



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOELECTROQUÍMICA

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO Y ESPECTROSCÓPICO
DE LA INTERACCIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS
DERIVADOS 2-(*O*-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL CON
ADN**

PATROCINANTE

Dra. Soledad Bollo Dragnic

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTORES DE MEMORIA

Dra. Soledad Bollo Dragnic

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Dr. Alejandro Alvarez Lueje

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

MABEL ELIZABETH CATALÁN DÍAZ

Santiago de Chile

2007

***Dedico esta memoria
a toda mi familia y amigos***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi Dios por su amor y misericordia en todo momento.

Agradezco a mis padres por todo lo que me han dado su apoyo, amor y confianza. A mis hermanos, que son mi vida. A mis Litos, que en todo momento me han apoyado y amado. A mis tíos y primos, por siempre confiar en mí. Los amo con todo mi corazón.

Agradezco a cada uno de mis amigos que siempre han estado ahí, en las penas y alegrías. En especial, agradezco a Tomás por su amor y amistad, y a Alejandra, que siempre ha creído en mí. Los amo a todos.

Agradezco además a mis directores de memoria, el Dr. Alejandro Álvarez y la Dra. Soledad Bollo, por su constante dedicación, apoyo y enseñanza.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Bioelectroquímica por crear un ambiente agradable de trabajo, además de su gran ayuda.

Finalmente, agradezco al proyecto FONDECYT N° 1050797 por haber financiado esta memoria.

RESUMEN

En esta Memoria se informa el estudio de la interacción en solución de nuevas moléculas benzimidazólicas, 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB) con ADN. Para esto, se trabajó con moléculas de ADN de simple hebra (ssADN) y doble hebra (dsADN). Mediante voltamperometría de pulso diferencial sobre un electrodo de carbono vítreo se obtuvo una señal analítica para NB y BNB correspondiente a la reducción del grupo nitro presente en cada una de las estructuras estudiadas. Ambos compuestos presentaron una disminución en la intensidad de corriente en presencia de ambos tipos de ADN. Se determinó que cada molécula de ADN, ssADN o dsADN, une un mayor número de moléculas de NB que de BNB y que la constante de equilibrio del complejo formado también es mayor para el caso de NB.

Al estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre el mecanismo de interacción se pudo determinar que los compuestos interaccionan en forma electrostática con ambos tipos de ADN y que no existe una reactividad preferencial por alguna de las estructura nucleicas estudiadas.

Mediante espectroscopía UV-Vis, se observó que los espectros de absorción de ambos compuestos presentan variaciones tanto en la intensidad como en el máximo de absorción en presencia de diferentes concentraciones (50 – 250 ppm) de ADN, confirmando la interacción entre las moléculas.

Por otro lado, se estudió la interacción de los nitrocompuestos con ADN mediante biosensores electroquímicos. Para ello, se modificaron electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono dispersos en una solución de quitosano, sobre los cuales se adsorbió finalmente dsADN (CV/CNT/ADN). La señal analítica de seguimiento fue la señal electroquímica de reducción de cada nitrocompuesto adsorbido sobre el biosensor, determinándose un tiempo óptimo de acumulación de 10 minutos. Bajo estas condiciones la respuesta del biosensor fue lineal con la concentración de nitrocompuesto en un rango de 20 a 80 μ M. Finalmente al generar el biosensor con diferentes concentraciones de dsADN (20-100 ppm), se observó una rápida saturación de la superficie del electrodo para ambos compuestos.

En conclusión, estas moléculas son capaces de interactuar con el ADN, lo que abre la posibilidad de causar daño a estas estructuras como mecanismo de acción farmacológico.

**ELECTROCHEMICAL AND SPECTROSCOPY STUDY OF NEW
COMPOUNDS DERIVED FROM 2-(O-NITROPHENYL)-BENZIMIDAZOLE WITH
ADN.**

SUMMARY

In this thesis the interaction between new benzimidazolic molecules, 2-(o-nitrophenyl)-benzimidazol (NB) and N-benzoil-2-(o-nitrophenyl)-benzimidazol (BNB), with DNA was evaluated. Two different DNA structures, single stranded DNA (ssDNA) and double stranded DNA (dsDNA) were utilized. Using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode as working electrode, both molecules were electrochemically reduced due to the presence of a nitro group in their structures. In presence of DNA the electrochemical signal of NB and BNB diminished. DNA-nitro complexes were characterized being determined that both DNA bound more NB molecules per DNA molecule than BNB molecules. DNA-NB equilibrium constants were higher than DNA-BNB equilibrium constants.

Changing the ionic strength of the medium we were able to conclude that the interaction mechanism was electrostatic and no differential interaction DNA structure between each nitro compounds.

Using UV-Vis spectroscopy, changes in both the absorption maximum and the intensity for each nitro compound were observed when the DNA concentration increased between 50 and 250 ppm.

On the other hand, the interaction between the nitro compounds and dsDNA was evaluated using electrochemical biosensors. Thus, a glassy carbon electrode was modified using carbon nanotubes dispersed in chitosan prior the DNA adsorption. The electrochemical reduction of nitrocompound adsorbed on the biosensors was used as analytical signal. Using 10 minutes as accumulation time a lineal dependence between the nitro compound concentration and the biosensor response was determined between 20 and 80 μM . Finally, using different dsDNA concentrations (20 – 100 ppm) a fast saturation in the biosensor response was found.

In conclusion, NB and BNB are able to interact with DNA which generates the possibility at provoke DNA damage as pharmacologic mechanism of action.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos Específicos	
A) Evaluación mediante técnicas electroquímicas de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN en solución.....	5
B) Evaluación mediante técnicas espectroscópicas de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN en solución.....	5
C) Evaluación mediante biosensores electroquímicos de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN.....	5
3. Materiales y métodos	
3.1. Materiales y equipos	
3.1.1. Compuestos estudiados.....	6
3.1.2. Reactivos.....	6
3.1.3. Tampones.....	7
3.1.4. Material de vidrio.....	7
3.1.5. Equipos	
A) Equipos de uso general.....	7
B) Sistema voltamperométrico y computacional.....	7
C) Sistema espectroscópico UV-Visible.....	8
3.2. Métodos	
3.2.1. Preparación de las soluciones de trabajo	
A) Solución tampón TRIS 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0.....	8
B) Solución tampón acetato 0.2 M pH 4.9, pH 5.0, pH 5.7.....	8
C) Disolución tampón fosfato 0.1 M pH 7.4.....	9
D) Disolución tampón formiato 0.2 M pH 5.0.....	9
E) Disoluciones de ADN.....	9
F) Solución de compuesto NB.....	9
G) Solución de compuesto BNB.....	9
3.2.2. Estudios electroquímicos	
3.2.2.1. Voltamperometría de pulso diferencial.....	10
3.2.2.2. Preparación del electrodo de carbono vítreo.....	10

3.2.2.3.	Preparación de solución del compuesto NB con cantidad constante de ADN.....	10
3.2.2.4.	Preparación de solución del compuesto BNB con cantidad constante de ADN.....	10
3.2.2.5.	Preparación de solución del compuesto BNB con cantidad constante de ADN y en presencia de NaCl.....	11
3.2.2.6.	Preparación de solución de los compuestos con diferentes cantidades de ADN.....	11
3.2.2.7.	Preparación de soluciones de los compuestos para obtener curvas de concentración en presencia de ADN.....	11
3.2.2.8.	Determinación de la estequiometría de la interacción de los nitrocompuestos con ADN.....	12
3.2.3.	Estudios electroquímicos con biosensores	
3.2.3.1.	Voltamperometría de pulso diferencial.....	13
3.2.3.2.	Preparación del electrodo de trabajo.....	13
3.2.3.3.	Preparación de la solución de quitosano.....	14
3.2.3.4.	Preparación de la dispersión modificante de nanotubos de carbono en quitosano.....	14
3.2.3.5.	Obtención del biosensor electroquímico de ADN.....	14
3.2.3.6.	Estudio del efecto del pH sobre la adsorción de NB.....	15
3.2.3.7.	Estudio del efecto del tiempo de acumulación de NB.....	15
3.2.3.8.	Estudio del efecto de la concentración de ADN.....	16
3.2.3.9.	Estudio con diferentes concentraciones de los nitrocompuestos.....	16
3.2.4.	Estudios espectroscópicos	
3.2.4.1.	Interacción de los nitrocompuestos con ADN.....	16
4.	Resultados y discusión	
4.1.	Estudios electroquímicos	
4.1.1.	Efecto de ADN sobre la respuesta electroquímica de los nitrocompuestos.....	17
4.1.2.	Evaluación del tiempo óptimo de interacción entre BNB y ADN	18
4.1.3.	Evaluación de la fuerza iónica sobre la interacción BNB con ADN.....	19

4.1.4. Efecto de la concentración de ADN sobre la respuesta electroquímica de los compuestos a pH 7.4.....	20
4.1.5. Determinación de la estequiometría de la interacción de los compuestos.....	24
4.1.6. Efecto del pH sobre la interacción de NB y BNB con ADN.....	28
4.2. Estudios espectroscópicos	
4.2.1. Evaluación de la interacción mediante espectroscopia UV-Vis.	32
4.3. Estudio de la interacción de nitrocompuestos con ADN mediante biosensores electroquímicos de ADN	
4.3.1. Estudio de las condiciones óptimas de trabajo.	36
4.3.2. Estudio del tiempo de acumulación de NB	37
4.3.3. Efecto de la concentración de los compuestos NB y BNB en la respuesta electroquímica.....	38
4.3.4. Efecto de la concentración de ADN en la señal electroquímica de los nitrocompuestos.....	39
2. Conclusiones y Perspectivas.....	42
3. Referencias.....	43

1. Introducción

La interacción entre fármacos y ADN juega un importante rol en procesos biológicos, tales como la transcripción y la replicación del ADN. Es así que un número considerable de ligandos naturales y sintéticos han sido descubiertos, los cuales han presentado la propiedad de unirse al ADN [1,2].

Existen diferentes mecanismos por los cuales distintos ligandos se unen e interactúan con el ADN. Estos incluyen:

- Interacción electrostática (generalmente inespecífica), donde los ligandos se unen a la carga negativa de la estructura fosfatada del azúcar del ácido nucleico.
- Intercalación de sistemas de anillos aromáticos planares entre las pares de bases que constituyen el ADN. En este grupo encontramos fármacos antineoplásicos como daunomicina y actinomicina D.
- Interacción de ligandos con los surcos menores y mayores del ADN. La unión en el surco menor permite contactos íntimos con las paredes de éste, lo que da como resultado numerosos puentes de hidrógeno, produciendo interacciones electrostáticas de los fármacos con el ADN (bases y cadenas fosfatadas). Con respecto a uniones en el surco mayor del ADN, estas ocurren vía puentes de hidrógeno y pueden formar una triple hélice de ADN tal como el norfloxacino [3,4].
- Interacción mediante unión covalente con ligandos fundamentalmente compuestos alquilantes que atacan a bases nitrogenadas, especialmente púricas, formando un enlace de carácter irreversible [5]

Considerando que el ácido desoxirribonucleico posee un rol fundamental en el desarrollo de la vida [1], los estudios biológicos del descubrimiento de fármacos y desarrollo de productos farmacéuticos se al conocimiento de nuevas moléculas que

posean la capacidad de interactuar con él. En este proceso la dilucidación del mecanismo por el cual actúan es de vital importancia.

En este sentido, se han estado investigando una serie de compuestos benzimidazólicos, los cuales son moléculas que presentan la capacidad de interactuar con el ADN. Son de elección en el tratamiento de algunas parasitosis [6,7], patología característica de áreas tropicales con una fuerte incidencia en los perfiles de morbilidad y mortalidad; así como también, han presentado efectividad como antibacterianos [8,9], antifúngicos [10], antivirales [11,12] y antineoplásicos [13,14], entre otros.

Además, se han estudiado compuestos nitroaromáticos, los que han sido extensamente usados como productos farmacéuticos, pesticidas y explosivos [15-18]. Estas moléculas, en el proceso de manifestar sus propiedades terapéuticas y/o citotóxicas, experimentan procesos de mono y bi reducción en el organismo [19,20]. Su reactividad para ser reducidos enzimáticamente está relacionada con el potencial de reducción, y no depende necesariamente de su estructura [19]. En este sentido, serán de interés aquellos compuestos que sean capaces de inducir el estrés oxidativo o inhibir enzimas específicas de detoxificación, como por ejemplo, las moléculas utilizadas en parásitos como el *Trypanosoma Cruzi* [21].

En general, los nitrocompuestos han demostrado ser eficientes para interferir el metabolismo de oxígeno, por medio de sus correspondientes aniones radicales [21].

En relación a este último punto, los compuestos seleccionados para la presente Memoria han sido sintetizados previamente por el Dr. Pessoa-Mahana, cuyo trabajo demostró por resonancia de spin electrónico la generación de radicales libres, lo cual sustentaría a priori la potencial actividad biológica presente en estas estructuras [22]. Específicamente los compuestos son derivados sintéticos benzimidazólicos con un grupo *o*-nitrofenilo en posición 2 y con sustituciones en el nitrógeno en posición 1, como lo muestra la figura 1. Las nomenclaturas de las estructuras son 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB) y N-benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (BNB).

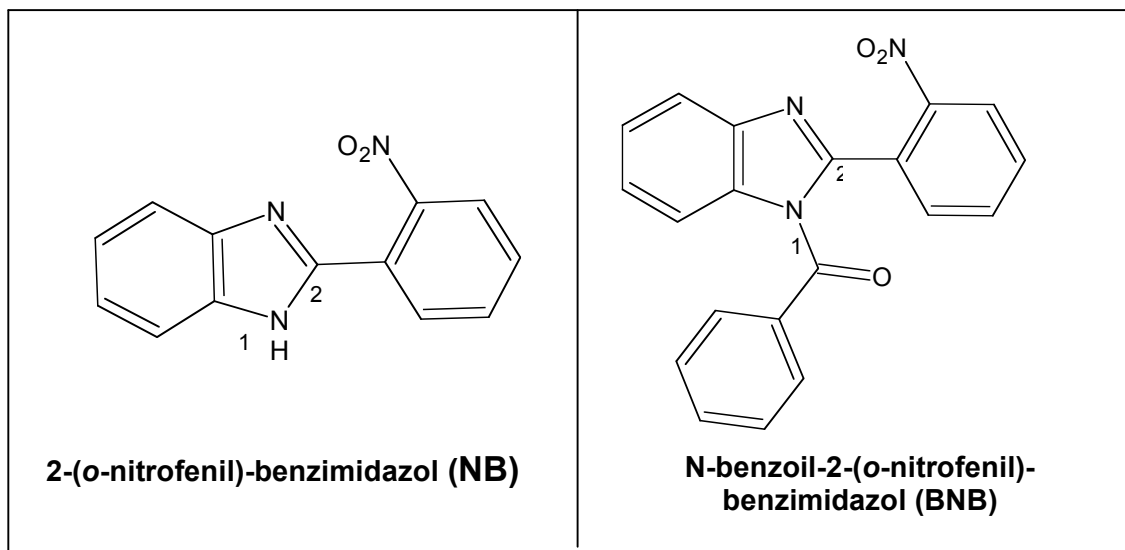


Figura 1. Estructuras benzimidazólicas estudiadas en esta Memoria

Las moléculas fueron estudiadas previamente, en relación a la determinación de los valores de pK_a y desarrollo de metodologías analíticas aplicadas a su cuantificación y caracterización [23].

Existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para el estudio de la interacción entre una molécula y el ADN [24], adquiriendo relevancia los estudios electroquímicos, los cuales han atraído considerablemente la atención ya que han permitido dilucidar mecanismos de interacción de fármacos con ADN [3,25,26], debido a su alta sensibilidad y selectividad, además de ser simples y de bajo costo.

El estudio de la interacción de diversas estructuras con ADN también ha sido exitosamente realizado mediante la utilización de biosensores electroquímicos, revelando la gran utilidad de éstos en la determinación del daño sobre el ADN. El uso de electrodos modificados ha aumentado la sensibilidad y selectividad de la técnica frente a diferentes moléculas [27,28].

Por otro parte, el uso de biosensores electroquímicos ha demostrado ser una técnica innovadora en el estudio de la capacidad antioxidante, reemplazando técnicas tradicionales como la espectrofotometría, fluorescencia, etc. [29]

En base a todos los antecedentes expuestos, es que en esta Memoria se propone estudiar la interacción de derivados del 2-(o-nitrofenil)-benzimidazol con el ADN, utilizando metodologías espectroscópicas y electroquímicas, a fin de sustentar la potencial actividad biológica de estos compuestos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

El objetivo general de esta Memoria es incrementar el conocimiento químico-biológico respecto de una nueva serie de compuestos con potencial actividad biológica, a través de estudiar la capacidad y los mecanismos de interacción de derivados del 2-(o-nitrofenil)-benzimidazol con ADN de una y doble hebra.

3.2. Objetivos Específicos

A) Evaluación mediante técnicas electroquímicas de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN en solución.

Mediante voltamperometría de pulso diferencial utilizando un electrodo de carbono vítreo se seguirá la señal analítica de reducción del grupo nitro de cada una de las moléculas, a fin de evaluar la existencia de reactividad diferenciada de acuerdo a la estructura del ADN.

B) Evaluación mediante técnicas espectroscópicas de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN en solución.

Mediante espectroscopia UV-Vis discriminar la existencia de reactividad diferenciada de acuerdo a la estructura del ADN, además de posibles cambios en la estructura de éste en su interacción con ambas moléculas.

C) Evaluación mediante biosensores electroquímicos de la interacción de los compuestos NB y BNB con ADN.

Mediante voltamperometría de pulso diferencial, utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono en quitosano, estudiar la capacidad de interacción de ambos compuestos.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos

3.1.1. Compuestos estudiados

- a) Fórmula global : $C_{13}H_9N_3O_2$
 Nomenclatura : 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (NB)
 Peso molecular : 230.06 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

3.1.2. Reactivos

Ácido acético glacial (99.8%), Merck
Ácido clorhídrico (32%), Merck
Ácido fórmico (100%), Merck
Ácido fosfórico (85%) p.a., Merck
ADN doble hebra (dsADN), Sigma Aldrich
ADN hebra simple (ssADN), Sigma Aldrich
Ácido etilendiaminotetraácetico (EDTA), Merck
Quitosano PM medio, Aldrich
Cloruro de sodio, Merck
Etanol, Merck
Hidróxido de sodio (pellets), Merck
Nanotubos de carbono multipared oxidados, Nanolab
Nitrógeno extra puro, AGA
Tris(hidroximetil)-aminometano p.a. (TRIS), Merck

3.1.3. Tampones

Acetato 0.2 M pH 4.9, pH 5.0, pH 5.7

Formiato 0.2 M pH 5.0

Fosfato 0.1 M pH 7.4

Tris 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0

3.1.4. Material de vidrio

El material de vidrio utilizado fue de Clase A

3.1.5. Equipos

A) Equipos de uso general

Agitador magnético HI 190 M, Hanna Instruments

Agitador magnético Lab Tech

Balanza de precisión, Precisa 40SM-200^a (sensibilidad 0.01 mg)

Baño de Ultrasonido, Branson 2210

Cubetas VWR semi-micro 10 mm paso óptico

Medidor de pH, WTW modelo pMx 3000

Micropipeta de 10-100 μ L, Brand

Micropipeta de 0-5-10 μ L, Hirschmann Laborgerate

Micropipeta de 1-10 mL, eppendorf Research

Micropipeta de 100-1000 mL, eppendorf Research

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

B) Sistema voltamperométrico y computacional

CH Instruments Electrochemical Workstation EQCM

Software CHI440a Versión 1.0.0.1, para control del instrumento

Electrodo de trabajo: electrodo de carbón vítreo y carbón vítreo modificado con dispersión de nanotubos en quitosano.

Electrodo de referencia: Ag/AgCl

Electrodo Auxiliar: alambre platino

Bioanalytical System (BAS), CV-50W

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

Electrodo de Trabajo: electrodo de carbón vítreo

Electrodo de Referencia: Ag/AgCl

Electrodo Auxiliar: alambre de platino

C) Sistema espectroscópico UV-Visible

Espectrofotómetro UV-Visible, UNICAM modelo UV-3

Software VISION 3.2 para control del instrumento

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de las soluciones de trabajo

A) Solución tampón TRIS 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0

Se pesó 121.1 mg del compuesto tris(hidroximetil)-aminometano y 18.6mg del compuesto EDTA. Luego se disolvieron con agua purificada (Milli-Q) completando un volumen final de 100 mL. El pH se ajustó con una solución de ácido clorhídrico concentrada.

B) Solución tampón acetato 0.2 M pH 4.9, pH 5.0, pH 5.7

Se tomó 11.44 mL de ácido acético glacial, los cuales se llevaron a un volumen de 1 L con agua purificada (Milli-Q). Se ajustó pH por medio de una solución concentrada de hidróxido de sodio.

C) Disolución tampón fosfato 0.1 M pH 7.4

Se tomó 6.74 mL de ácido fosfórico para llevarlos a un volumen final de 1 L de agua purificada (Milli-Q). El pH se ajustó con una solución concentrada de hidróxido de sodio.

D) Disolución tampón formiato 0.2 M pH 5.0

Se tomó 12.81 mL de ácido fórmico, los cuales fueron llevados a un volumen final de 1 L con agua purificada (Milli-Q). El pH fue ajustado con una solución concentrada de hidróxido de sodio.

E) Disoluciones de ADN

A 1 mg de ADN liofilizado se le adicionaron 500 μ L de tampón TRIS 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0. La concentración obtenida de esta disolución es de 2000 ppm. Posterior a la preparación, la disolución se alicuotó en tubos Eppendorff, los que se almacenaron a -20°C .

F) Solución de compuesto NB

La solución madre de trabajo contenía 1 mg de compuesto NB (PM 239.06 g/mol) disuelto en 1 mL de etanol. La solución se sonicó por 10 minutos y luego se tomaron alícuotas para constituir las diferentes soluciones con distintas concentraciones del compuesto según el experimento a realizar.

G) Solución de compuesto BNB

Se pesó 1 mg del compuesto (PM 343.33 g/mol) el cual se disolvió en 0.5 mL con etanol. Se sometió la solución resultante a sonicación por 10 minutos y luego se tomaron alícuotas correspondientes para hacer soluciones del compuesto con diferentes concentraciones, de acuerdo al experimento a realizar.

3.2.2. Estudios electroquímicos

3.2.2.1. Voltamperometría de pulso diferencial

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad	: 10-100 μ A/V
Rango potencial	: 0 a -1000 mV
Velocidad de barrido	: 20 mV/s
Amplitud de pulso	: 50 mV
Ancho de muestra	: 17 ms
Ancho de pulso	: 50 ms
Periodo de pulso	: 200 ms

3.2.2.2. Preparación del electrodo de carbono vítreo.

El electrodo de carbono vítreo se pulió antes de cada medición. Para ello se utilizó alúmina de diferente tamaño de partícula. El electrodo se lavó y luego se pulió con alúmina de 0.3 micrones, se lavó y se pulió con alúmina de 0.05 micrones, lavándose por última vez con agua Milli-Q

3.2.2.3. Preparación de solución del compuesto NB con cantidad constante de ADN

Se preparó una solución stock de 1 mg/mL de NB, del cual se tomó una alícuota de 25 μ L y se llevó a 10 mL con tampón fosfato o acetato, dependiendo del experimento. En una celda electroquímica se adicionó la cantidad de ADN correspondiente a 100 ppm y se completó 1 mL de volumen con la solución previamente preparada de compuesto.

3.2.2.4. Preparación de solución del compuesto BNB con cantidad constante de ADN

Se preparó un stock de 0.5 mg/mL del compuesto del cual se tomó una alícuota de 46 μ L y se llevó a 25 mL con tampón fosfato o acetato

dependiendo del experimento. En una celda electroquímica se adicionó la cantidad de ADN correspondiente a 100 ppm y se completó 1 mL de volumen con la solución previamente preparada de compuesto.

3.2.2.5. Preparación de solución del compuesto BNB con cantidad constante de ADN y en presencia de NaCl

De la solución stock preparada, se tomó la alícuota correspondiente del compuesto para llevarla a 25 mL de solución con tampón fosfato, obteniéndose una concentración final de 11 μ M. Se adicionó a esta solución NaCl en diferentes concentraciones (5 y 50 ppm). Luego se siguió el procedimiento como se describe en el punto 3.2.2.4.

3.2.2.6. Preparación de solución de los compuestos con diferentes cantidades de ADN

Se preparó 25 mL de solución 11 μ M del compuesto NB, previa adición de la alícuota de la solución stock preparado. En una celda electroquímica se adicionó un volumen constante del compuesto y además ADN a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 300 ppm), cuyos volúmenes fueron determinados por la diferencia entre la alícuota de mayor concentración y las de menor concentración, donde el volumen se completó con tampón Tris 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0 a 1 mL final de solución en la celda.

Para el compuesto BNB se procedió de la misma forma.

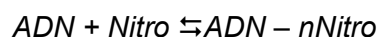
3.2.2.7. Preparación de soluciones de los compuestos para obtener curvas de concentración en presencia de ADN

Se preparó una solución stock de los compuestos NB y BNB. Se tomó alícuotas para la preparación de las diferentes soluciones de concentraciones crecientes (7.5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 75 μ M).

Posteriormente, se tomaron dos alícuotas de cada una de las soluciones preparadas y se depositaron en celdas electroquímicas. A una de las alícuotas se les adicionó una alícuota de la solución ADN a fin de obtener una concentración de 166 ppm [24]. A la otra mitad, se le agregó la misma cantidad de volumen, pero sólo conteniendo tampón Tris 20 mM EDTA 1 mM pH 8.0.

3.2.2.8. Determinación de la estequiometría de la interacción de los nitrocompuestos con ADN.

La interacción entre los nitrocompuestos y ADN, transcurre mediante la siguiente expresión [25,26]:



De donde se expresa la constante de equilibrio siendo:

$$\beta'_s = \frac{[ADN - nNitro]}{[ADN][Nitro]^n}$$

Luego, se obtiene la expresión (i) la cual permite determinar la estequiometría de la interacción entre ADN y cada uno de los nitrocompuestos.

Con la expresión (i) se obtuvo las rectas de los datos experimentales, y por consiguiente, las pendientes respectivas que indicaron la estequiometría de la interacción entre los nitrocompuestos y el ADN.

$$\log\left(\frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I}\right) = \log \beta'_s + n \log[\text{nitro}] \quad (\text{i})$$

Donde:

ΔI = diferencia de corriente de señal catódica del compuesto frente a ADN.

ΔI_{\max} = diferencia mayor de corriente de señal catódica del compuesto frente a ADN.

β'_s = constante de equilibrio.

n = pendiente, determina la estequiometría de la interacción entre el compuesto en estudio con ADN.

[nitro] = concentración del compuesto en estudio.

3.2.3. Estudios electroquímicos con biosensores

3.2.3.1. Voltamperometría de pulso diferencial

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad	: 2.5 – 10 μA
Rango de potencial	: 0 a -700 mV
Altura de pulso	: -50 mV
Retardo de pulso	: 50 ms
Incremento de potencial	: -4 mV

3.2.3.2. Preparación del electrodo de trabajo

Procedimiento del punto 3.2.2.2.

3.2.3.3. Preparación de la solución de quitosano

Se pesó 100 mg de quitosano. Se llevó la cantidad pesada a un volumen de 10 mL con una solución de ácido acético al 1%. Luego se sonicó la solución obtenida durante el tiempo necesario para poder disolver el quitosano [30].

3.2.3.4. Preparación de la dispersión de nanotubos de carbono en quitosano.

Se pesó 0.5 mg de nanotubos de carbono, a los cuales se les adicionó un volumen de 1 mL de solución de quitosano. Se sonicó por 45 minutos parando a intervalos de 5 minutos para disolver los agregados por compresión mecánica. La dispersión finalmente se torna homogénea de un color negro. Después de su utilización, se refrigeró.

Al reutilizar la dispersión, ésta se sometió a agitación en vórtex por 5 minutos para homogeneizar.

3.2.3.5. Obtención del biosensor electroquímico de ADN

Después de pulir el electrodo de carbón vítreo (sección 3.2.2.2), se depositó cada uno sobre un vaso con agua y se sonicó por 10 segundos para eliminar todos los restos de alúmina. Luego se secó la superficie de los electrodos al aire, se invirtió y se depositó sobre ella 10 μ L de dispersión de nanotubos en quitosano. Se sometió posteriormente a secado por 10 minutos en estufa a 50°C.

Después del tiempo de secado, se sacó el electrodo de la estufa y se sumergió durante 30 minutos en una solución de NaOH 0.1M, para hacer más estable el film formado sobre la superficie de cada electrodo.

Finalmente el electrodo se lavó con agua Milli-Q por 10 segundos para eliminar el exceso de hidróxido de sodio y se seca en estufa durante

un tiempo de 5 minutos [31], obteniéndose un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono, denominado CV/CNT

Para adsorber el ADN, el electrodo de CV/CNT se sumergió en una solución de ADN la cual se sometió a agitación durante 3 minutos. Luego el electrodo se lavó con agua Milli-Q por 10 segundos para eliminar el exceso de ADN.

3.2.3.6. Estudio del efecto del pH sobre la adsorción de NB.

Se preparó una solución 20 μM de NB, tomando 48 μL de la solución stock del compuesto y completando volumen de 10 mL. Para esto, se ocuparon dos tipos de tampones, formiato 0.2 M pH 5,0 y fosfato 0.1 M pH 7.4.

Para evaluar la adsorción de NB el electrodo CV/CNT/ADN se transfirió a la soluciones de NB la que se agitó durante 10 minutos.

Posteriormente el electrodo se lavó con agua Milli-Q por 10 segundos para eliminar el exceso de NB y se transfirió a una solución de tampón formiato 0.2 M pH 5.0 y/o fosfato 0.1 M pH 7.4, a la cual se le realizó un voltamperograma de pulso diferencial.

3.2.3.7. Estudio del efecto del tiempo de acumulación de NB.

Para estudiar el tiempo de acumulación de los compuestos sobre el electrodo CV/CNT/ADN, se utilizó una solución 20 μM de NB en tampón formiato, a la cual se transfirió el electrodo CV/CNT/ADN y se sometió a agitación por tiempos de 6, 10 y 15 minutos.

Posteriormente el electrodo se lavó con agua Milli-Q por 10 segundos para eliminar el exceso de NB y se transfirió a una solución de tampón formiato 0.2 M pH 5.0, a la cual se le realizó un voltamperograma de pulso diferencial.

3.2.3.8. Estudio del efecto de la concentración de ADN.

Se utilizó una solución 60 μM de cada uno de los compuestos (NB y BNB) en tampón formiato 0.2 M pH 5.0 y se evaluó el efecto de distintas concentraciones de dsADN 20, 30, 45, 60, 80 y 100 ppm sobre la adsorción y posterior reducción de los compuestos, previa transferencia a una solución de tampón.

3.2.3.9. Estudio con diferentes concentraciones de los nitrocompuestos.

Se prepararon soluciones en tampón formiato 0.2 M pH 5.0 de 20, 40, 60, 80 y 100 μM de cada uno de los compuestos y se evaluó la adsorción y posterior reducción de los compuestos previa transferencia a una solución de tampón.

3.2.4. Estudios espectroscópicos

3.2.4.1. Interacción de los nitrocompuestos con ADN

Se preparó una solución de cada uno de los compuestos de concentración 25 μM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. Se tomó de estas soluciones una alícuota de 1 mL que se depositó en una de las cubetas. En la otra cubeta se depositó solamente tampón fosfato. Se midió la absorbancia para ambos compuestos entre los 200 a 400 nm de longitud de onda.

Luego, a cada una de las cubetas se le adicionó 25 μL de una solución stock de 2000 ppm de ADN a fin de ir incrementando la concentración de ADN en 50 ppm cada vez, hasta un máximo de 250 ppm. Después de cada adición se registró un espectro de absorción.

4. Resultados y discusión

4.1. Estudios electroquímicos

4.1.1. Efecto de ADN sobre la respuesta electroquímica de los nitrocompuestos

Tanto NB como BNB se reducen en medio acuoso en tampón fosfato pH 7.4, presentando una señal correspondiente a la formación del derivado hidroxilamínico [23]. Al adicionar 100 ppm de dsADN se apreció una disminución de la respuesta electroquímica, de alrededor de 20% para NB y 30% para BNB, lo que nos indica que existe algún tipo de interacción entre ambas moléculas (figura 1).

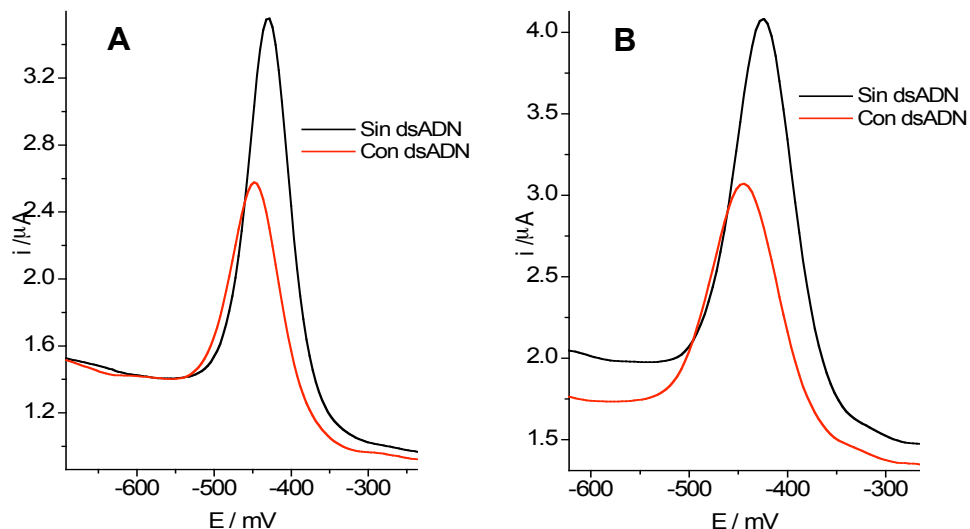


Figura 1. Voltamperogramas de pulso diferencial de una solución 11 μM de **(A)** NB y de **(B)** BNB, en tampón fosfato pH 7.4 en presencia de dsADN 100 ppm.

4.1.2. Evaluación del tiempo óptimo de interacción entre BNB y ADN

Con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de interacción entre BNB y el ADN, se preparó una solución con una concentración constante (11 μM) tanto del compuesto como de ADN (100 ppm), y se evaluó la señal electroquímica de BNB a distintos tiempos de interacción. Los tiempos evaluados fueron 0, 10, 15, 30 y 45 minutos de agitación. En la figura 2 se muestra la evolución en el tiempo de la señal de reducción de BNB en presencia de ssADN, siendo posible apreciar que el compuesto BNB disminuye su señal electroquímica rápidamente, determinándose un tiempo óptimo de interacción de 10 minutos.

Para propósitos comparativos se utilizó el mismo tiempo de interacción para el compuesto NB.

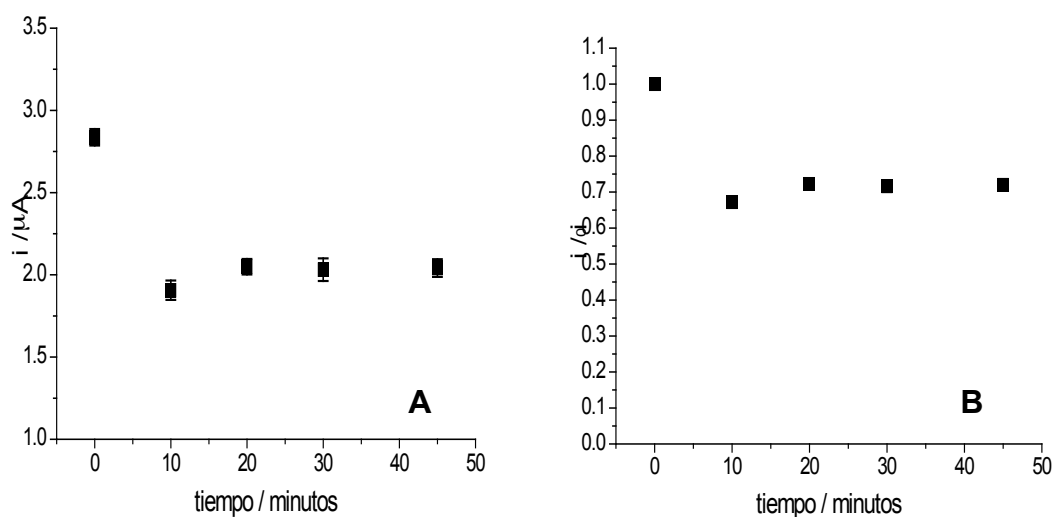


Figura 2. Evaluación voltamperométrica del tiempo de interacción de BNB con ssADN. Valores de intensidad de corriente **(A)** experimentales, **(B)** normalizados donde i_0 corresponde a valor de corriente de BNB sin ADN. Tampón fosfato pH 7.4. Electrodo de trabajo carbono vítreo.

4.1.3. Evaluación de la fuerza iónica sobre la interacción BNB con ADN

De acuerdo a la literatura [3,5], existen al menos tres tipos de interacciones entre el ADN y moléculas orgánicas pequeñas:

- i) Unión no específica, donde priman las fuerzas electrostáticas por interacción con los grupos fosfato cargados negativamente que se presentan en la estructura del ADN, y
- ii) Unión específica no electrostática (intercalación, unión a las hendiduras mayor y menor del ADN) por interacciones de tipo hidrofóbicas.
- iii) Unión covalente con ligandos fundamentalmente compuestos alquilantes formando enlaces covalentes con las bases nitrogenadas.

Para determinar qué tipo de interacción prima entre estas moléculas y el ADN, se evaluó el efecto de la fuerza iónica. Se prepararon soluciones de BNB conteniendo 0, 5 y 50 mM de NaCl y una concentración constante de dsADN (100 ppm). En la figura 3 se observa que a los 30 minutos de interacción, la señal de BNB disminuyó su intensidad inicial cuando no hay NaCl en el sistema o cuando ésta es baja (5 mM), pero no sufrió ninguna variación cuando la fuerza iónica del medio era alta (NaCl 50 mM).

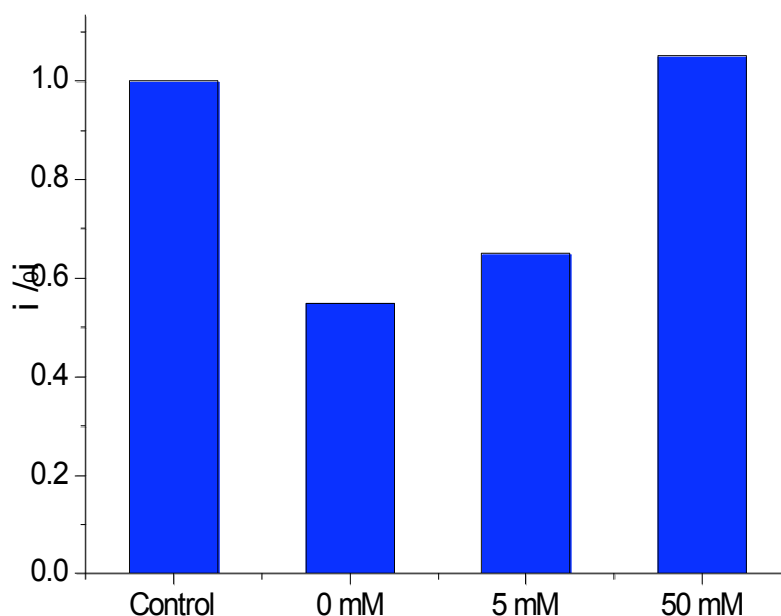


Figura 3. Efecto normalizado de NaCl en la interacción de BNB 11 mM con dsADN 100 ppm. Tiempo de agitación de solución de 30 minutos. i_0 = corriente BNB sin dsADN. Tampón fosfato pH 7.4. Electrodo de trabajo carbono vítreo.

De acuerdo a estos resultados, podríamos concluir que el tipo de interacción que existe entre BNB y el ADN sería principalmente electrostática, la cual se ve favorecida cuando la fuerza iónica del medio es baja, ya que no existe un apantallamiento de las cargas negativas del esqueleto fosfatado del ADN, que sí se observa cuando la fuerza iónica es alta (> 10 mM NaCl) y que favorece las interacciones de tipo intercalativas (hidrofóbicas) con el ADN [4,32,33].

4.1.4. Efecto de la concentración de ADN sobre la respuesta electroquímica de los compuestos a pH 7.4

Una vez determinado el tiempo óptimo de interacción de 10 minutos y que la presencia de NaCl no favorece la interacción entre las moléculas, se inició la evaluación del efecto de la concentración de ssADN y dsADN.

La figura 4A representa la evolución de la respuesta electroquímica de BNB al incrementar la concentración de ssADN, observándose que la señal electroquímica disminuye a concentraciones de ssADN de 100 ppm, permaneciendo relativamente constante a concentraciones mayores de ADN.

La figura 4B muestra la misma evolución de la respuesta de BNB, pero frente a dsADN. La señal electroquímica disminuye, permaneciendo constante a medida que se aumentó la concentración de ADN.

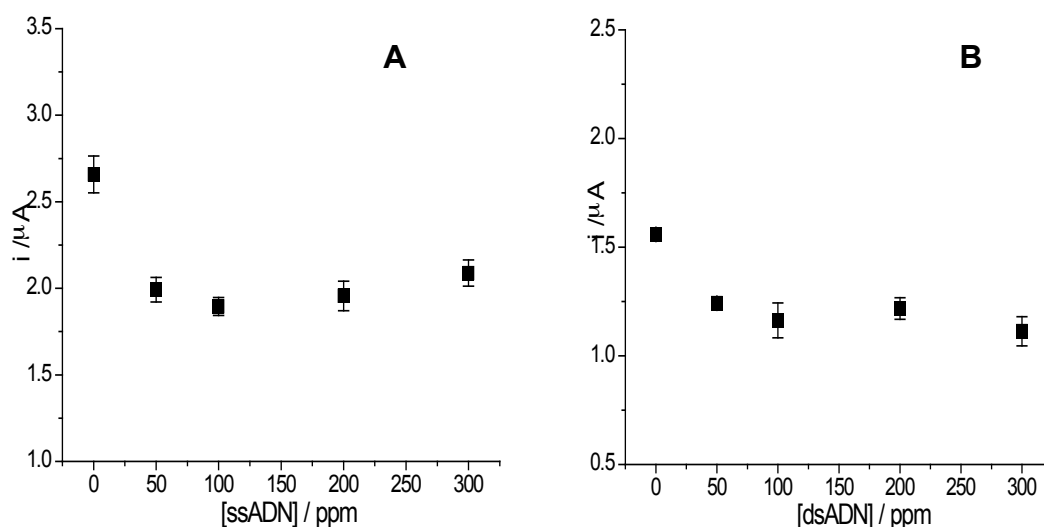


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de ADN en la señal electroquímica de BNB a una concentración constante de $1.1 \times 10^{-5} \text{M}$ con (A) ssADN, (B) dsADN a pH 7.4 tampón fosfato. Tiempo de agitación de 10 minutos. Electrodo de carbono vítreo.

En la figura 5 se compara la disminución de la señal de BNB con ambos tipos de ADN. Se observó que BNB frente a ambos tipos de ADN disminuye su señal electroquímica en aproximadamente un 25-30% y que sobre 100 ppm de ADN se observa una respuesta constante.

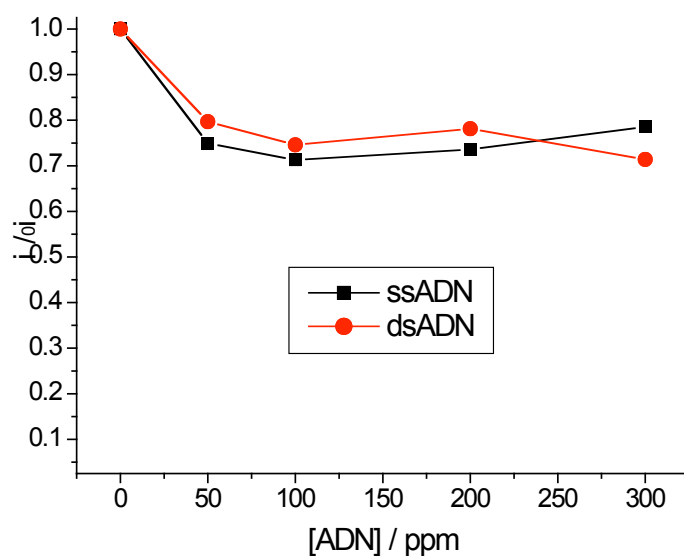


Figura 5. Curvas comparativas de valores normalizados (i_0 = corriente de BNB sin ADN) de BNB 11 μM frente a ssADN y dsADN. Tampón fosfato pH 7.4. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación de 10 minutos.

Por otro lado, se evaluó el comportamiento de la señal electroquímica de NB frente a los dos tipos de ADN. La figura 6A representa la evolución de la señal de NB frente a ssADN, donde la señal disminuyó a medida que se aumenta la concentración de ADN. Lo mismo se aprecia en la figura 6B, donde se muestra la disminución de la señal electroquímica a medida que se aumenta la concentración de dsADN.

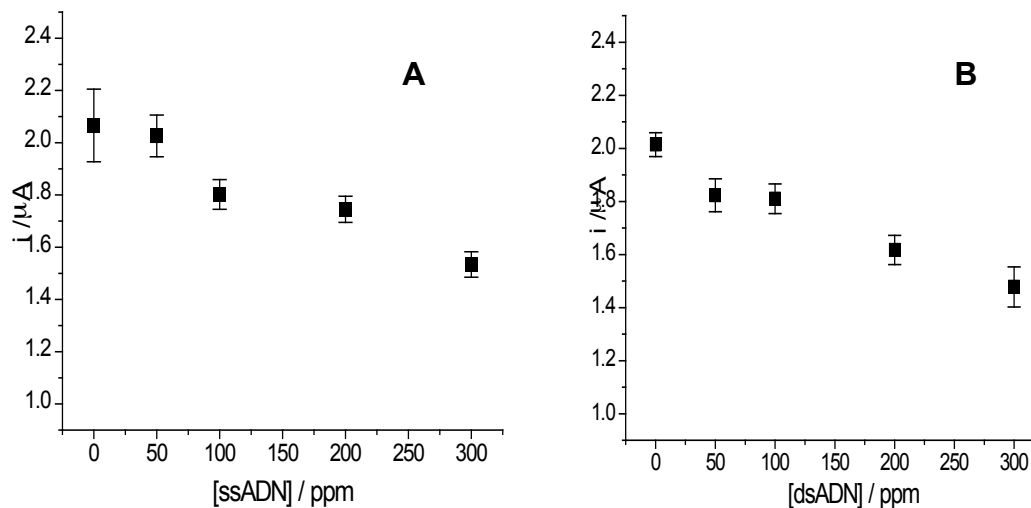


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de ADN en la señal electroquímica de NB a una concentración constante de $11 \mu M$ con **(A)** ssADN, **(B)** dsADN a pH 7,4 tampón fosfato. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación de 10 minutos.

Comparando el comportamiento frente a ambos tipos de ADN (Figura 7), observamos que el decaimiento de la señal electroquímica es similar frente a ambas moléculas en todas las concentraciones de ADN.

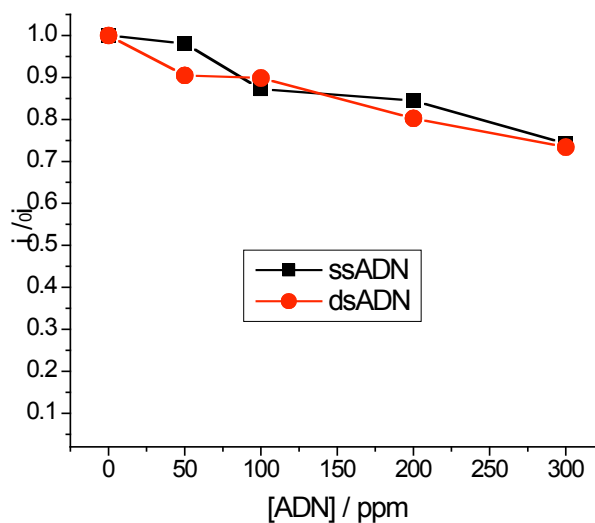


Figura 7. Curvas comparativas de valores normalizados (i_0 = corriente de NB sin ADN) de NB $11 \mu M$ frente a ssADN y dsADN. Tampón fosfato pH 7.4. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación 10 minutos.

En la figura 8 se comparan las curvas de interacción de ambos compuestos frente a (A) ssADN y (B) dsADN, observándose que ambos compuestos presentan una caída en la respuesta electroquímica en cerca de un 30 % del valor inicial, pero en el caso de BNB esta disminución se observó a concentraciones menores que NB.

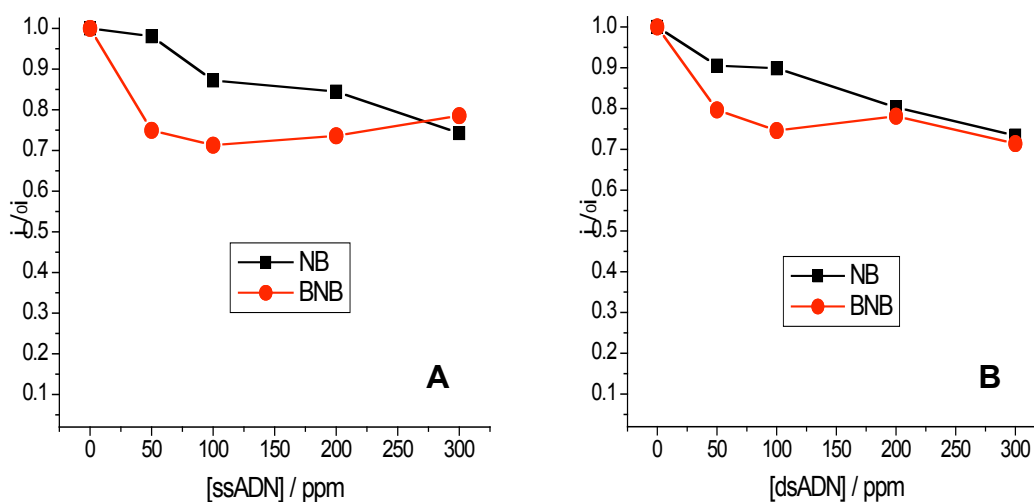


Figura 8. Curvas comparativas de la señal electroquímica de NB y BNB a una concentración constante ($11 \mu\text{M}$) frente a diferentes concentraciones de (A) ssADN, (B) dsADN a pH 7.4, tampón fosfato. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación de 10 minutos.

4.1.5. Determinación de la estequiometría de la interacción de los compuestos.

Se procedió a la realización de curvas de concentración de cada compuesto y se evaluó la respuesta electroquímica frente a una concentración constante de ssADN y de dsADN. En las figuras 9A y 9B, se presentan las curvas de concentración de BNB en presencia de ambos tipos de ADN. Se aprecia que a todas las concentraciones del compuesto existe una disminución de la señal electroquímica, la que se va incrementando más aún a medida que se aumenta la concentración del compuesto.

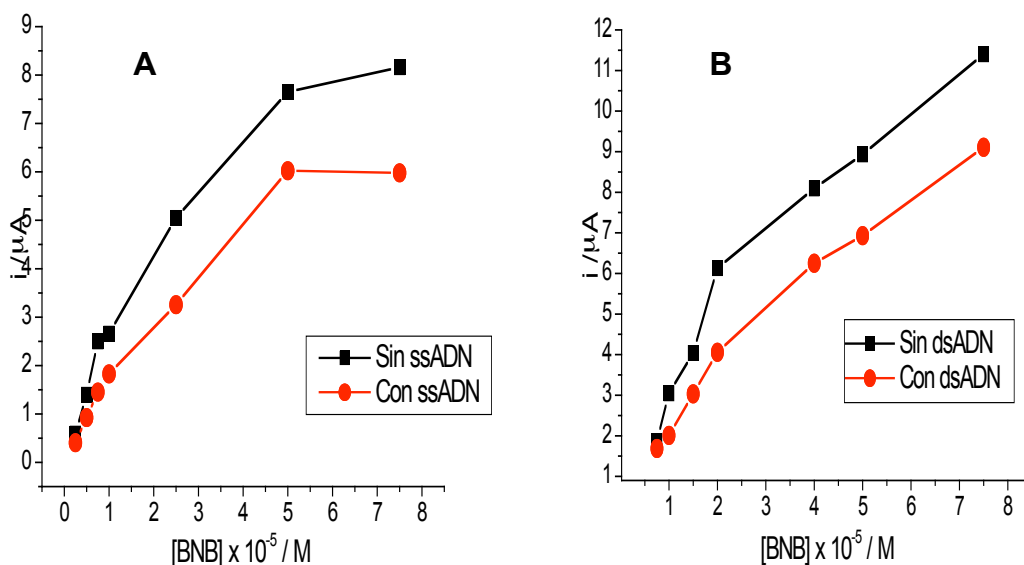


Figura 9. Curvas de concentración de BNB frente a (A) ssADN y a (B) dsADN 166 ppm. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos. Electrodo de carbono vítreo.

Para obtener la estequiometría de la interacción (ver métodos 3.2.2.8), utilizamos la relación logarítmica de la diferencia de la altura de las señales sin y con ADN versus el logaritmo de la concentración del compuesto, descrita por la siguiente ecuación:

$$\log\left(\frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I}\right) = \log \beta'_s + n \log[\textit{nitro}] \quad (\text{i})$$

Donde n es la cantidad de molar de nitrocompuesto que interaccionan con la cantidad molar de pares de bases de ADN y β'_s es la constante de equilibrio del complejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el ADN de doble hebra tiene la capacidad de unir más moléculas de BNB y con una constante de equilibrio mayor que el ADN de una sola hebra. Esto podría explicarse debido a que dsADN presenta más cadenas fosfatadas que ssADN y como la interacción es de tipo electrostática, este proceso se ve favorecido (Figura 10).

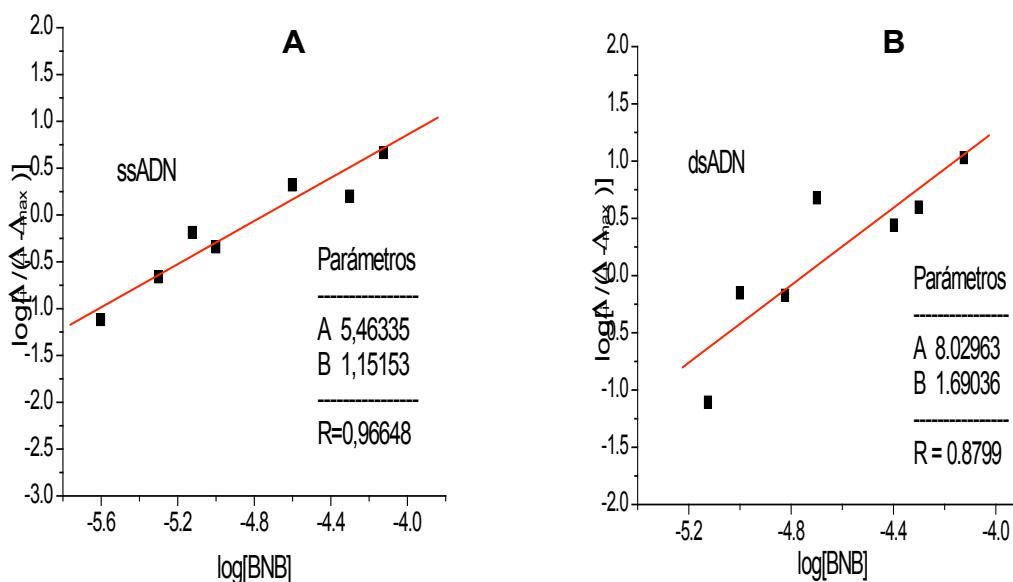


Figura 10. Relación entre $\log[\Delta I/(\Delta I_{\max}-\Delta I)]$ y $\log[BNB]$. **(A)** ssADN y **(B)** dsADN, 166 ppm. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos. Electrodo carbono vítreo.

En el caso de NB las figuras 11A y 11B muestran que a todas las concentraciones ensayadas del compuesto existe una disminución de la señal, la que se incrementa a concentraciones mayores de NB. Esto se observa en presencia de ssADN y de dsADN.

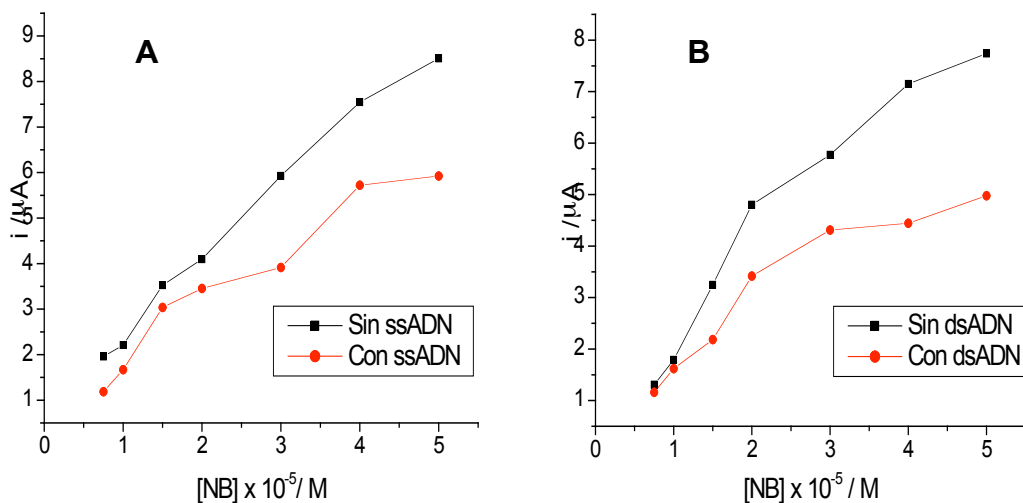


Figura 11. Curvas de concentración de NB frente a **(A)** ssADN y a **(B)** dsADN 166 ppm. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos. Electrodo de carbono vítreo.

Al igual que con BNB, se ocupó la relación logarítmica de la diferencia de la altura de las señales sin y con ADN versus el logaritmo de la concentración del compuesto (ecuación i), para determinar la estequiometría de la interacción de NB con ssADN y con dsADN (Figura 12).

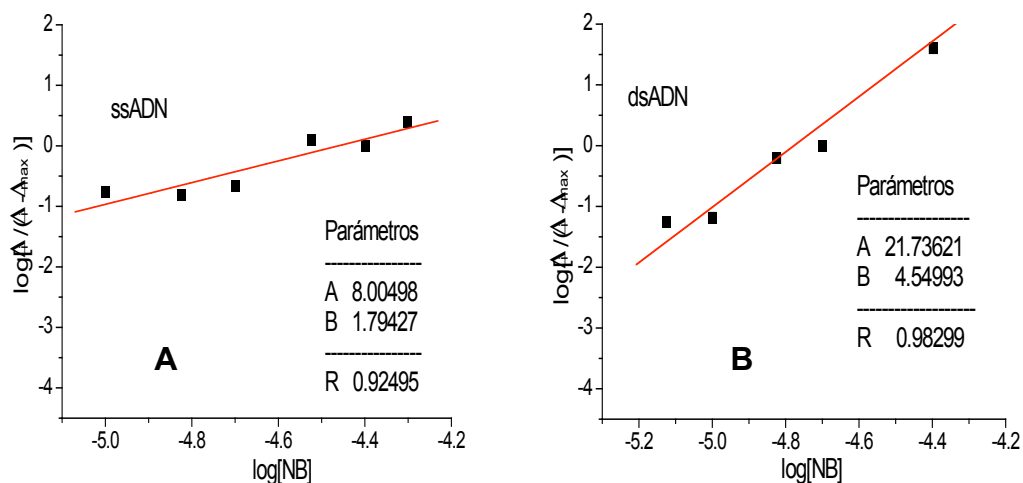


Figura 12. Relación entre $\log[\Delta I / (\Delta I_{\max} - \Delta I)]$ y $\log[\text{NB}]$ a pH 7.4 tampón fosfato con **(A)** ssADN y **(B)** dsADN, 166 ppm. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos. Electrodo carbono vítreo.

Comparando con BNB, en el caso de los dos tipos de ADN, NB presentó mayores números estequiométricos (Tabla 1), es decir casi el doble de concentración de NB se unen por cantidad molar de pares de bases de ADN y con una constante de equilibrio mayor.

Esto nos hace concluir que el sustituyente N-benzoilo no favorece la interacción con el ADN, probablemente debido a que los substituyentes del anillo benzimidazólico no se encuentran en el mismo plano como fue demostrado recientemente por Modelado Molecular [23].

Tabla 1. Número de moléculas de nitrocompuesto que interaccionan con molécula de ADN (n) y constante de equilibrio (β'_s) de los compuestos BNB y NB, en presencia de ssADN y dsADN.

	ssADN		dsADN	
	n	β'_s	n	β'_s
BNB	1.0	2.5×10^5	1.5	1.1×10^8
NB	1.8	1.0×10^8	4.5	5.4×10^{21}

4.1.6. Efecto del pH sobre la interacción de NB y BNB con ADN

En estudios espectroscópicos realizados para NB y BNB [22], se describe la obtención de los valores de pK_a para cada molécula, los cuales determinan el grado de ionización en solución de los nitrocompuestos.

De acuerdo a esto, NB presenta un valor de pK_a de 11.4 correspondiente al nitrógeno ubicado en posición 1 (-NH) de la estructura benzimidazólica y un pK_a de 5.7 para el nitrógeno en posición 3. Para BNB, el valor de pK_a obtenido fue de 4.9 para el N en posición 3 (figura 13).

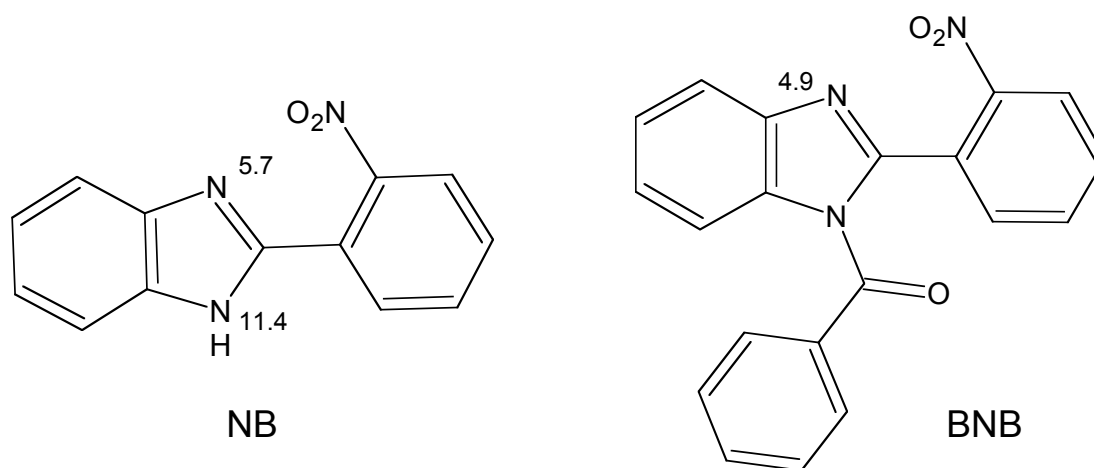


Figura 13. Estructuras NB y BNB con sus respectivos valores de pK_a

En base a estos antecedentes, se estudió el efecto del cambio de pH de la solución de trabajo desde 7.4, en el cual las dos moléculas se encuentran prácticamente 100% no ionizadas, a pH 5.7 para NB y a pH 4.9 en tampón acetato para BNB, en donde ambos compuestos están parcialmente ionizados de acuerdo al pK_a en posición 3 de la estructura benzimidazólica.

La figura 14A muestra la evolución de la señal electroquímica de BNB frente a diferentes concentraciones de ssADN a pH 4.9. Se observa que la señal disminuye a medida que aumentó la concentración de ADN en la solución, hasta una concentración de 100 ppm, donde a mayores concentraciones de ADN, la señal electroquímica tiende a aumentar, pero siempre es menor que la señal obtenida sin adicionar ADN.

La figura 14B muestra la evolución de la señal electroquímica de BNB frente a diferentes concentraciones de dsADN a pH 4.9. Se observa una disminución gradual de la señal a medida que se aumentó la concentración de ADN hasta 200 ppm, permaneciendo constante a concentraciones mayores.

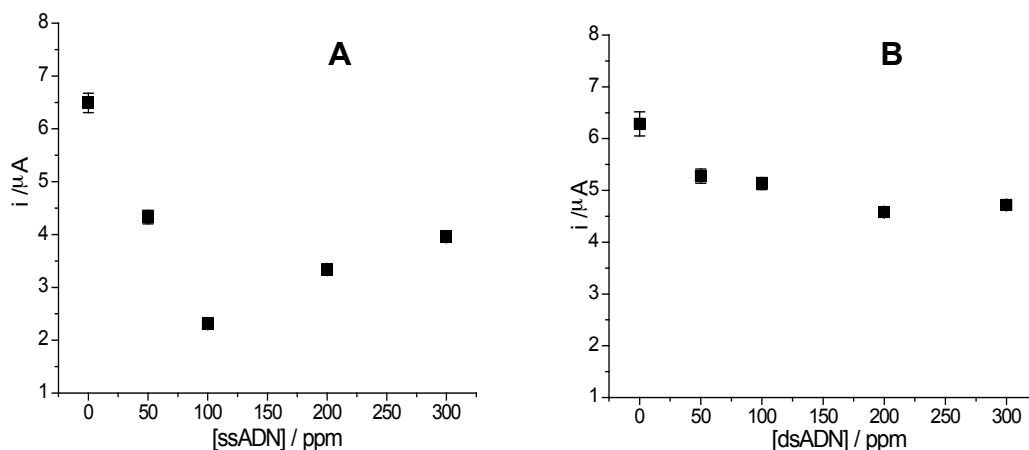


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de ADN en la señal electroquímica de BNB a una concentración constante de 11 μM con (A) ssADN, (B) dsADN a pH 4.9 tampón fosfato. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación de 10 minutos.

En la figura 15 se comparó la señal electroquímica de BNB frente a ssADN y a dsADN. Se observa que cuando BNB está parcialmente ionizado hay una mayor interacción con ssADN, con una disminución de hasta un 65% de la señal inicial a 100 ppm de ssADN. En cambio, la interacción frente a dsADN no se ve mayormente influenciada a pH 7.4.

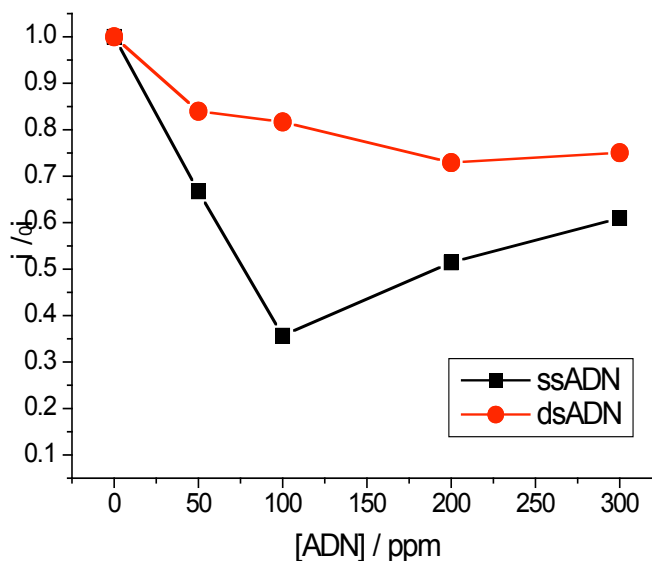


Figura 15. Curvas comparativas de valores normalizados de BNB 11 μ M frente a ssADN y dsADN. Tampón acetato pH 4.9. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación 10 minutos.

Por otro lado, también se evaluó el efecto del cambio de pH de la solución de NB frente a ambos tipos de ADN. Según el pK_a , el pH escogido fue de 5.7, donde NB se encuentra parcialmente ionizado. La figura 16A muestra la disminución de la señal electroquímica de NB frente a ssADN. La señal disminuye hasta 100 ppm, la cual aumenta a mayores concentraciones. En cambio, la señal de NB frente a diferentes concentraciones de dsADN, disminuye rápidamente al utilizar 50 ppm de dsADN y permanece relativamente constante a mayores concentraciones (Figura 16B).

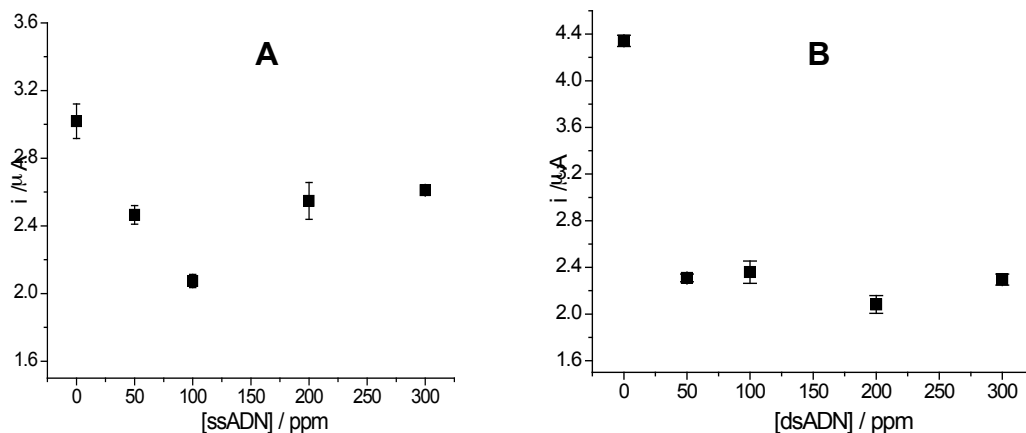


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de ADN en la señal electroquímica de NB a una concentración constante de $1.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ con (A) ssADN, (B) dsADN a pH 5.7 tampón fosfato. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación de 10 minutos.

La figura 17, compara la influencia de diferentes concentraciones de ssADN y dsADN sobre NB. Se muestra que la señal electroquímica de NB con ssADN disminuye hasta un 30% a una concentración de ADN de 100 ppm. Por otro lado, la señal de NB disminuye hasta un 50% frente a concentraciones bajas de dsADN, Estos resultados nos indican que cuando NB está ionizado, existe una reactividad preferencial sobre ADN de doble hebra.

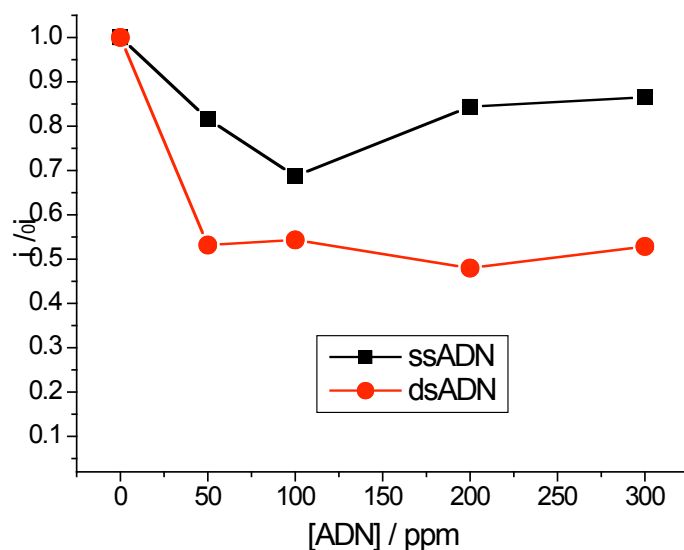


Figura 17. Curvas comparativas de valores normalizados de NB $11 \mu\text{M}$ frente a ssADN y dsADN. Tampón acetato pH 5.7. Electrodo carbono vítreo. Tiempo de agitación 10 minutos.

Con dsADN, la señal electroquímica de NB a pH 5.7 disminuyó a concentraciones bajas de ADN, con respecto a cuando se encontraba en solución pH 7.4 en tampón fosfato. Esto nos indicaría que el equilibrio del complejo se alcanza más rápido.

4.2. Estudios espectroscópicos

4.2.1. Evaluación de la interacción mediante espectroscopia UV-Vis.

En primera instancia se obtuvo mediante espectroscopia UV-Vis, el espectro de absorción de BNB, determinándose un máximo de absorción en longitud de onda de 274 nm.

En la figura 18A, se presentan los espectros de absorción de BNB frente a diferentes concentraciones de ssADN. Se evidencian efectos hipo y batocrómicos cuando la interacción es frente a ssADN. En el caso de la interacción con dsADN, se observa un efecto hiperocrómico inicial (50 ppm), sin cambio en el máximo de absorción y a concentraciones mayores (150 ppm), ocurre cambios hipo y batocrómicos, de manera similar a lo observado con ssADN (Figura 18B).

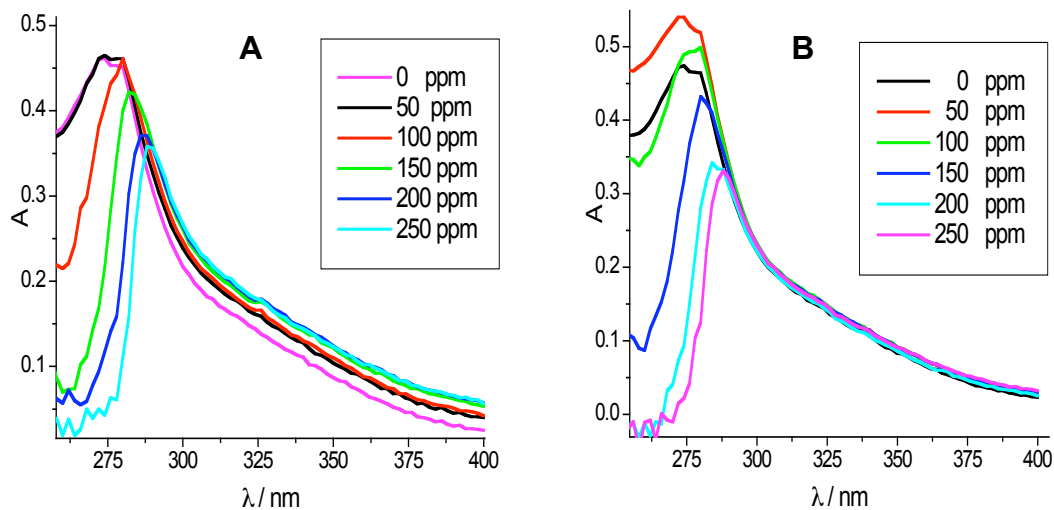


Figura 18. Espectros de absorción de BNB $2.5 \times 10^{-5} M$ frente a diferentes concentraciones de **(A)** ssADN y **(B)** dsADN. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos.

La figura 19 muestra la de disminución de la absorbancia de BNB frente a diferentes concentraciones de ambos tipos de ADN a 274 nm.

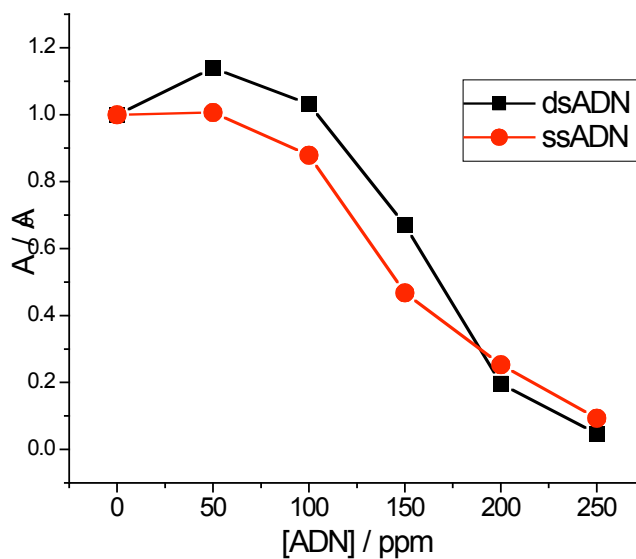


Figura 19. Curvas comparativas de normalizados de la disminución de la absorbancia a 274 nm de BNB (A_0 = Absorbancia de BNB sin ADN) frente a diferentes concentraciones de ambos tipos de ADN. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos.

En el caso de NB el espectro de absorción UV se determinó un máximo de absorción de 274 nm (igual que BNB).

La figura 20A muestra los espectros de absorción para NB frente a diferentes concentraciones de ssADN. Se evidencia un cambio hipo y batocrómico, además de un cambio hipercrómico a concentraciones elevadas de ADN (250 ppm). Se observó un cambio hipo y batocrómico cuando NB interactuó con dsADN (Figura 20B).

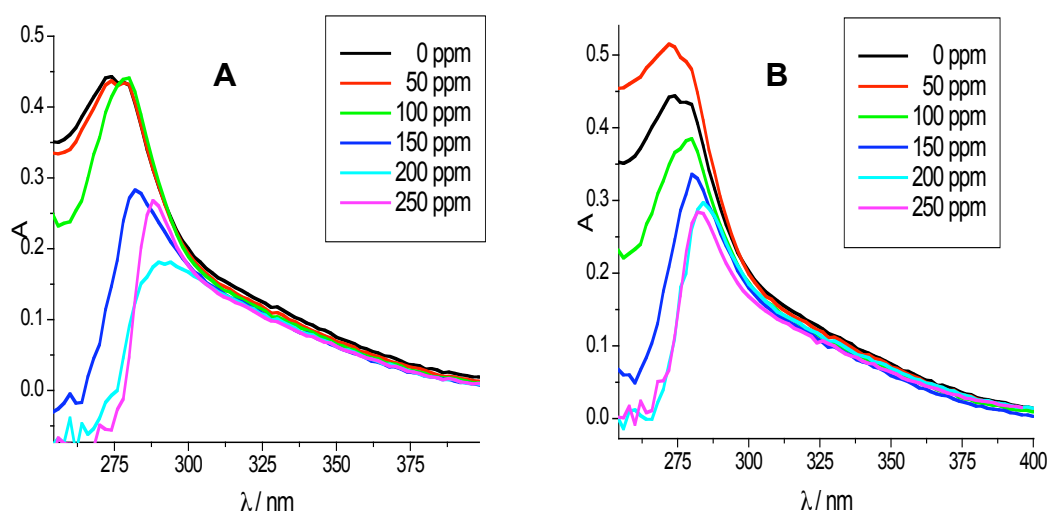


Figura 20. Espectros de absorción de NB 25 μM frente a diferentes concentraciones de (A) ssADN y (B) dsADN. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos.

En la figura 21 se observan las curvas de disminución de absorbancia de NB a 274 nm, frente a diferentes concentraciones de ambos tipos de ADN.

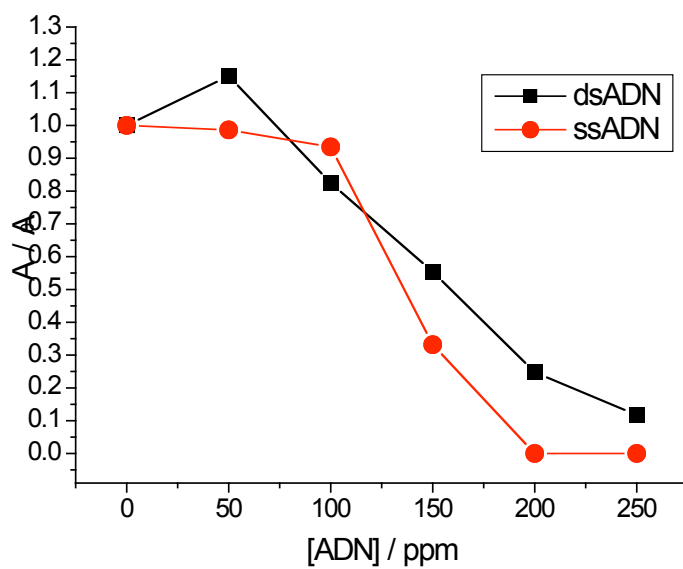


Figura 21. Curvas comparativas de normalizados de la disminución de la absorbancia a 274 nm de NB (A_0 = Absorbancia de BNB sin ADN) frente a diferentes concentraciones de ambos tipos de ADN. Tampón fosfato pH 7.4. Tiempo de agitación de 10 minutos.

Se observa que el máximo de absorción de NB frente a ssADN no disminuye hasta una concentración de 100 ppm y sí lo hace hasta 200 ppm, donde la absorbancia de NB a los 274 nm se hace 0.

4.3. Estudio de la interacción de nitrocompuestos con ADN mediante biosensores electroquímicos de ADN.

De acuerdo a la literatura [34-36], el uso de genosensores electroquímicos ha sido una buena herramienta de estudio de la interacción de fármacos y/o moléculas orgánicas en general, con el ADN. Por otro lado, los nanotubos de carbono han surgido como un eficiente favorecedor de las respuestas electroquímicas y han permitido incrementar la sensibilidad analítica de los sensores electroquímicos en general [37-39].

Es por esto, que para estudiar la interacción de NB y BNB con ADN se utilizó un sensor de ADN adsorbido sobre un electrodo de carbono vítreo previamente modificado con nanotubos de carbono (CV/CNT/ADN).

4.3.1. Estudio de las condiciones óptimas de trabajo.

Se estudió el efecto del medio de trabajo en la adsorción de NB sobre la superficie del electrodo modificado con nanotubos. La figura 22A muestra el voltamperograma de NB adsorbido sobre un electrodo CV/CNT/ADN en tampón fosfato pH 7.4, observándose una señal del blanco en la misma región de la señal de NB, dejando superpuestas las señales.

Por esta causa, se decidió cambiar las condiciones experimentales a tampón formiato pH 5.0 (Figura 22B), observándose que el blanco también presenta una señal electroquímica, pero como la señal electroquímica del nitrocompuesto se adelanta por el cambio de pH [23], es posible trabajar bajo estas condiciones.

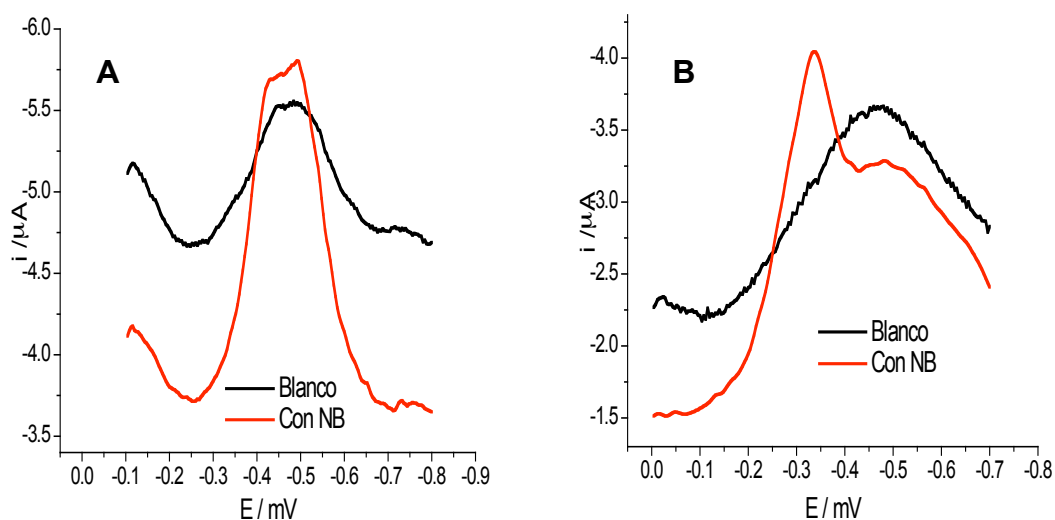


Figura 22. Señales electroquímicas de NB y del blanco en distintos medios de adsorción. **(A)** tampón fosfato pH 7.4, **(B)** tampón formiato pH 5.0. Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos dispersos en quitosano con 3 minutos de acumulación de dsADN de concentración 45 ppm (CV/CNT/ADN). Tiempo de acumulación de NB de 10 minutos.

Como las señales de NB y BNB presentan potenciales de reducción similares, también se ocupó tampón formiato pH 5.0 para trabajar con BNB.

4.3.2. Estudio del tiempo de acumulación de NB

Se estudió el efecto del tiempo de adsorción de NB sobre la respuesta electroquímica del biosensor. La figura 23 muestra que la señal de NB aumentó con el tiempo de adsorción hasta 10 minutos. A partir de ese tiempo, la señal electroquímica permanece relativamente constante.

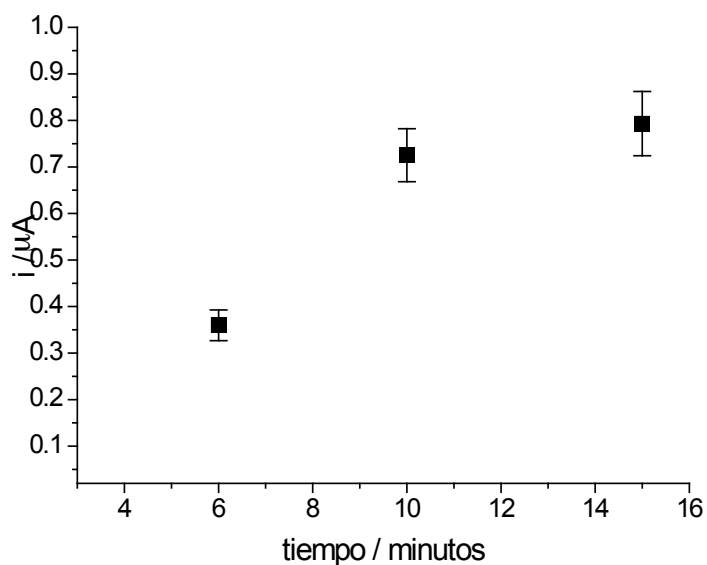


Figura 23. Estudio del tiempo de acumulación de NB con tampón formiato pH 5.0. Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos dispersos en quitosano con 3 minutos de acumulación de dsADN de concentración 45 ppm (CV/CNT/ADN).

Este tiempo concuerda con lo observado en los estudios en solución, donde por sobre de 10 minutos de interacción no se observaron mayores cambios en la respuesta electroquímica.

De acuerdo a lo anterior, se estableció como tiempo óptimo de acumulación para los posteriores estudios, 10 minutos. Además, se utilizó el mismo tiempo de adsorción para BNB para propósitos comparativos.

4.3.3. Efecto de la concentración de los compuestos NB y BNB en la respuesta electroquímica.

Se evaluó la respuesta del biosensor a distintas concentraciones de NB. La figura 24A muestra que la señal electroquímica de NB aumentó conforme al aumento de su concentración, hasta concentraciones de 80 μM de NB. A concentraciones mayores, la señal desciende.

Por otro lado, la figura 24B muestra la señal electroquímica de BNB influenciada por el cambio de concentración de éste. Se observa que la curva

se comporta igual que la de NB, llegando a una señal máxima a una concentración de 80 μM , descendiendo a mayores concentraciones de BNB.

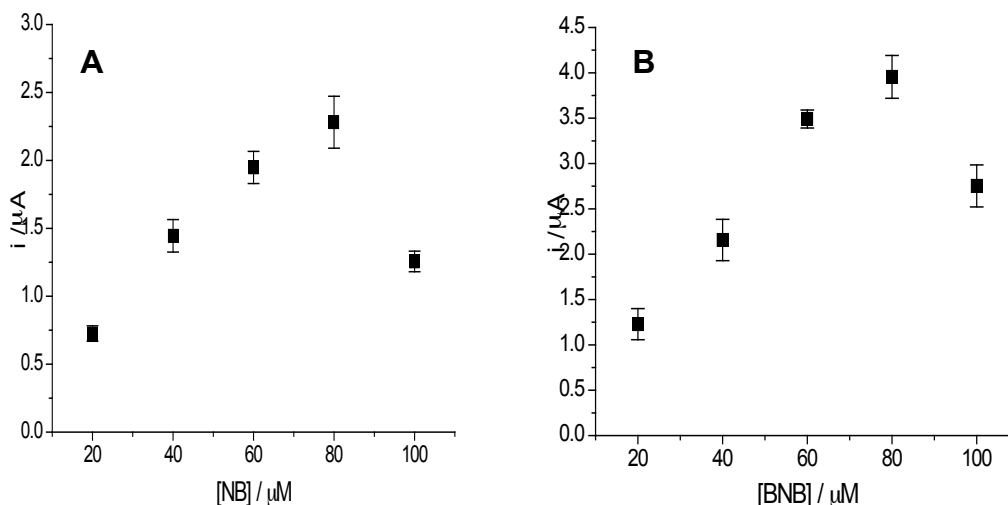


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de **(A)** NB y **(B)** BNB. Tampón formiato pH 5.0. Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos dispersos en quitosano con 3 minutos de acumulación de dsADN de concentración 45 ppm (CV/CNT/ADN).Tiempo de acumulación de NB de 10 minutos.

4.3.4. Efecto de la concentración de ADN en la señal electroquímica de los nitrocompuestos.

Manteniendo constante la concentración de NB en 60 μM , se estudió el efecto de aumentar la concentración de ADN en el biosensor. Se observó que a medida que aumenta la concentración de dsADN (Figura 25A), aumenta la respuesta electroquímica, pero en un rango estrecho de concentraciones, 20 a 60 μM , sobre esas concentraciones la señal electroquímica permanece constante, incluso disminuye.

En el caso de BNB (figura 25B), se observó un aumento en la respuesta electroquímica a concentraciones bajas de dsADN, 20 a 30 μM , y posteriormente una disminución de la respuesta electroquímica a concentraciones mayores de ADN.

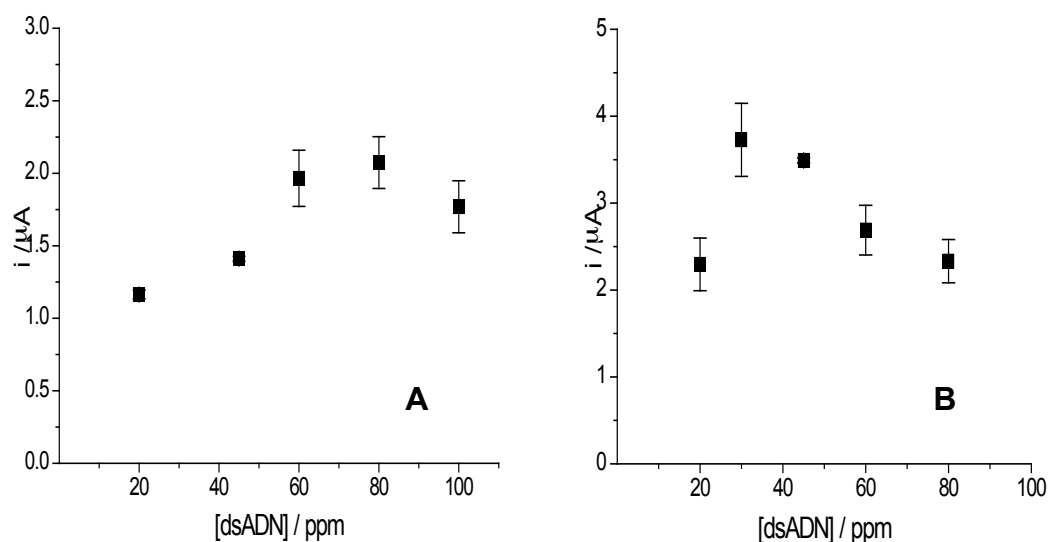


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de dsADN en la señal electroquímica de **(A)** NB y **(B)** BNB acumulado sobre el electrodo carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono dispersos en quitosano (CV/CNT/ADN). Tampón formiato pH 5.0.

Para explicar la escasa respuesta del biosensor frente a ambos nitrocompuestos, los que incrementaron su señal sólo en un rango estrecho de concentración se decidió estudiar la respuesta electroquímica propia del ADN acumulado en el biosensor. En la figura 26 se observa que la señal electroquímica de ADN, debida a la oxidación de las guaninas presentes en la molécula, aumenta linealmente con el aumento de la concentración de ADN hasta 120 ppm.

Esto nos está indicando que el biosensor no se encuentra saturado de ADN en la última capa.

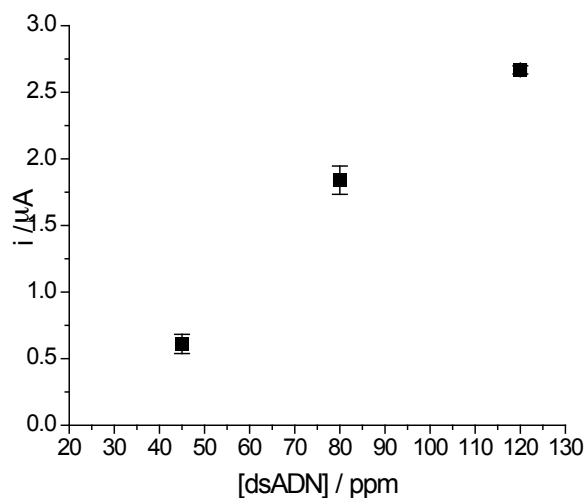


Figura 26. Respuesta electroquímica de oxidación de ADN en función de la concentración de ADN acumulado sobre el electrodo carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono dispersos en quitosano (CV/CNT). Tampón formiato pH 5.0.

Si comparamos con los resultados obtenidos en solución (Figura 8B) vemos que BNB, frente a dsADN, alcanzó su máximo de interacción a concentraciones menores que NB, lo que concuerda con lo observado con el biosensor, pero en este último caso el rango de concentraciones en las que se observa interacción es mucho menor a las necesarias para producir cambio cuando el ADN está en solución. Una explicación posible estaría dada por el hecho de que cuando el ADN está en solución, sus bases se encuentran más disponibles para interactuar con los nitrocompuestos ya que no existe compactación del material como cuando el ADN se encuentra adsorbido sobre la superficie del electrodo, caso en que, probablemente haya una menor superficie activa para interactuar.

5. Conclusiones y Perspectivas

- NB y BNB interaccionaron con estructuras de ADN de una y dos hebras y el mecanismo de interacción sería predominantemente por interacciones electrostáticas con las cadenas fosfatadas del ADN.
- NB y BNB no presentaron una interacción preferente por alguna de las estructuras de ADN estudiadas a pH 7.4, condición en la cual ambas moléculas están neutras.
- BNB presentó una mayor reactividad que NB a concentraciones bajas de ADN, pero a concentraciones altas ambas moléculas presentaron reactividades similares.
- Para ambos tipos de ADN, NB presentó números estequiométricos mayores que BNB, es decir se unen una mayor cantidad molar de NB por cantidad molar de pares de bases de ADN.
- Cuando las condiciones del medio se cambiaron y las moléculas se encontraron parcialmente ionizadas, NB una mayor interacción con ADN de doble hebra y BNB con ADN de hebra simple.
- Los electrodos de CV/CNT/ADN permitieron evaluar la interacción de NB y BNB con dsADN lo que permitirá a futuro evaluar si existe daño directo de estas moléculas o de un metabolito generado in situ sobre el ADN.

6. Referencias

- [1] Chaudhuri P., Majumder H.K, Bhattacharya S (2007). Synthesis, DNA Binding, and Leishmania Topoisomerase Inhibition Activities of a Novel Series of Anthra[1,2-d]imidazole-6,11-dione Derivatives. *J. Med. Chem.* 50: 2536-2540.
- [2] Ammons W.S., Wangy J.W., Yangy Z., Tidmarshz G.F., Hoffmany R.M. (2007). A novel alkylating agent, glufosfamide, enhances the activity of gemcitabine in vitro and in vivo. *Neoplasia*. 9: 635-633.
- [3] Nelson S.M., Ferguson L.R., Denny W.A., (2007). Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mut. Res.* 623: 24-40
- [4] Rauf S., Nawaz H., Akhtar K., Ghauri M.A., Khalid A. M. (2007). Studies on sildenafil citrate (Viagra) interaction with DNA using electroquimical DNA biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 22: 2471:2477.
- [5] Avendaño C., (2001). Introducción a la química farmacéutica, *Mc Graw- Hill. Interamericana*. 2da edición. 530-573.
- [6] Lancey E., (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18: 885-936.
- [7] MacDonald L.M., Armson A.,Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., (2004). Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138: 89-96.
- [8] Sheng J., Nguyen P.T.M., Baldeck J.D., Olsson J., Marquis R.E., (2006). Antimicrobial actions of benzimidazoles against the oral anaerobes *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*. *Arch. Oral Biol.* 51: 1015-1023.
- [9] Kus C., Goker H., Ayhan G., Ertyan R., Altanlar N., Akin A., (1996). Synthesis and antimicrobial activity of some new piperidinyll benzimidazoles. *Farmaco.* 51: 413-417.

- [10] Going C.J., Mayer V.W., (1995). Induction of chromosomes loss in *Sacchromyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. *Mut. Res.* 343: 185-199.
- [11] Hall L., Kier L., (1978). Molecular connectivity and substructure analysis. *J. Pharm. Sci.* 67:1743-1747.
- [12] Starčević K., Kralj M., Ester K., Sabol I., Grce M., Pavelić K., Karminski-Zamola G. (2007). Synthesis, antiviral and antitumor activity of 2-substituted-5-amidino-benzimidazoles. *Bioorg. Med.Chem.* 15: 4419-4426.
- [13] Kim J. S., Gatto B., Yu C., Liu A., Liu L. F., Lavoie E.J., (1996). Substituted 2,5'-Bi-1H-benzimidazoles: topoisomerase I inhibition and cytotoxicity. *J. Med. Chem.* 39: 992-998.
- [14] Andrzejewska M., Yépez-Mulia L., Cedillo-Rivera R., Tapia A., Vilpo L., Vilpo J., Kazimierczuk Z., (2002). Synthesis, antiprotozoal and anticancer activity of substituted 2-trifluoromethyl- and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 37: 973-978.
- [15] Nivinskas H., Koder R. L., Anusevičius Ž., Šarlauskas J., Miller A., Čėnas N.,(2001). Quantitative Structure–Activity Relationships in Two-Electron Reduction of Nitroaromatic Compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:Nitroreductase *Arch. Biochem. Biophysics.* 385: 170-178.
- [16] Grundberg E., Titsworth E. H.,(1973). Chemotherapeutic properties of heterocyclic compounds: monocyclic compounds with five-membered rings. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 317-346.
- [17] Kedderis G. L., Miwa G., (1988). The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metab. Rev.* 19: 31-62.
- [18] Spain J. C., (1995). Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 523-555.

- [19] Holtzman J. L., Crankshaw D. L., Peterson F. J., Polnaszek C. F., (1981). The kinetics of the aerobic reduction of nitrofurantoin by NADPH-cytochrome P-450 Ic) reductase. *Mol. Pharmacol.* 20: 669-673.
- [20] Esteve-Nunez A., Caballero A., Ramos J.L., (2001). Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 335-352.
- [21] Viodé C., Bettache N., Cenas N., Krauth-Siegel R. L., Chauvière G., Bakalara N., Périé J., (1999). Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* 57: 549-557.
- [22] Valenzuela J., Pessoa-Mahana H., Atría A. M., Contreras M., Pezoa J. (2005). Influence of N-substitution on electron spin resonance (ESR) behavior of 2-(2-nitrophenyl)-1H-benzimidazole derivatives. *Spectrosc. Lett.* 38: 557-567.
- [23] Quezada C. (2007). Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación y caracterización de 2-(o-nitrofenil)-benzimidazol y N-benzoil-2-(o-nitrofenil)-benzimidazol. Memoria obtención título de Químico Farmacéutico, Fac. de Cs. Qcas. y Farm., U. de Chile, Santiago de Chile.
- [24] García M.A., de Pascual-Teresa B., (2004). Técnicas empleadas para el estudio de la interacción entre agentes antitumorales y el DNA. *Oncología.(Barc).* 27: 33-43.
- [25] Jiang X., Shang L., Wang Z., Dong S., (2005). Spectrometric and voltammetric investigation of interaction of neutral red with calf thymus DNA: pH effect. *Biophys. Chem.* 118: 42-50.
- [26] Feng Q., Li N-Q., Jiang Y-Y., (1997). Electroquimical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA. *Anal. Chim. Act.* 97: 104-111.
- [27] Ferancová A., Adamovski M., Gründler P., Zima J., Barek J., Mattusch J., Wennrich R., Labuda J., (2007). Interaction of tin(II) and arsenic (III) with DNA at the nanostructure film modified electrodes. *Bioelectrochem.* 71: 33-37.

- [28] Oliveira A. M., Disculescu B., Disculescu V., (2004). Electrochemical study of quercetin-DNA interactions. Part II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochem.* 64: 143-150.
- [29] Prieto-Simón B., Cortina M., Campàs M., Calas-Blanchard C., (2007). Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sens. Act. B.* doi:10.1016/j.snb.2007.08.004.
- [30] Bollo S., Ferreyra N.F., Rivas G., (2007). Electrooxidation of DNA at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in chitosan. *Electroanal.* 19: 833-840.
- [31] Liu J., Liu Q., Liu Y., Liu S., Yao S., (2005). DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. *Anal. Biochem.* 346: 107-114.
- [32] Sivolob A., Khrapunov S.N., (1997). Electrostatic contribution to the bending of DNA. *Biophys. Chem.* 67: 85-96.
- [33] Hartley J.A., Forrow S.M., Souhami R.L., (1990). Effect of ionic strength and cationic DNA affinity binders on the DNA sequence selective alkylation of guanine N7-positions by nitrogen mustards. *Biochem.* 29: 2985-2991.
- [34] Oliveira-Brett A.M, da Silva L.A., Fujii H., Mataka S., Thiemann T., (2003). Detection of the damage caused to DNA by a thiophene-S-oxide using an electrochemical DNA-biosensor *J. Electroanal. Chem.* 549: 91-99.
- [35] Diculescu V.C., Barbosa R.M., Oliveira-Brett A.M., (2005). In situ sensing of DNA damage by a nitric oxide-releasing compound. *Anal. Lett.* 2005, 38, 2525-2540.
- [36] Kang J., Dong S., Lu X., Su B., Wu H., Sun K, (2006). Electrochemical detection of scDNA cleavage in the presence of macrocyclic hexaaza-copper(II) complex. *Bioelectrochem.* 69: 58-64.
- [37] Banks C.E., Compton R.G., (2006). New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite. *Analyst.* 131: 15-21.

[38] Wang J., (2005). Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanal.* 17: 7-14.

[39] Valcarcel M., Simonet B.M., Cardenas S., Suarez E.B., (2005). Present and future applications of carbon nanotubes to analytical science. *Anal Bioanal Chem.* 382: 1783-1790.