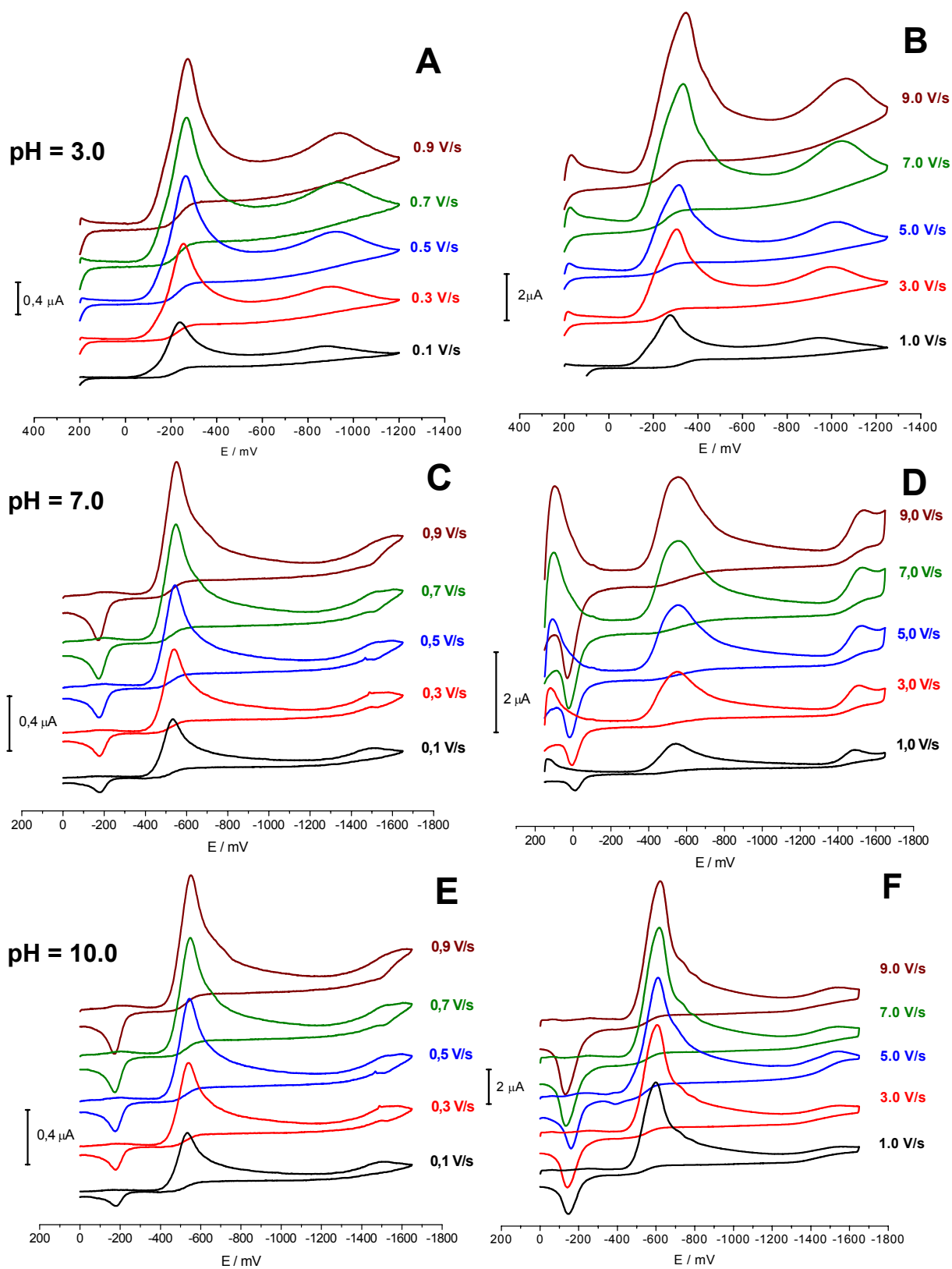


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos. Disolución de NB 1×10^{-3} M, en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70). **A**, **C** y **E**: V_b de 0.1 V/s a 0.9 V/s a pH 3.0, 7.0 y 10.0, respectivamente. **B**, **D** y **F**: V_b de 1.0 V/s a 9.0 V/s a pH 3.0, 7.0 y 10.0, respectivamente.

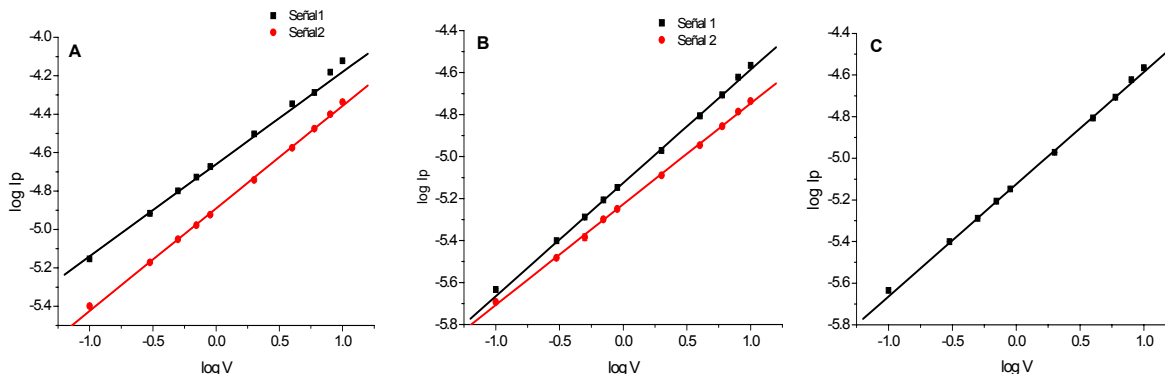


Figura 9. VC. Dependencia de $\log I_p$ con $\log V_b$ a pH 3.0 (A), pH 7.0 (B, y pH 10.0 (C). Disolución de NB 1×10^{-3} M, en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70).

Tabla 2: Dependencia de $\log I_p$ con $\log V_b$ a pH 3.0, 7.0 y 10.0.

pH	Señal	Valor pendiente
3.0	1	0.47
	2	0.53
7.0	1	0.53
	2	0.47
10.0	1	0.53

3.2 Caracterización espectroscópica UV-Vis

Con el objetivo de profundizar en el comportamiento químico de NB y BNB, se realizó el estudio de la influencia de pH en tampón Britton-Robinson por espectroscopia UV-Visible (Figura 10).

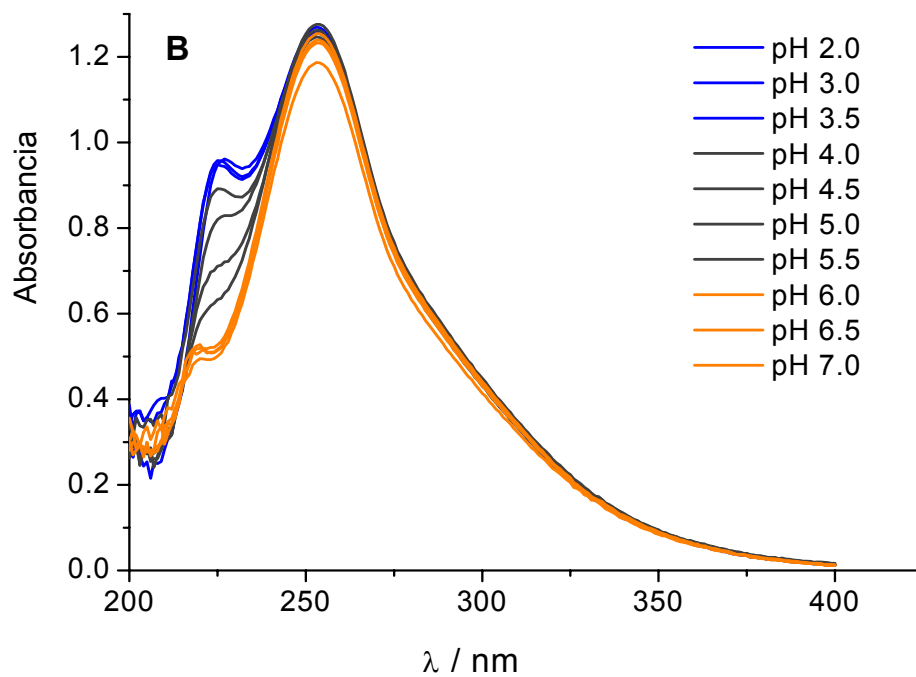
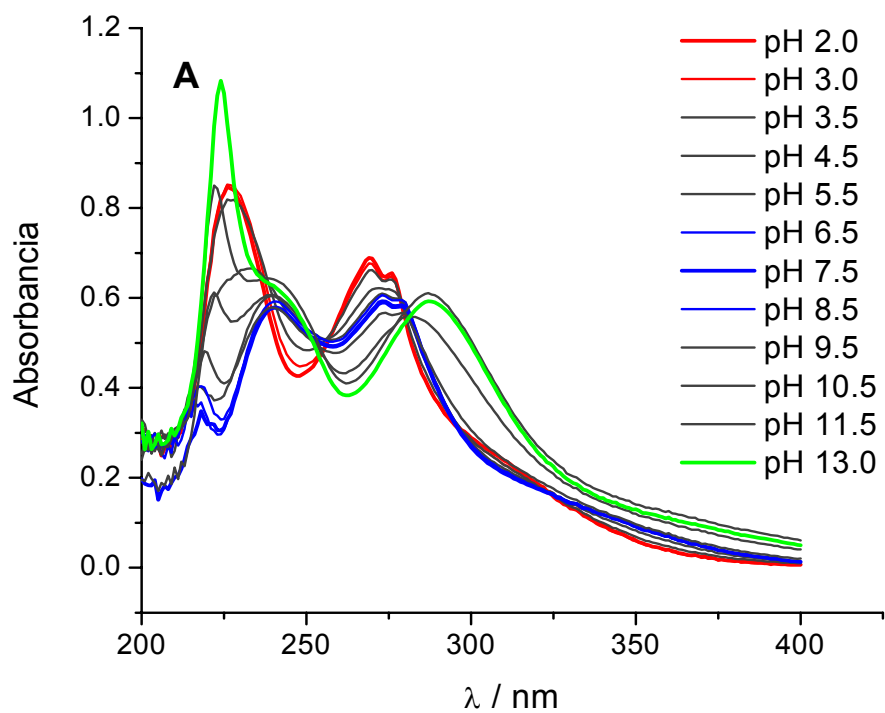


Figura 10. Espectros de absorción UV-Vis de **(A)** NB 5×10^{-5} M, **(B)** BNB 5×10^{-5} M, en etanol/ Tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a diferentes valores de pH.

La Figura 10A presenta los espectros obtenidos para NB en un rango de pH de 2.0 a 13.0. Los espectros presentan máximos de absorción importantes a 226 nm y 270 nm. A medida que aumenta la alcalinidad del medio, se genera un desplazamiento batocrómico del máximo de la banda de absorción de 270 a 288 nm. En la Figura 10B se presentan los espectros obtenidos para BNB en un rango de pH de 2.0 a 7.0. Los espectros presentan máximos de absorción importantes en medio ácido a 223 y 253 nm. A medida que aumenta la alcalinidad del medio, se genera un efecto hipocrómico de la banda a 223 nm, mientras que a 253 nm se puede apreciar una independencia de la absorbancia con el aumento del pH.

El efecto del pH de la disolución sobre la absorbancia de NB fue estudiado a las longitudes de onda de los máximos de absorción a 226, 270 y 288 nm, revelando que la absorbancia es independiente de la acidez del medio, a valores de pH 1.5 – 4.5, 6.5 – 8.5 en el máximo de absorción de 226 nm y superiores a 12.0 par los máximos de absorción de 270 nm y 288 nm (Figura 11). Del comportamiento de la absorbancia de las señales espectrales a estas longitudes de onda, se puede inferir que NB presenta dos constantes de disociación en el rango de pH estudiado. En el caso de BNB, las longitudes de ondas máximas de absorción fueron a 223 y 253 nm, revelando que la absorbancia es independiente de la acidez del medio, a valores de pH 2.0 - 3.5 y superiores a 6.0 (Figura 12). Del comportamiento de la absorbancia de las señales espectrales a 223 nm, se puede inferir que BNB presenta sólo una constante de disociación en el rango de pH estudiado, a diferencia de NB, ya que BNB se encuentra sustituido en posición 1

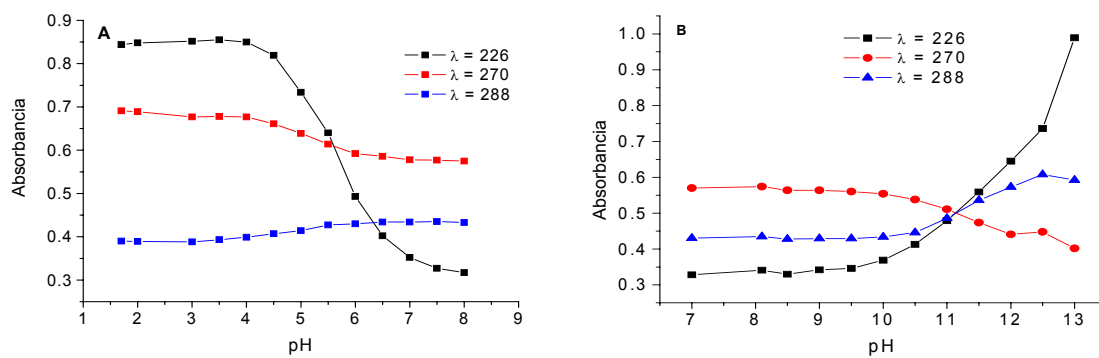


Figura 11. (A) Dependencia de la absorbancia de NB con el pH (1.7 – 8.0) a λ 226, 270 y 288 nm. **(B)** Dependencia de la absorbancia de NB con el pH (7.0 – 13.0) a λ 226, 270 y 288 nm

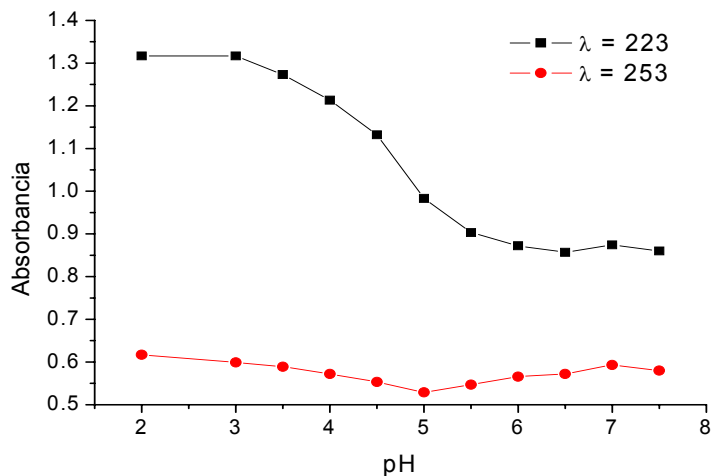


Figura 12. Dependencia de la absorbancia de BNB con el pH (2.0 – 7.5) a λ 223 y 253 nm.

Los datos obtenidos en este estudio fueron utilizados para calcular los pK_a de NB y BNB, de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbach modificada (Ecuación 5). Los valores de pK_a para NB y BNB fueron calculados por el método de regresión lineal, donde el pH fue la variable dependiente y el $\log (A_{\max} - A)/(A - A_{\min})$ la variable independiente, como se presenta en la Figura 13. De esta forma, los valores de pK_a obtenidos fueron de 5.69 ± 0.06 y 11.38 ± 0.03 para NB y de 4.9 ± 0.02 para BNB.

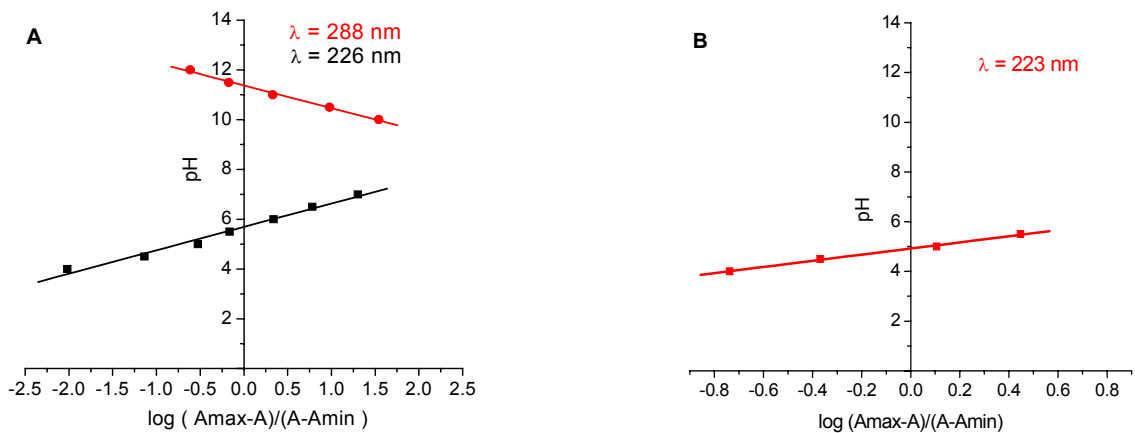


Figura 13. Determinación de pK_a por UV-Vis mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach. (A) NB (B) BNB.

De acuerdo a la literatura⁵⁸, el valor de la constante de acidez determinado para benzimidazol por el sistema predictivo computacional, corresponde a un pK_a de 5.41 para el nitrógeno en posición 3 (-N=C-). Por otra parte, existen descritos valores de pK_a determinados por titulación potenciométrica⁵⁹ para el nitrógeno en posición 3 del anillo benzimidazólico de 5.47 y 5.69, en tanto que para 2-fenilbenzimidazol se reportan valores de 5.14 y 5.36. En nuestro caso, a través de la técnica espectrofométrica, se obtuvo para NB un pK_a de 5.69 para el nitrógeno en posición 3 y también fue posible calcular un segundo pK_a con un valor de 11.38, correspondiente al nitrógeno ubicado en posición 1 (-NH), lo que nos permite decir que no hay formación de puente de hidrógeno intramolecular entre este hidrogeno y el grupo nitro, que sería probable debido a la cercanía entre ambos grupos. En el caso de BNB se obtuvo un pK_a de 4.90, que daría cuenta del equilibrio ácido base del nitrógeno en posición en 3 (Figura 14). Estos valores son cercanos a los reportados en literatura para moléculas con el anillo base benzimidazol, lo cual concordaría con los valores obtenidos para nuestros compuestos de síntesis.

Por otro lado, comparando los pK_a descritos y calculados para NB y BNB con el comportamiento electroquímico, se puede apreciar que existe una relación directa entre los quiebres a pH 4.5 y pH 9.0 para NB y de BNB a pH 4.0 en el comportamiento del potencial de reducción de NB y BNB con el pH (Figura 3).

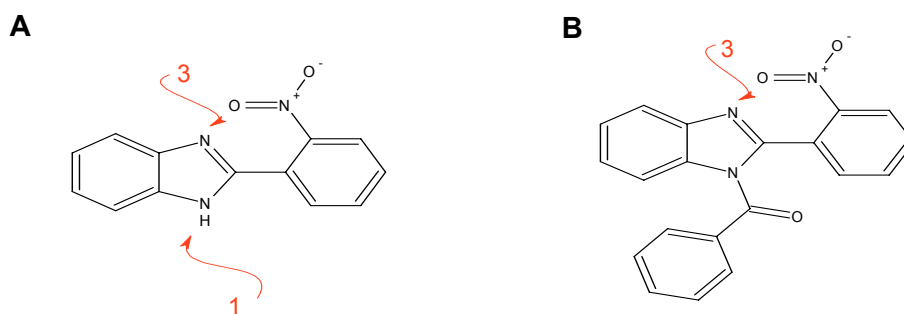


Figura 14. (A) Sitios de ionización de NB. **(B)** Sitio de ionización de BNB.

3.3 Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación.

Con los resultados obtenidos en la caracterización electroquímica, complementados por la información espectroscópica UV-Vis, se determinó utilizar una disolución de trabajo hidroalcohólica de NB y BNB (etanol /tampón Britton-Robinson 0.1 M: 30/70), para realizar el desarrollo de metodologías analíticas UV-Vis y electroquímica (PPD), y en el caso de HPLC se utilizó una disolución alcohólica. Bajo estas condiciones de trabajo se desarrollaron las metodologías analíticas, resultados que se expondrán y desarrollarán paralelamente a continuación.

3.3.1 Estudios de selectividad

El estudio de selectividad incluye ensayos de degradación, en los cuales se somete a los compuestos en estudio a condiciones especiales de inestabilidad, como hidrólisis, fotodescomposición u oxidación, con la intención de comprobar si las metodologías desarrolladas son capaces de producir una señal medible que se deba sólo a la presencia del analito, libre de interferentes, tales como excipientes, productos laterales, metabolitos o productos de degradación. Así NB y BNB fueron sometidos a distintos tipos de degradación simulada bajo condiciones controladas, y comportamiento de señal frente excipientes de formulaciones farmacéuticas en vistas a una posible matriz de estos compuestos en una forma farmacéutica. Se midieron los ensayos por técnicas de PPD y HPLC.

A. Estudio de excipientes farmacéuticos por polarografía de pulso diferencial

El estudio de interferentes fue realizado para NB y BNB, en disoluciones a las cuales se adicionaron distintos excipientes clásicos de formulaciones farmacéuticas, para apreciar cuanto afectan estos en la respuesta electroquímica. Como se puede apreciar en la Tabla 3, los excipientes que más afectan la respuesta electroquímica para ambos compuestos, desplazando el potencial de pico hacia potenciales más catódicos y además disminuyendo la respuesta frente al electrodo, son la hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, PEG 400 y PEG 4000. Esto puede

deberse a un aumento en la viscosidad de la solución y que afectan el proceso de difusión de los compuestos.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación y potenciales de pico para NB y BNB (PPD)

Excipiente	NB		BNB	
	NB %	E _p NB /mV*	BNB %	E _p BNB /mV**
Almidón	98.3	-120	98.9	-373
Explotab	96.6	-122	98.9	-374
Avicel PH 101	95.0	-119	99.0	-373
Lactosa	97.7	-121	97.6	-371
Hidroxipropilcelulosa	69.6	-125	95.7	-375
Hidroxipropilmetilcelulosa	34.6	-319	77.1	-379
Sorbitol	95.0	-123	99.2	-373
Dióxido de titanio	96.6	-122	98.2	-371
PEG 400	56.4	-183	67.2	-403
PEG 4000	57.2	-187	71.9	-399
Talco	93.5	-120	98.9	-371

*E_p NB solo = 119 mV

**E_p NB solo = 370 mV

B. Estudio de interferentes mediante HPLC

Para este efecto se llevó a cabo el ensayo de aptitud del sistema de acuerdo a lo establecido en la USP XXVII. En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α), obteniéndose como condiciones óptimas de selectividad para el método:

Para 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB)

* Programa	: Gradiente
* Fase móvil	: metanol/ agua (20:80) por 1 minutos seguido de rampa lineal por 5 minutos hasta una proporción final de metanol/ agua (80:20)
* Flujo	: 1.2 mL/min
*Tiempo de desarrollo de cromatograma	: 18 minutos
*Temperatura	: 40 °C
* Detector de arreglo de fotodiodos	: $\lambda = 270 \text{ nm}$

Para N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB)

* Programa	: Isocratico
* Fase móvil	: acetonitrilo/tampón fosfato pH 4.5 (55:45)
* Flujo	: 1.2 mL/min
* Tiempo de desarrollo de cromatograma	: 10 minutos
* Temperatura	: 20 °C
* Detector de arreglo de fotodiodos	: $\lambda = 250 \text{ nm}$

En estas condiciones, NB (Figura 15) exhibió los siguientes parámetros cromatográficos (Tabla 4);

Tabla 4: Parámetros cromatográficos para NB

Compuesto	tr	R	k'	α
Precursor de NB	7.724	-	3.12	1.10
NB	8.356	1.05	3.46	-
Fotólisis de NB (Luz día)	10.285	5.7	4.49	1.29

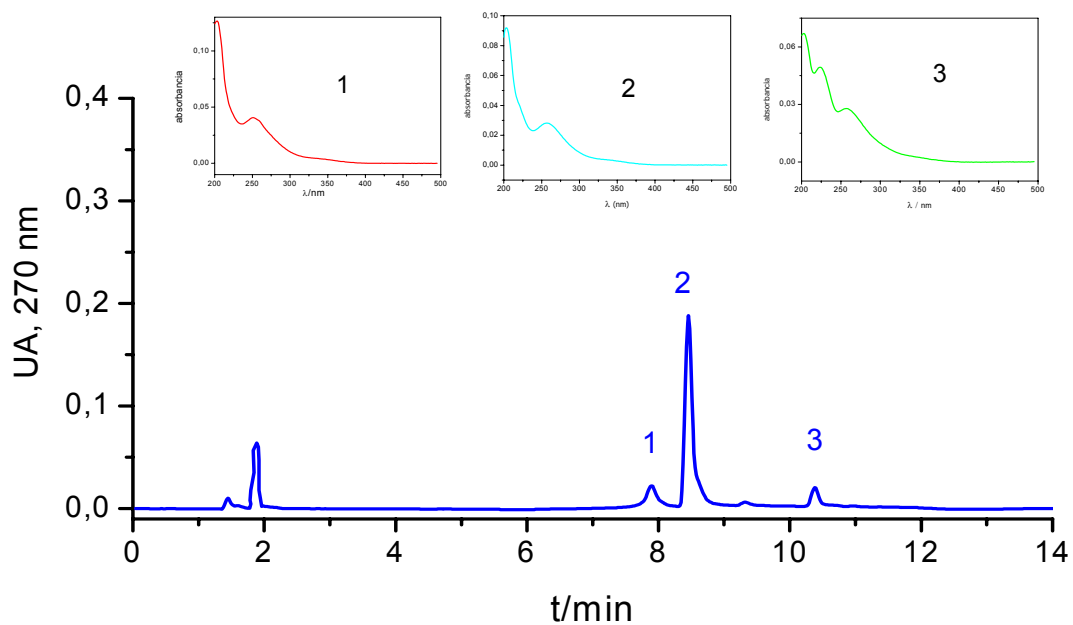


Figura 15. Cromatograma del ensayo de selectividad para NB en condiciones óptimas: (1) nitrobenzaldehído, (2) NB, (3) producto de fotólisis. Inserto: espectros UV de cada señal.

En las condiciones óptimas, BNB (Figura 16) exhibió los siguientes parámetros cromatográficos (Tabla 5):

Tabla 5: Parámetros cromatográficos para BNB

Compuesto	tr	R	k'	α
Precursor de BNB	2.581	-	0.92	-
BNB	7.117	7.82	4.30	4.53

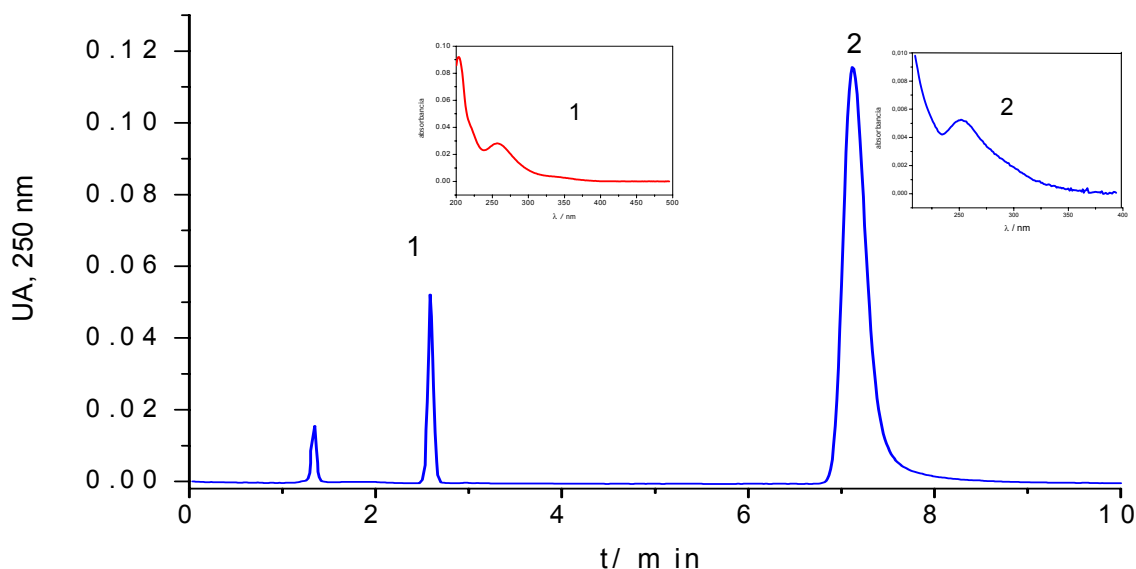


Figura 16. Cromatograma del ensayo de selectividad para BNB en condiciones óptimas: (1) hidrólisis OH⁻, hidrólisis H⁺, NB, (2) BNB. Inserto: espectros UV de cada señal.

3.3.2 Curvas de calibración

A. Polarografía de pulso diferencial

Primero se realizó un estudio de concentración en un amplio rango de trabajo desde 1×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M, observándose la variación de la corriente de pico (I_p) respecto a la concentración de la señal 1, a un potencial de -119 mV y -373 mV para NB y BNB, respectivamente (Figuras 17 y 18). Se obtuvo una dependencia lineal entre 1×10^{-6} M hasta 7×10^{-5} M para ambos compuestos y se construyeron las respectivas curvas de calibración (Figura 19) y se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\text{NB} \Rightarrow I_p = 1.28 \times 10^7 \text{ [nA/M]} \times C \text{ [M]} + 4.29 \text{ [nA]} \quad (r=0.9977, n=8)$$

$$\text{BNB} \Rightarrow I_p = 1.00 \times 10^7 \text{ [nA/M]} \times C \text{ [M]} + 4.39 \text{ [nA]} \quad (r=0.9999, n=7)$$

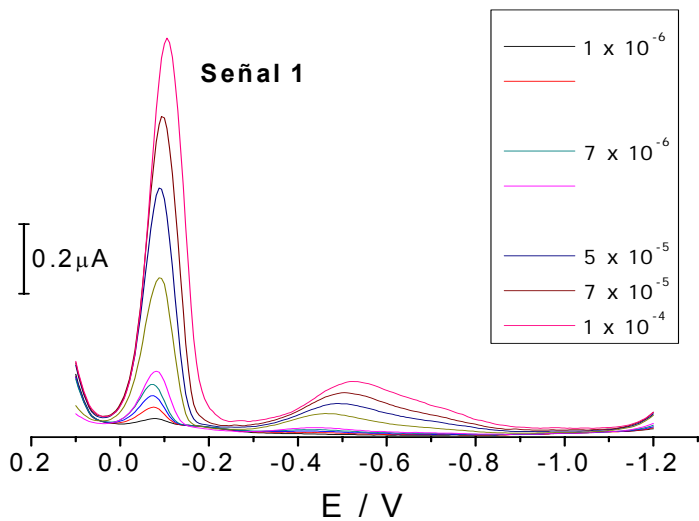


Figura 17. Polarogramas de la curva de calibración por PPD para NB (1×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a pH 4.0.

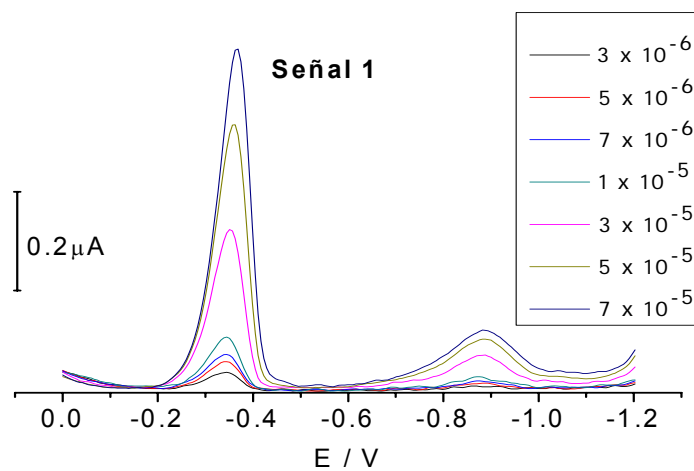


Figura 18. Polarogramas de la curva de calibración por PPD para BNB (3×10^{-6} M - 7×10^{-5} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a pH 5.0.

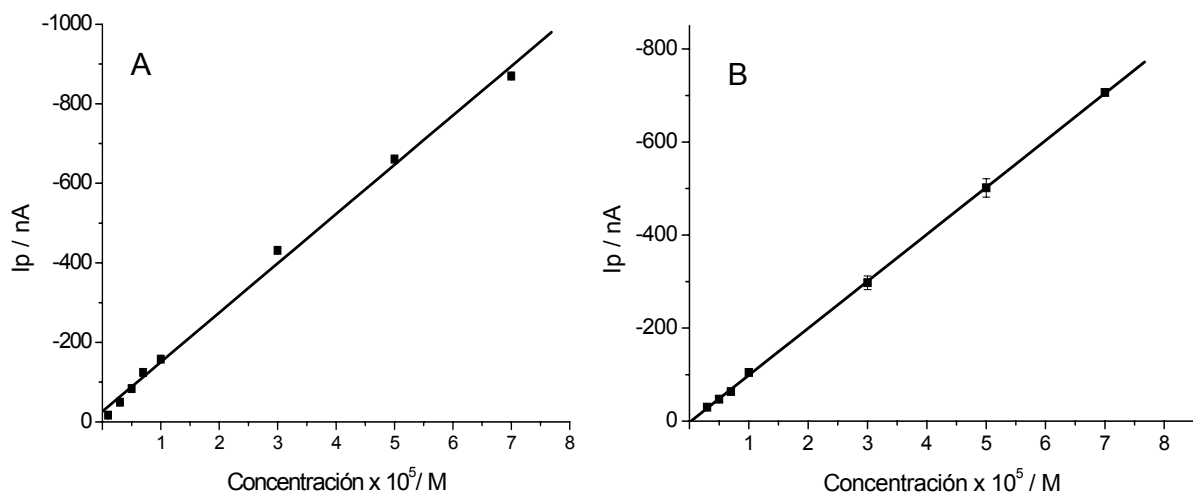


Figura 19. Curvas de calibración por PPD. **(A)** NB (1×10^{-6} M - 7×10^{-5} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70), pH 4.0. **(B)** BNB (3×10^{-6} M - 7×10^{-5} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70), pH 5.0. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

B. Espectroscopia UV-Vis

La curva de calibración por UV se realizó en un intervalo de concentración desde 1×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M y 1×10^{-6} M hasta 7×10^{-5} M para NB y BNB, respectivamente (Figuras 20 y 21).

El gráfico de la curva de calibración (Figura 22) entrega las siguientes ecuaciones leídas en los máximos de absorción $\lambda = 270$ nm para NB y $\lambda = 253$ nm para BNB:

$$\text{NB} \Rightarrow A = 1.59 \times 10^4 [\text{M}^{-1}] \times C [\text{M}] + 0.014 \quad (r=0.9998, n=9)$$

$$\text{BNB} \Rightarrow A = 2.40 \times 10^4 [\text{M}^{-1}] \times C [\text{M}] - 0.039 \quad (r=0.9992, n=8)$$

Además, a partir de estos datos se calcularon los valores de absorbilidad molar, los cuales fueron 15900 (270 nm, medio acuoso ácido) para BN y 24000 (253 nm, medio acuoso ácido) para BNB.

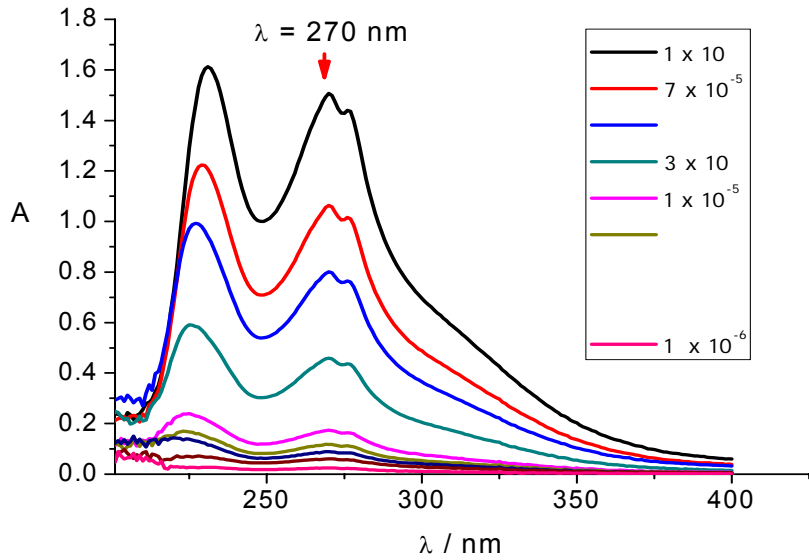


Figura 20. Espectros de curva de calibración por UV-Vis. Disoluciones de NB (1×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a pH 3.0.

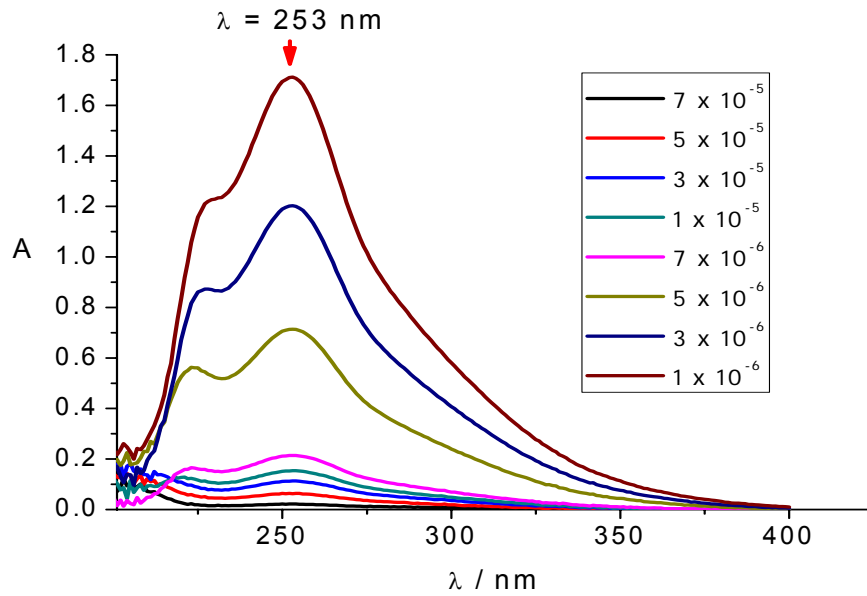


Figura 21. Espectros de curva de calibración por UV-Vis. Disoluciones de BNB en concentraciones entre 1×10^{-6} M hasta 7×10^{-5} M en etanol/ Tampón Britton-Robinson 0.1M (30/70) a pH 4.0

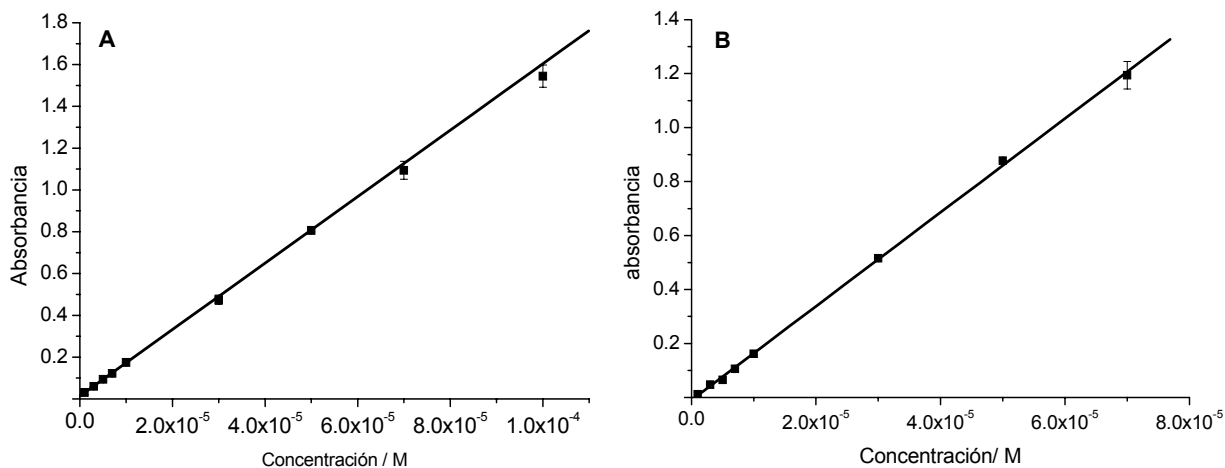


Figura 22. Curvas de calibración por UV-Vis. **(A)** NB (1×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70), pH 3.0. **(B)** BNB (1×10^{-6} M - 7×10^{-5} M) en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70), pH 5.0. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

C. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Antes de realizar la curva de calibración por HPLC, se llevó a cabo el ensayo de aptitud del sistema de acuerdo a lo establecido en la USP XXVII. (Ver punto 3.3.4.B)

Una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas de trabajo, se llevaron a cabo los demás ensayos de validación de la metodología cromatográfica. Para tal efecto se construyó una curva de calibración por HPLC acoplado a detector UV con arreglo de fotodiodos (Figura 23), en el intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 1×10^{-3} M, para ambos compuestos. El gráfico de la curva de calibración entrega las siguientes ecuaciones leídas en los máximos de absorción $\lambda = 270$ nm para NB y $\lambda = 250$ nm para BNB:

$$\text{NB} \Rightarrow \text{ABC} = 1.262 \times 10^{10} \times C + 2842.25 \quad (r=0.9999, n=9)$$

$$\text{BNB} \Rightarrow \text{ABC} = 2.005 \times 10^{10} \times C + 1577.77 \quad (r=0.9996, n=9)$$

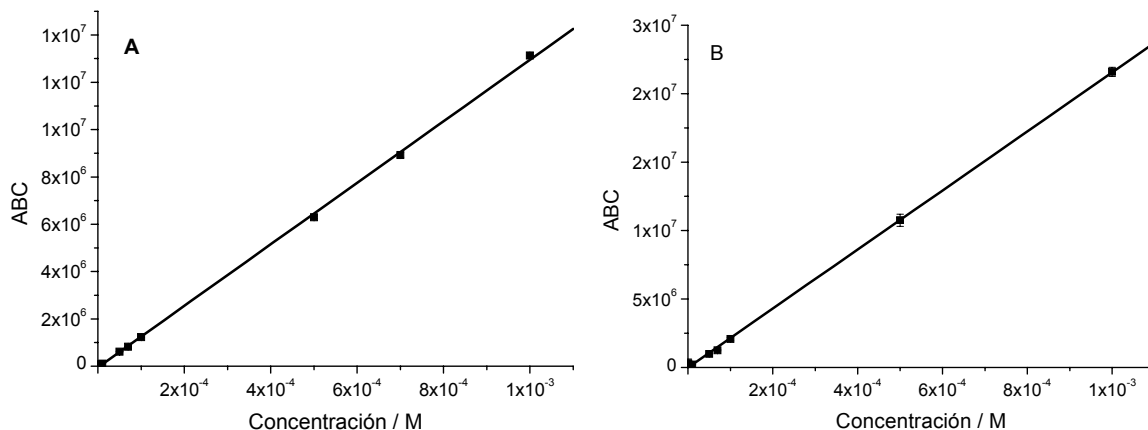


Figura 23. Curvas de calibración por HPLC. **(A)** NB (1×10^{-6} M - 1×10^{-3} M) en etanol. **(B)** BNB (1×10^{-6} M - 1×10^{-3} M) en etanol. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

3.3.3 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados usando las ecuaciones 3 y 4 (ver metodología), para cada una de las técnicas (Tabla 6).

Tabla 6: Límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) para PPD, UV y HPLC

Método	NB		BNB	
	LD	LC	LD	LC
PPD	4.5×10^{-7}	1.2×10^{-6}	7.8×10^{-7}	2.5×10^{-6}
UV	6.4×10^{-7}	1.8×10^{-6}	1.1×10^{-6}	2.8×10^{-6}
HPLC	3.3×10^{-7}	5.8×10^{-7}	3.8×10^{-7}	1.2×10^{-6}

Los resultados indican que el método menor límite de detección en la determinación de NB y BNB es HPLC. Por otra parte las tres técnicas presentan valores aceptables para aplicabilidad de éstas en la determinación de NB y BNB.

3.3.4 Estudio de repetibilidad

En una cuarta etapa se realizó estudio de repetibilidad. Los resultados de este estudio muestran valores de CV menores a 2% para NB y menores al 4% para BNB, demostrando que las técnicas estudiadas presentan una adecuada repetibilidad para el análisis de NB y BNB (Tabla 7).

Tabla 7: Estudio de repetibilidad (n= 10) para NB y BNB, por PPD, UV y HPLC.

	NB	BNB
Método	CV, %	CV, %
PPD	1.7(7×10 ⁻⁵ M)-0.4(1×10 ⁻⁵ M)-1.0(3×10 ⁻⁶ M)	0.6(7×10 ⁻⁵ M)-2.2(1×10 ⁻⁵ M)-2.4(3×10 ⁻⁶ M)
UV	0.3(7×10 ⁻⁵ M)-1.0(1×10 ⁻⁵ M)-1.5(3×10 ⁻⁶ M)	1.3(7×10 ⁻⁵ M)-1.6(1×10 ⁻⁵ M)-3.9(4×10 ⁻⁶ M)
HPLC	0.45 (5×10 ⁻⁵ M) – 0.33 (7×10 ⁻⁴ M)	0.37 (5×10 ⁻⁵ M) – 0.37 (7×10 ⁻⁴ M)

3.3.5 Estudio de reproducibilidad

Con el fin de establecer la confiabilidad de los métodos utilizados, se realizó estudio de reproducibilidad, para asegurar el grado de concordancia entre resultados individuales (Tabla 8). Los resultados de este estudio muestran valores de coeficientes de variación menores a 3% para NB y menores al 4.5% para BNB, demostrando tener buena reproducibilidad.

Tabla 8: Estudio de reproducibilidad (n= 10) para NB y BNB por PPD, UV y HPLC.

	NB	BNB
Método	CV, %	CV, %
PPD	2.3(7×10 ⁻⁵ M)-2.6(1×10 ⁻⁵ M)-1.5(3×10 ⁻⁶ M)	1.4(7×10 ⁻⁵ M)-4.1(1×10 ⁻⁵ M)- 4.1(3×10 ⁻⁶ M)
UV	1.6(7×10 ⁻⁵ M)-3.0(1×10 ⁻⁵ M)-3.0(3×10 ⁻⁶ M)	1.8(7×10 ⁻⁵ M)-2.5(1×10 ⁻⁵ M)-4.4(4×10 ⁻⁶ M)
HPLC	0.51 (5×10 ⁻⁵ M) – 0.48 (7×10 ⁻⁴ M)	0.76 (5×10 ⁻⁵ M) – 0.39 (7×10 ⁻⁴ M)

3.4 Aplicación de las metodologías analíticas

3.4.1 Estudio de estabilidad hidrolítica de BNB por PPD

El presente estudio se realizó a tres concentraciones iniciales, tres temperaturas y ocho pH, en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70), con el fin de interpretar la influencia de estas variables sobre la velocidad de degradación de BNB.

Con el fin de determinar el orden de reacción, se realizó el estudio de degradación hidrolítica a diferentes concentraciones iniciales de BNB (1.2×10^{-4} M, 9.0×10^{-5} M y 1.2×10^{-5} M), hasta aproximadamente el 50% de degradación de BNB, donde se puede observar que el orden de la reacción no se modifica con la concentración inicial de BNB. En consecuencia, de los experimentos realizados a distintas concentraciones iniciales, se puede concluir que la degradación hidrolítica corresponde a una cinética de pseudo orden uno, ya que, como se observa en la figura 24, no existe un cambio significativo en las pendientes de los gráficos $\ln C$ versus t , para una misma temperatura y pH.

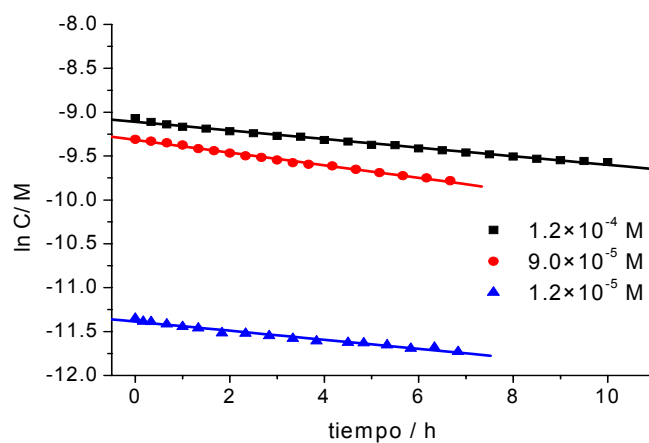


Figura 24. Curvas de decaimiento de BNB a distintas concentraciones iniciales, pH 7.4, 25° C

Para evaluar el efecto del pH respecto a la degradación de BNB, se ensayaron los pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.4, 8.0, 9.0, 10.0. Como se aprecia en el polarograma a pH 7.4 (Figura 25), aparece una nueva señal correspondiente a un precursor de síntesis de BNB, en este caso es correspondiente a NB, lo mismo ocurre en los demás pHs ensayados.

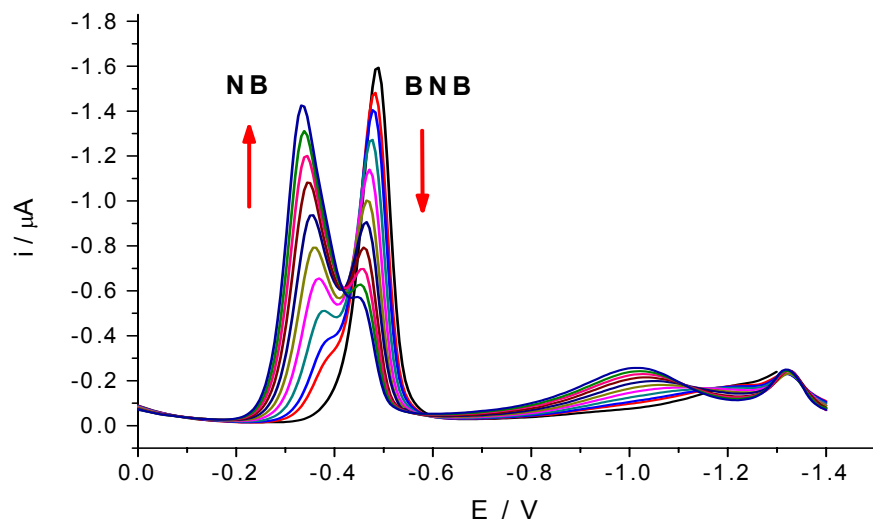


Figura 25. Polarogramas de decaimiento de BNB 1×10^{-4} M en etanol/tampón Britton-Robinson 0.1 M (30/70) a pH 7.4, 40° C

Por otra parte, a las concentraciones ensayadas, el decaimiento de BNB es pH dependiente; se puede observar que la cinética de degradación mas lenta de pH 3.0 hasta pH 5.0 donde se alcanza una mayor estabilidad de BNB y desde pH 5.0 hasta pH 10.0 la cinética de degradación aumenta drásticamente, llegando a ser instantánea la degradación de BNB (Figura 26).

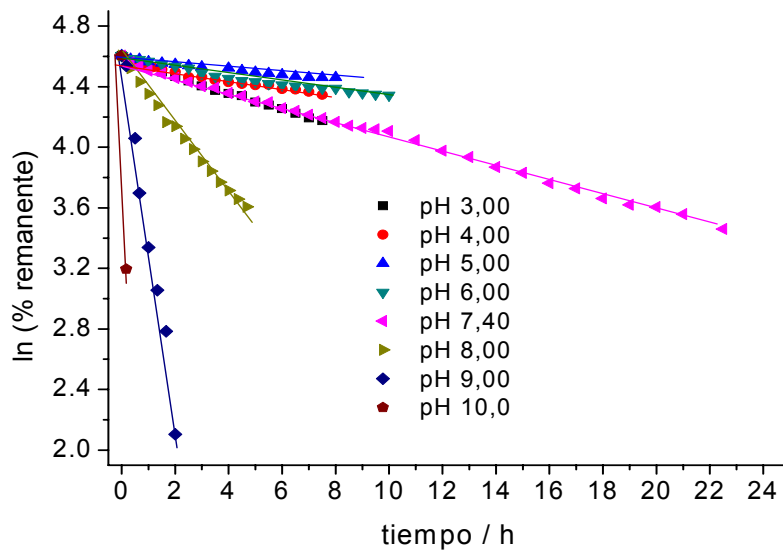


Figura 26. Efecto del pH sobre la degradación de BNB a 25° C

A partir de los resultados obtenidos del estudio de la influencia del pH sobre la velocidad de degradación de BNB, dando como resultado una cinética de pseudo orden uno, se pudo calcular la vida media a partir de la ecuación 1 (ver metodología) (Tabla 9) y además, al graficar $\log k$ versus pH, se puede apreciar el típico gráfico en forma de V donde las porciones extremas indican los procesos de catálisis ácida y básica, respectivamente y además el punto de inflexión corresponde a la mayor estabilidad para el analito⁶⁰, el cual para BNB es el de pH 5.0 (Figura 27). Además se puede apreciar en esta figura que a medida que se incrementa el pH, BNB es más inestable, presentando una vida media de sólo 5 minutos a pH 10.

Tabla 9: Valores de constantes de degradación y vidas medias a distintos pH

pH	Constante de degradación (k , hrs ⁻¹)	Vida media ($t_{1/2}$, hrs)
3.0	9.36×10^{-4}	12.33
4.0	5.17×10^{-4}	22.33
5.0	2.94×10^{-4}	39.22
6.0	4.33×10^{-4}	26.66
7.4	8.15×10^{-4}	14.16
8.0	3.58×10^{-3}	3.22
9.0	2.03×10^{-2}	0.57
10.0	0.14	0.08

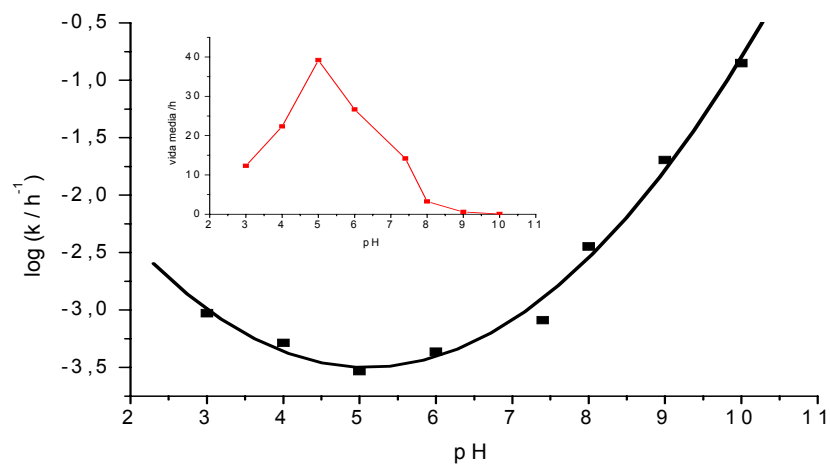


Figura 27. Efecto de pH sobre $\log k$ de BNB. Inserto: efecto de pH sobre vida media.

Llama la atención el cambio de la constante de decaimiento a pH ácidos y pH básicos, esta situación puede deberse a la existencia de dos mecanismos de degradación diferentes. A pH ácidos ocurre una catálisis ácida con una protonación del oxígeno carbonílico y posterior ataque nucleófilo por parte del agua del medio, dando como productos de degradación a NB y ácido benzoico (Figura 28). Por otro lado, a pH básicos ocurre una catálisis básica con un ataque nucleofílico por hidroxilos predominantes en el medio básico sobre el enlace amida y posterior ruptura de éste, dando como productos de degradación a NB y benzoato (Figura 29)

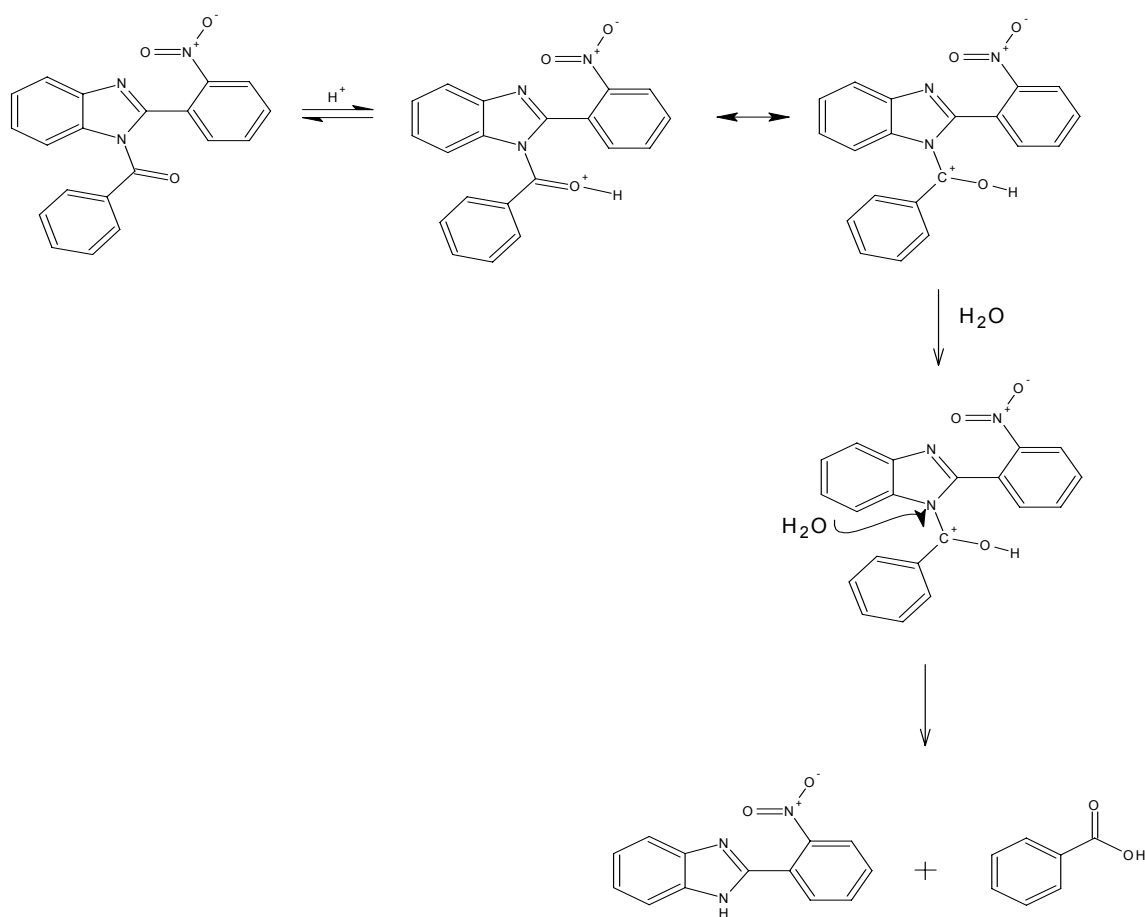


Figura 28. Mecanismo propuesto de degradación ácida de BNB

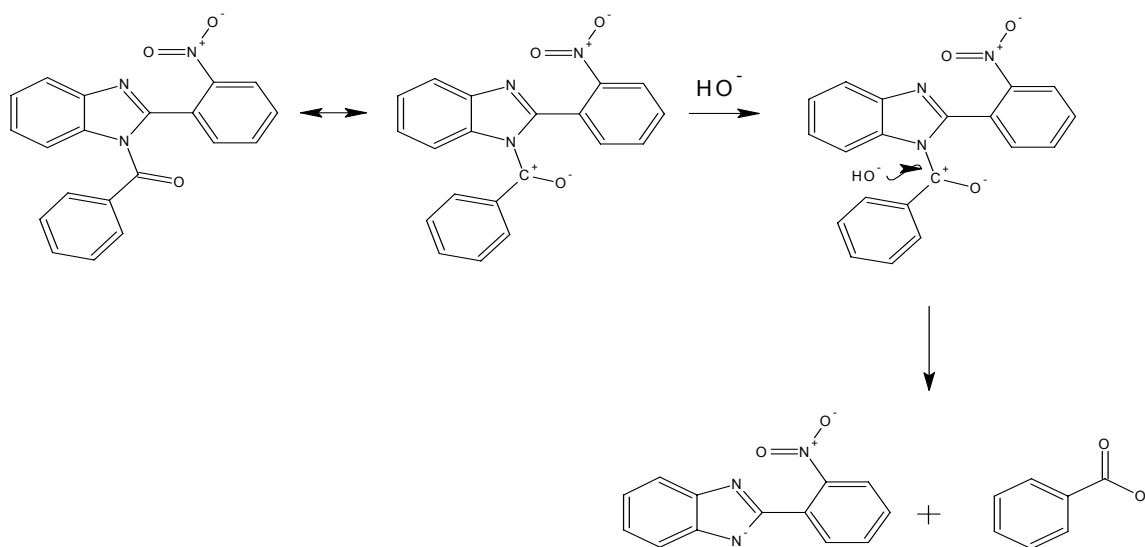


Figura 29. Mecanismo propuesto para la degradación de BNB en medio alcalino

Con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura sobre la degradación hidrolítica de BNB, se llevaron a cabo experimentos a tres temperaturas: 25, 40 y 66 °C. Donde se calculó la velocidad de degradación a partir de las pendientes de las curvas. Como se puede observar en la figura 30 las pendientes de las curvas (k) aumentan en forma concomitante con el incremento de la temperatura. A partir de estos resultados, se calculó la *Energía de Activación* (E_a) correspondiente (Figura 31), empleando el modelo de *Arrhenius* descrito en la ecuación 2 (ver metodología), que indica cuánta es la energía requerida para formación de los productos de degradación, que en este caso son los productos de hidrólisis en las condiciones ensayadas. Es así que para este sistema se requeriría un aporte de energía de 14.90 Kcal/mol, para la formación de los productos de degradación, valor de energía característico para procesos de degradación hidrolítica.

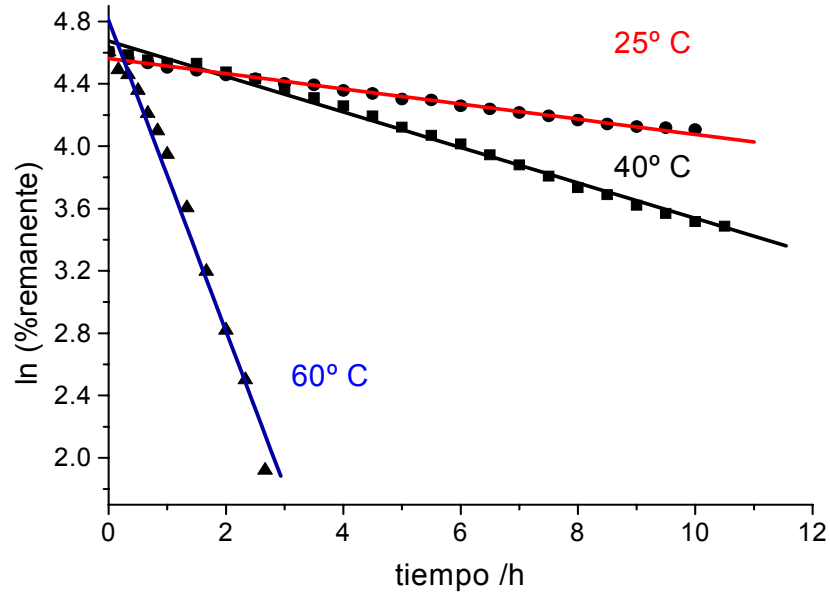


Figura 30. Efecto de la temperatura sobre la degradación de BNB a pH 7.4

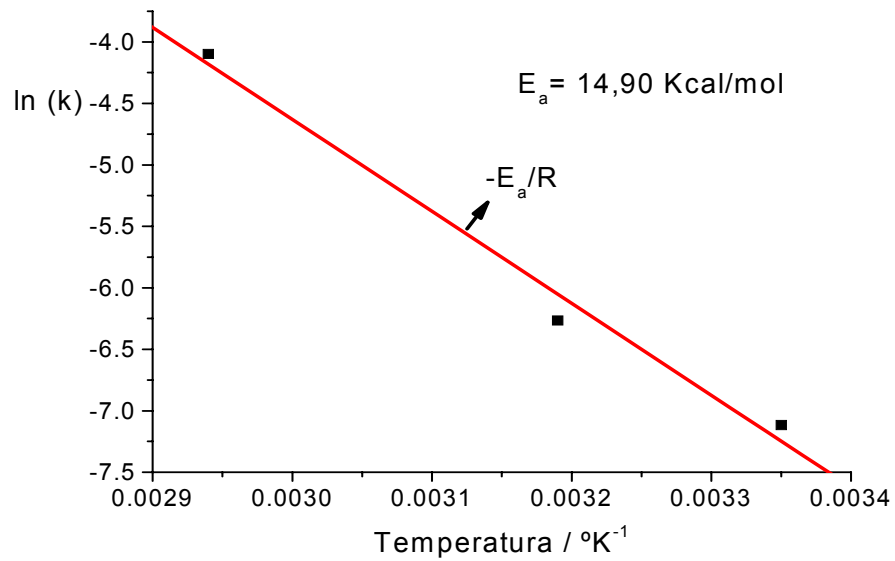


Figura 31. Representación grafica de ln k frente 1/T para BNB a pH 7.4

3.4.2 Determinación de coeficiente de partición (log P_{ow})

Para la determinación de este parámetro se realizó una curva de calibración mediante HPLC, en la cual se graficó log P *versus* log k (k= factor de capacidad). Para tal efecto se seleccionaron seis sustancias de referencia⁶¹ de coeficiente de partición octanol/agua conocidos (ácido benzoico, benzofenona, difenilamina, fenantreno, naftaleno, timol) (Tabla 10), cercanos al coeficiente de partición estimado para NB y BNB (obtenidos en HyperChem 6.01, basado en el método de *Ghose, Pritvchett y Crippen*), los cuales fueron de 3.07 y 4.40, respectivamente. Para realización de esta determinación se siguió la metodología descrita (Ver metodología), obteniéndose los siguientes valores de log k descritos en la tabla 10.

Tabla 10: Valores obtenidos de log k y valores de log P_{ow} de sustancias de referencia utilizadas

Referencia	Log k	Log P _{ow}
Ac. benzoico	-0.513	1.9
Benzofenona	0.303	3.2
Timol	0.403	3.3
Difenilamina	0.438	3.4
Naftaleno	0.596	3.6
Fenantreno	1.009	4.5

Al graficar los valores obtenidos se obtuvo la siguiente curva:

$$\log k = - 1.59 + 0. 59 \log P_{ow} \quad (r=0.995, n=6)$$

Para NB y BNB se obtuvieron valores de log k, de -0.285 y 0.224 respectivamente, al reemplazar estos valores en la ecuación de la recta se interpolaron los valores de log P_{ow} y se obtuvo para NB un valor de log P_{ow} igual a 2.2 y para BNB un valor igual a 3.1. Estos valores dan cuenta del alto carácter apolar de los compuestos en estudio, lo cual los hace buenos candidatos para un paso a través de membranas biológicas por difusión pasiva.

3.4.3 Determinación de la constante de permeabilidad efectiva [P_e]

Esta determinación se realizó mediante el ensayo de *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (PAMPA), para lo cual se ensayaron tres concentraciones para NB (5.0×10^{-6} M, 7.0×10^{-6} M, 1.0×10^{-5} M) y otras tres para BNB (5.0×10^{-5} M, 7.0×10^{-5} M, 1.0×10^{-4} M), las cuales fueron medidas por HPLC y UV-Vis dando como resultado para NB un valor de 0.8×10^{-5} cm/seg y 1.2×10^{-5} cm/seg respectivamente, lo cual nos indicaría que este compuesto presentaría un transporte pasivo a través de la barrera hematoencefálica, en cambio para BNB la P_e no pudo ser calculada debido a que este compuesto queda retenido en la membrana, esto lo podemos explicar mediante el valor de $\log P_{ow}$ obtenido, el cual nos reporta un alto valor y nos indicaría su mayor afinidad por las fases apolares, en este caso su mayor afinidad por la membrana a base de L- α -fosfatidilcolina.

3. 5 Modelado molecular

Para obtener más información de las conformaciones de mínima energía que podrían presentar los compuestos en estudio, se llevaron a cabo estudios computacionales.

Para encontrar los mínimos globales (conformaciones de mínima energía), correspondientes a NB y BNB se realizó un cálculo de templado simulado iterativo (TSI). Esta técnica es un método para resolver el problema de optimización de las funciones donde la mejor solución se tiene que encontrar entre un gran número de posibilidades, su aplicación en la búsqueda del espacio conformacional consiste en iniciar la simulación llevando la estructura a una temperatura elevada e ir disminuyendo en periodos intermedios hasta llegar a una temperatura lo suficientemente baja como para que el sistema este en un mínimo, encontrándose los respectivos mínimos globales (Figura 32).

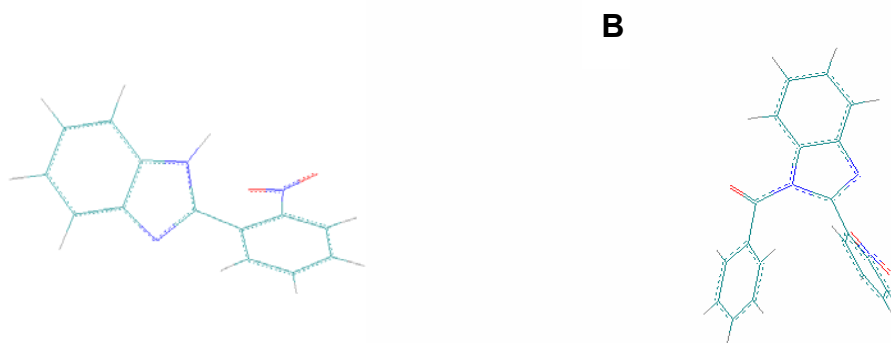


Figura 32. (A) Conformación de mínima energía para NB **(B)** Conformación de mínima energía para BNB

Para el compuesto NB en las estructuras resultantes de la dinámica molecular se determinó si existe formación de puente de hidrógeno intramolecular entre los átomos H (NH) y oxígenos del grupo nitro, para lo cual se representó la distancia entre el grupo nitro (-NO₂) y el grupo NH en posición 1 versus tiempo. Si la distancia entre ambos grupos es inferior a 4 Å indicaría una significativa interacción entre ambos ⁶² y si es inferior a 3 Å implicaría la formación de un puente de hidrogeno intramolecular. Al evaluar los resultados de el histograma (Figura 33), podemos apreciar que la mayor frecuencia de distancia en el tiempo fluctúa entre 3 Å y 4.5 Å. Además en el espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ (Figura 34), aparece una señal a δ 9.7 correspondiente al hidrógeno -NH, el cual si estuviera formando un puente de hidrogena intramolecular habría un corrimiento en el espectro de esta señal por un efecto de apantallamiento. Estos resultados, con lo relatado anteriormente indicarían una significativa interacción entre los grupos -NO₂ y NH y no la formación de un puente de hidrogeno. Además con estos resultados podemos explicar la obtención del segundo pK_a de 11.37±0.03 para NB de un ácido débil, el cual no podría haber sido determinado si estuviera involucrado en la formación de un puente de hidrogeno intramolecular con el grupo -NO₂

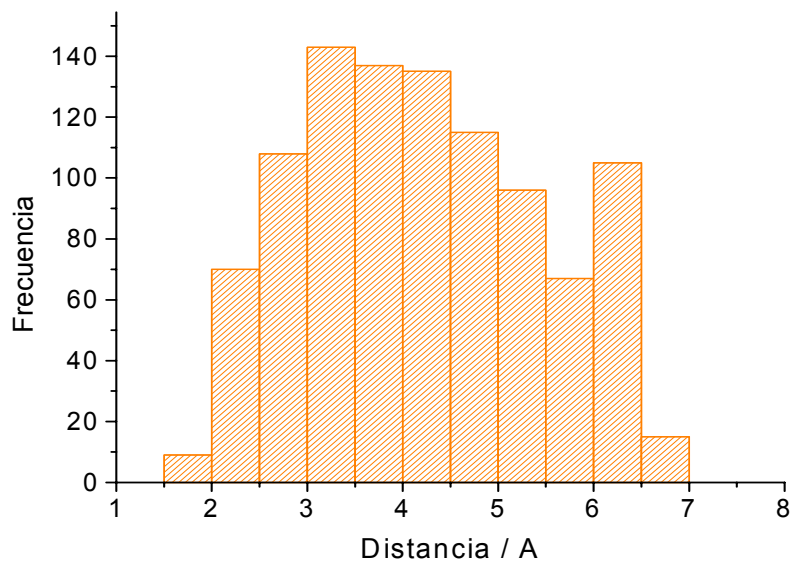


Figura 33. Histograma frecuencia distancia grupo nitro (-NO₂) y el grupo NH en posición 1 en NB

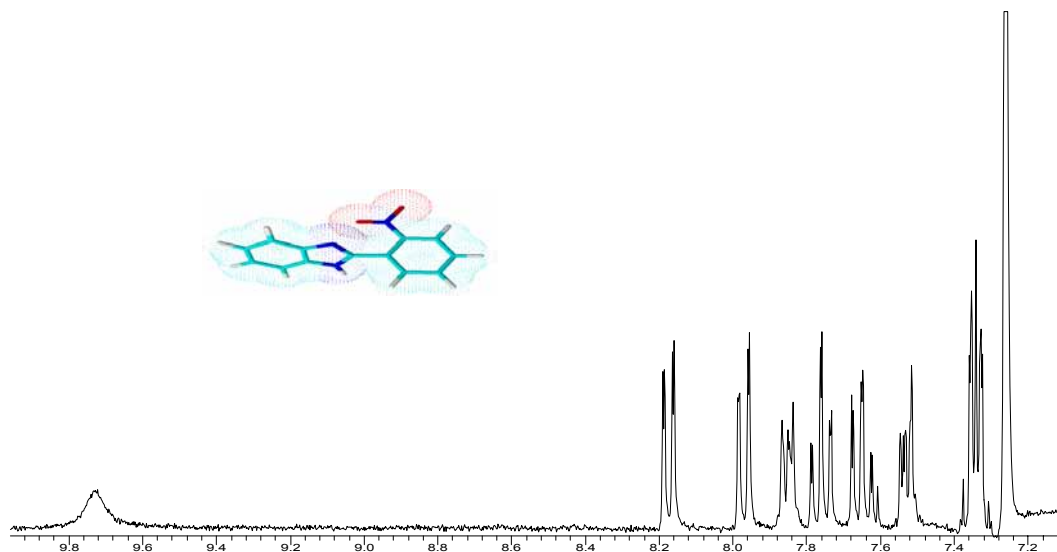


Figura 34. Espectro ¹H-RMN en CDCl₃ de NB

Además, al analizar el ángulo entre los planos correspondientes al grupo benzimidazol (definido por los átomos los dos nitrógenos y un átomo de carbono del fenilo) y nitrofenilo (definido por los átomos N y dos carbonos del fenilo) (Figuras 35 y 36), podemos apreciar que la distribución de los ángulos dihedros (τ) es dispar, por lo

cual se puede decir que existe una libre rotación entre este sustituyente y el anillo. En consecuencia no existe una planariedad entre estos dos anillos.

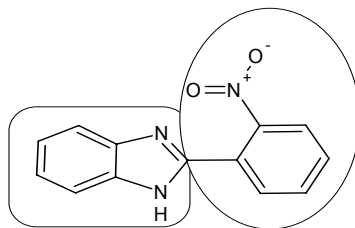


Figura 35. Planos analizados para definir ángulos dihedros para (τ) NB

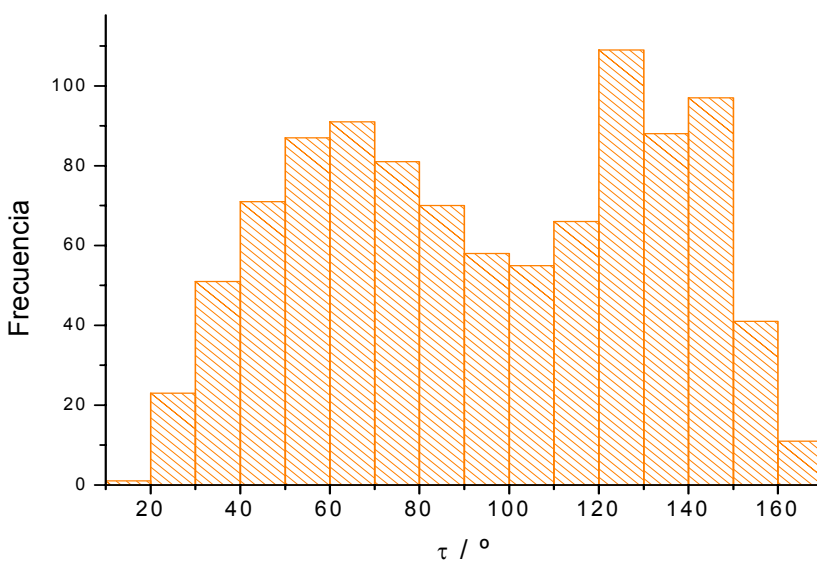


Figura 36. Histograma de frecuencia τ para NB

Para evaluar si los sustituyentes del anillo imidazólico se encuentran en el mismo plano respecto del núcleo benzimidazol de BNB, se determinaron los ángulos existentes entre los planos correspondiente al *o*-nitrofenil (definido por el nitrógeno y los dos carbonos) y el anillo benzimidazólico y los ángulos formados entre los planos del anillo benzimidazólico con el plano correspondiente al benzoílo (dado por los átomos carbono del carbonilo y dos átomos del anillo) (Figura 37). Dando ángulos entre 50° a 60° (Figura 38), lo cual demostraría que no existe planariedad de los sustituyentes con el anillo base benzimidazol y además se presenta un pseudo paralelismo entre los anillos sustituyentes (Figura 32B), lo cual es de gran importancia

para explicar la disminución en el potencial de reducción para BNB con respecto a NB, debido que en la cercanía del grupo nitro (-NO₂) hay una alta densidad electrónica aportado por el sustituyente en posición 1 (N- benzoílo), lo cual impediría una rápida reducción frente al electrodo de mercurio y una disminución del potencial de reducción, comparado con NB el cual no tiene este sustituyente.

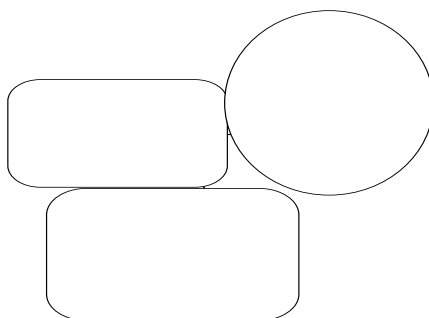


Figura 37. Planos analizados para definir ángulos dihedros para (τ) BNB

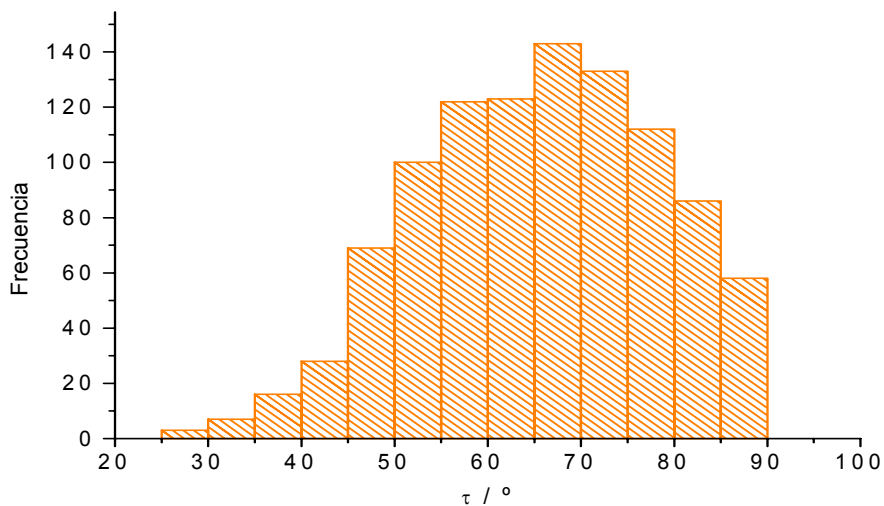


Figura 38. Histograma de frecuencia τ para BNB

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- NB y BNB en mezcla hidroalcohólica fueron electroactivos, presentando respuesta catódica con dos picos u ondas bien definidas en los rangos estudiados para cada compuesto, empleando PPD o PTAST, respectivamente. Además las señales de reducción fueron dependientes del pH, desplazándose hacia potenciales negativos con el pH.
- Por PTAST se pudo observar una independencia de la I_{lim} con la acidez y que la velocidad de transferencia de electrones y el mecanismo involucrado entre ambos compuestos son relativamente iguales.
- Los resultados por VC mostraron que en medio acuoso las señales de reducción de NB son irreversibles y tienen un carácter difusivo en las velocidades de barrido estudiadas (0.1V/s a 10 V/s).
- Por UV-Vis NB presentó tres máximos de absorción dependientes del pH (226 nm, 270 nm, 280 nm), los cuales fueron utilizados para determinar sus constantes de acidez, obteniéndose: $pK_{a1}=5.69$ (-N=C-) y $pK_{a2}=11.38$ (-NH). BNB presentó dos máximos de absorción, de los cuales sólo uno fue dependiente del pH ($\lambda = 223$), a partir del cual se obtuvo un pK_a de 4.9 (-N=C-).
- Se desarrollaron metodologías analíticas por PPD, espectrofotometría UV-Vis y HPLC, obteniéndose resultados con buena resolución y selectividad. Las tres técnicas presentaron valores adecuados de reproducibilidad (CV < 4.5%) y repetibilidad (CV < 4%), presentando linealidad en un amplio rango de concentración, desde 1.0×10^{-6} M hasta 1.0×10^{-4} M, para ambos compuestos.
- En el estudio cinético realizado para BNB, se obtuvo una degradación hidrolítica de pseudo orden uno. El pH de máxima estabilidad para BNB fue 5.0 y su vida media de 39 h. Además, la velocidad de degradación de BNB aumentó en forma

significativa con la variación de pH, lo que se manifestó tanto en los valores de las constantes cinéticas, como en las vidas medias.

- La velocidad de degradación hidrolítica de BNB aumentó en forma significativa con el aumento de la temperatura. A partir de estos resultados se calculó la energía de activación del sistema, obteniendo una $E_a=14.90$ Kcal/mol a pH 7.4, valor característico de procesos hidrolíticos.
- El estudio de excipientes farmacéuticos por PPD con vistas a futuras formas farmacéuticas, se puede decir que afectan la señal de reducción frente al electrodo de mercurio, disminuyendo la respuesta en forma significativa, los interferentes involucrados son hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, PEG 400 y PEG 4000, para ambos compuestos en estudio. En el caso de HPLC el método resultó selectivo para NB y BNB frente a sus precursores de síntesis y productos de degradación.
- El método empleado en la determinación de $\log P_{ow}$ resultó satisfactorio y rápido. Además, de los resultados obtenidos, se puede decir que se estos presentan un alto valor, debido a la elevado carácter apolar que presentan el anillo base y los sustituyentes correspondientes.
- Del estudio de P_e se concluye que NB presenta una buena permeabilidad de membrana y además es un buen candidato de transporte pasivo. En el caso de BNB no se pudo calcular, debido a que este compuesto queda retenido en la membrana.
- De los resultados de modelado molecular se puede concluir que para NB no se forma un puente de hidrógeno intramolecular y además con este resultado se pudo explicar el valor de pK_{a2} obtenido para NB. También se concluyó que los anillos benzimidazólico y nitroaromático de NB no son coplanares entre si, y que existe una libre rotación entre ellos. Para el caso de BNB, el estudio sirvió para explicar su

menor valor de potencial de reducción respecto a NB, debido al pseudo paralelismo entre los anillos sustituyentes presentes en BNB.

- Con los resultados obtenidos en esta Memoria, se espera contribuir al conocimiento tanto químico como analítico de estos compuestos, que actualmente se están evaluando las posibles actividades farmacológicas que podrían presentar. Se han encontrado resultados promisorios para ellos sobre *Trypanosoma cruzi*, con cierta actividad tryponomicida.

5. REFERENCIAS

- [1] J. Fernández-Carneado, M.J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1847.
- [2] P. Schmiedlin-Ren, K.E. Thummel, J.M. Fisher, M.F. Paine, K.S. Lown, P.B. Watkins, *Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 741.
- [3] C.P. Hsu, G.W. Caldwell, J.A. Masucci, Z. Yan, D.M. Ritchie, *Front. Drug Des. Discov.* **2005**, 1, 197.
- [4] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1007.
- [5] E. Lacey, *Int. J. Parasitol.* **1988**, 18, 885.
- [6] C. Kus, H. Goker, G. Ayhan, R. Ertyan, N. Altanlar, A. Akin, *Farmaco* **1996**, 51, 413.
- [7] H. Göker, M. Tunçbilek, S. Suzen, C. Kus, N. Altanlar, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 148.
- [8] K.-L. Yu, Y. Zhang, R.L. Civiello, A.K. Trehan, B.C. Pearce, Z. Yin, K.D. Combrink, H.B. Gulgeze, Xi.A. Wang, K.F. Kadow, C.W. Cianci, M. Krystal, N.A. Meanwell, *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1133.
- [9] W. Nawrocka, B. Sztuba, M.W. Kowalska, H. Liszkiewicz, J. Wietrzyk, A. Nasulewicz, M. Pełczyńska, A. Opolski, *Farmaco* **2004**, 59, 83.
- [10] M. Tatsuta, M. Kataoka, K. Yasoshima, S. Sakakibara, Y. Shogase, M. Shimazaki, T. Yura, Y. Li, N. Yamamoto, J. Gupta, K. Urbahns, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2265.
- [11] H. Nivinskas, R. L. Koder, Ž. Anusevičius, J. Šarlauskas, A. Miller, N. Čėnas, *Arch. Biochem. Biophysics.* **2001**, 385, 170.
- [12] J. C. Spain, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 523.
- [13] H. Schmitt, R. Altenburger, B. Jastor, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 441.
- [14] X. Yan, H. Xiao, X. Gong, X. Ju, *Chemosphere* **2005**, 59, 467.
- [15] J.L. Holtzman, D.L. Crankshaw, F.J. Peterson, C. F. Polnaszek, *Mol. Pharmacol.* **1981**, 20, 669.
- [16] V. M. Orna, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12379.
- [17] N. Čėnas, Ž. Anusevičius, D. Bironaitė, G.I. Bachmanova, A.I. Archakov, K. Ollinger, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 315, 400.

- [18] F.J. Peterson, R.P. Mason, J. Hovsepien, J.L. Holtzman, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 4009.
- [19] C. Viodé, N. Bettache, N. Cenas, L. Krauth-Siegel, G. Chauvière, N. Bakalara, J. Périé, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 549.
- [20] R. J. Riley, P. Workman, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 1657.
- [21] R. J. Knox, F. Friedlos, M.P. Bolland, *Cancer Metastasis Rev.* **1993**, 12, 195.
- [22] C. Bryant, M. DeLuca, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4119.
- [23] I.A. Valderrama, H. Pessoa-Mahana, G. Sarrás, R.Tapia, *Heterocycles* **1999**, 51, 2193.
- [24] H. Pessoa-Mahana, C.D. Pessoa-Mahana, R. Salazar, J.A. Valderrama, E. Saez, R. Araya-Maturana, *Synthesis* **2004**, 3, 436.
- [25] K.C. Waterman, R.C. Adami, *Int. J. Pharm.* **2005**, 293, 101.
- [26] B.D. Glass, C. Novak, M.E. Brown, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, 77, 1013.
- [27] M. Bakshi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28, 1011.
- [28] L. Xing, R.C. Glen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42, 796.
- [29] C. Hansch, H. Gao, D. Hoekman, In *Comparative QSAR*; Devillers, J., Ed.; Taylor and Francis: Washington, DC, **1998**, 285.
- [30] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**.
- [31] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525.
- [32] C. Hansch, D. Hoekman, A. Leo, L.T. Zhang, P. Li, *Toxicol. Lett.* **1995**, 79, 45.
- [33] T. Braumann, *J. Chromatogr.* **1986**, 373, 191.
- [34] K. Mjesnik-Dejanovic, S.E. Cabaniss, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 1108.
- [35] W. Klein, W. Kordel, M. Weis, M.J. Poremski, *Chemosphere* **1988**, 261, 361.
- [36] M. Roses, I. Canals, H. Alleman, K. Siigur, E. Bosch, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4094.
- [37] F. Wohnsland, B. Faller, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 923.
- [38] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1007.
- [39] M.B. Brennan, *Chem. & Eng. News* **2000**, 78, 63.
- [40] M. Manderscheid, T. Eichinger, *J. Chromatogr. Sci.* **2003**, 41, 1.
- [41] C. Coty, *Drug Discovery Dev.* **2003**, 6, 55.

- [42] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson, K.Y. Tam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 20, 631.
- [43] J.L. Ganuza, M^a Pilar Casas, M^a Pilar Queipo. Química, Mc Graw Hill **1998**, 163-183.
- [44] M. Castro, S. Gascon, M. Pujol, J. Soms, L. Vicente, Validación de métodos analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, **1989**, 67-93
- [45] O.A. Quattrocchi, S.A. de Andrizzi, R.F. Laba. Introducción a HPLC aplicación y práctica **1992**, 321-328.
- [46] K. Connors. Curso de análisis farmacéutico. Ed Reverté. **1980**.
- [47] L. Di, E.H. Kerns, K.F. Oliver, J. McConnell, G.T. Carter, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223.
- [48] M. Teixido Tura, Memoria para optar a grado de Doctor en Química, Universidad de Barcelona **2005**, 211-260.
- [49] W. Klein, W. Kordel, M. Weis, M.J. Poremski, *Chemosphere* **1988**, 261, 361.
- [50] M. Roses, I. Canals, H. Alleman, K. Siigur, E. Bosch, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4094.
- [51] K. Akimoto, H. Kurosaka, I. Nakagawa and K. Sugimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1483.
- [52] USP 27-NF 22. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville M.D. USA. **2004**
- [53] J.-P. Doucet, J. Weber, Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications, Academic Press Limited: London, **1996**
- [54] E. Hammam, A. Tawfik, M.M. Ghoneim, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 36 149.
- [55] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman "Principios de análisis instrumental". 5^a Edición. McGraw Hill. **2000**
- [56] G.E. Adams, I.J. Stratford, *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 71
- [57] A.J. Bard, L.R. Faulker, Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. John Willey & Sons. New York. **1990**
- [58] T.N. Brown, N. Mora-Diez, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 9270.
- [59] K. K. Donkor, B. Kratochvil. *J. Chem. Eng. Data* **1993**, 38, 569.

- [60] K. Connors, G. Amidon, V. Stella. *Chemical stability of Pharmaceuticals a Handbook for Pharmacist*. Ed. A Wiley-Interscience Publication. **1986**.
- [61] European commission, European Chemicals Bureau, documentation ANNEXV A.8. Partition Coefficient, disponible en <http://ecb.jrc.it/>
- [62] Y.Takeuchi, G.R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5363.