



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y
REACTIVIDAD CON ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO
DE C-4-HIDROXIFENIL-1,4-DIHIIDROPIRIDINAS**

PATROCINANTE

Prof. Luís J. Núñez Vergara

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTORES DE MEMORIA

Prof. Juan A. Squella Serrano

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÁNICA Y FÍSICOQUÍMICA

Dra. Soledad Bollo Dragnic

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

Marcelo Leonardo López Menadier

SANTIAGO DE CHILE

2006

Dedico la presente tesis, que simboliza la finalización de una importante y larga etapa de mi vida, a todas las personas que han aportado a mi desarrollo y crecimiento, y que considero como el capital más importante que una persona pueda acumular.

En primer lugar a mi familia: Madre, Padre y Hermanos, a quienes debo la esencia de quien soy, a mis amigos de toda la vida por estar siempre e incondicionalmente y a todos mis compañeros de carrera que con quienes sufrimos juntos los sacrificios propios del rigor estudiantil y a quienes jamás olvidaré.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer al profesor Luís Núñez Vergara por la confianza depositada y por su buena disposición para ayudarme en todo.

A todo el laboratorio de Bioelectroquímica por tan grato ambiente de trabajo, a mi directora de tesis Dra. Soledad Bollo, Profesor Juan Sturm y a los alumnos de Doctorado en Química Paola Jara y Ricardo Salazar por prestarme su ayuda siempre que la necesite.

Al profesor Patricio Navarrete por su vital y desinteresado apoyo.

A todo el equipo del servicio social de la facultad en especial a la Sra. Victoria Goldsack, por el admirable desempeño en su labor y enorme calidad humana, a la que debo en gran parte el haber llegado a estas instancias.

Al equipo de mis amores "AGUANTE" que además de triunfos y alegrías me ha entregado la posibilidad de conocer a grandes personas y estrechar lazos de amistad que espero se sigan cultivando en el tiempo.

Al proyecto FONDECYT N° 1050761 por financiar esta memoria.

Índice

Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	7
Materiales y métodos.....	13
Resultados y discusión.....	21
Conclusiones.....	47
Referencias.....	48

RESUMEN

En esta Memoria se estudió la reactividad de tres nuevas 1,4-dihidropiridinas (1,4-DHP) frente al anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y se evaluó la influencia de los sustituyentes en posición 4 del anillo dihidropiridínico.

Estas moléculas también se caracterizaron electroquímicamente mediante Voltamperometría de pulso diferencial (VPD), Voltamperometría cíclica (VC), electrólisis a potencial controlado (EPC) y Voltamperometría de barrido lineal con electrodo de disco rotatorio (DR). Los estudios electroquímicos demuestran que en medio acuoso las 1,4-dihidropiridinas son más fáciles de oxidar a pHs básicos, mostrando el siguiente orden en cuanto a la facilidad de oxidación:

4-HIDROXIFENIL-DHP (4-OH-DHP) > 3-HIDROXIFENIL-DHP (3-OH-DHP) > 4-FENIL-DHP (DHP). Este mismo orden se observó en medio no acuoso. La oxidación de las 1,4-DHPs en ambos medios correspondió a un proceso irreversible, en que la corriente fue controlada por difusión.

La cinética de reacción fue seguida mediante espectroscopía UV-Visible con arreglo de diodos. Las constantes de formación del anión dihidropiridínico se calcularon usando un equipo de flujo retenido. El orden para la constante fue: NADH > 4-OH-DHP > 3-OH-DHP > DHP.

Por otra parte, las constantes cinéticas para la reacción entre el anión radical superóxido y las DHPs fueron calculadas a través de cinética continua. Claramente, las DHPs que tienen un grupo hidroxifenilo en la posición 4 del anillo dihidropiridínico presentaron constantes cinéticas significativamente mayores que las 1,4-DHP comerciales estudiadas con el siguiente orden: 3-OH-DHP > 4-OH-DHP > DHP > AMLODIPINO > NISOLDIPINO > NIMODIPINO.

La reactividad entre el anión superóxido y las 1,4-DHPs ocurriría a través de un mecanismo que incluye en una primera etapa la rápida formación del anión dihidropiridínico, el que se forma como resultado de un equilibrio ácido-base entre anión radical superóxido que actúa como base de Brönsted, y la 1,4-dihidropiridina, posteriormente, el anión dihidropiridínico actuaría como reservorio para reponer la 1,4-dihidropiridina que se está oxidando a piridina en un proceso que duraría en total 6 horas aproximadamente.

SUMMARY

In this Thesis the reactivity of three new 1,4-dihydropyridines (1,4-DHP) with superoxide radical anion ($O_2^{\cdot -}$) was studied and the influence of substituents in the 4-position on the dihydropyridine ring was also evaluated.

These molecules also were electrochemically characterized by means of differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV), controlled potential electrolysis (CPE) and linear sweep voltammetry with rotating disc electrode (RDE). The basic electrochemical studies demonstrate that in aqueous medium the 1,4-dihydropyridines were oxidized easier at alkaline pHs than that acidic pHs. The order of easiness of oxidation was as follows: 4-HIDROXIPHENYL-DHP (4-OH-DHP) >

3-HIDROXIPHENYL-DHP (3-OH-DHP) > 4-PHENYL-DHP (DHP). This same order was observed for non-aqueous medium. The oxidation of 1,4-DHPs in both media corresponded to an irreversible process, in which the current was diffusion-controlled.

The kinetic of reaction was followed through UV-Vis spectroscopy with diode array. The kinetic rate constants on the formation of the dihydropyridinic anion were calculated by the stopped flow technique. The magnitude for the constant was: NADH > 4-OH-DHP > 3-OH-DHP > DHP.

On the other hand, the kinetic rate constants for the reaction between the radical anion superoxide and the 1,4-DHPs were calculated through kinetic continuous. Clearly, the DHPs having an hydroxyphenyl group in 4-position on the dihydropyridinic ring exhibited kinetic rate constants significantly greater than the commercial 1,4-DHPs with the following order: 3-OH-DHP > 4-OH-DHP > DHP > AMLODIPINE > NISOLDIPINE > NIMODIPINE.

The reactivity between the superoxide anion and the 1,4-DHPs occurred through a mechanism including, as first step a fast formation of the dihydropyridinic anion, which resulted from a acid-basic equilibrium between superoxide radical anion, which acts as Brönsted base, and the 1,4-dihydrophyridine. then, the dihydropyridinic anion would act like reservoir to replace the 1,4-dihydropyridine which is being oxidized to pyridine, in a 6 hours process.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día la hipertensión arterial es una de las enfermedades de mayor prevalencia en Chile y el mundo. Esta ha sido considerada por el Ministerio de Salud como factor de riesgo cardiovascular junto con la diabetes mellitus y las dislipidemias. Estos factores de riesgo en conjunto pueden desencadenar enfermedades cardiovasculares de mayor gravedad como son, el infarto agudo al miocardio, angina de pecho, entre otras; cabe destacar que las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo. [1]

Por ser la hipertensión arterial una enfermedad crónica, su tratamiento se limita, a que el paciente realice una dieta especial y se apoye farmacológicamente por el resto de su vida, con el fin de obtener valores de presión arterial aceptables y constantes. Dentro de los fármacos antihipertensivos utilizados se encuentra el grupo de las 1,4-dihidropiridinas (1,4-DHPs), las cuales poseen la propiedad farmacológica de unirse a la sub-unidad α de los canales de calcio voltaje-dependientes tipo L [2,3], regulando la entrada de calcio al citoplasma de las células musculares lisas [4]. Este mecanismo conduce a la dilatación de las arterias, provocando así una disminución de la presión arterial [5].

Se sabe que las 1,4-DHPs además de su efecto modulador de los canales lentos de calcio, exhiben una variedad de actividades biológicas, las que también contribuyen a su efecto farmacológico y clínico. Dentro de estas actividades se encuentra la regulación de calmodulina, ATPasas Ca^{2+} -dependientes, regulación de canales de calcio tanto en el retículo sarcoplásmico como en mitocondrias y la inhibición de canales de sodio [6,7]. Las 1,4-DHP también son eficaces en el tratamiento de otras patologías como asma y espasmo intestinal, entre otras [8,9].

Por otro lado, a las 1,4-DHPs se les han descrito también un efecto antioxidante [10-17]. Esta propiedad adicional puede ser importante para el tratamiento de patologías como lesión por isquemia por reperfusión, enfermedad inflamatoria vascular, arteriosclerosis y trauma en el sistema nervioso central [18]. Prabha *et al* [19] han sugerido una relación causal entre hipertensión y daño por radicales libres, como también una muy buena relación entre agentes antihipertensivos y

antioxidantes. El posible efecto antioxidante, en combinación con el carácter lipofílico y la alta afinidad de la 1,4-DHP por los receptores de los canales de calcio, serían las bases de la actividad protectora en patologías que involucran radicales libres, que al parecer acompañan en muchas instancias a la hipertensión y también a enfermedades del sistema nervioso central.

El efecto antioxidante de las 1,4-DHP ha sido estudiado en modelos biológicos (membranas) para investigar procesos de lipoperoxidación. Mak [13] ha reportado el efecto citoprotector de 1,4- DHP frente a la proliferación de células endoteliales en sistemas con daño por radicales libres, usando el ensayo de azul de tetrazolio. También se ha reportado que las 1,4-DHP tienen actividad antilipoperoxidante en membranas, usando mediciones de TBARS (ácido tiobarbitúrico, un producto de degradación de las membranas celulares) [20,21] o el método de “aclaramiento” de Crocina [22]. Las propiedades redox de ciertos compuestos han sido usadas para respaldar su efecto antioxidante sin utilizar su reactividad directa frente a radicales libres [23].

Los mecanismos que darían cuenta del potencial efecto antioxidante de estas moléculas, son los siguientes:

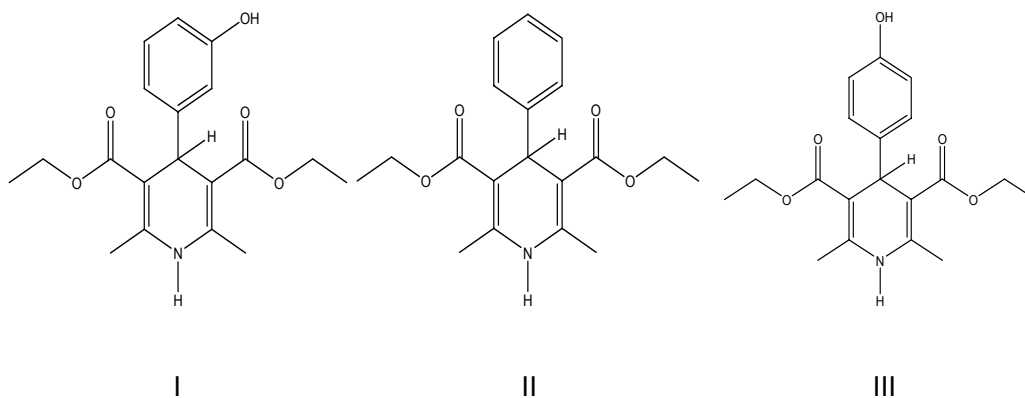
- Mecanismos que involucran transferencia de electrones y/o carga.
- Transferencia de electrones, desde la 1,4-DHP hacia la especie radicalaria.
- Transferencia de un átomo de hidrógeno, desde la 1,4-DHP hacia una especie radicalaria.
- Mecanismo asociado al bloqueo de los canales lentos de Ca^{2+} .
- Es conocido que el sistema calcio-calmodulina modula la actividad de una serie de enzimas que participan en los procesos que generan estrés oxidativo. En consecuencia, los compuestos 1,4-DHP al impedir la entrada de calcio a la célula bloquean estos procesos.

En relación con los efectos antioxidantes de 1,4-DHP, los trabajos realizados hasta ahora revelan que éstos no dependen del efecto bloqueador de canales de calcio, puesto que estudios efectuados en sistemas *in vitro* que carecen de dichos canales, han mostrado que el efecto antioxidante persiste [24].

A raíz de la imperiosa necesidad de obtener moléculas con buena capacidad antioxidante, con el fin de evitar los trastornos ocasionados por estos, las modificaciones estructurales que hemos querido incorporar a nuestras moléculas (manteniendo intacto su farmacóforo y por lo tanto su acción terapéutica), persiguen proporcionar dichas propiedades antioxidantes sin alterar las propiedades farmacológicas propias de estos compuestos, obteniendo así, fármacos con mayores beneficios para las pacientes.

A modo de ejemplo, en estudios sobre 1,4-DHP con diferentes sustituyentes en posición 1 y 4, se ha observado que los cambios en estas posiciones afectan notoriamente el efecto antagonista de canales de calcio. Así, por ejemplo, al reemplazar el protón de la posición 1 por grupos alquilo, el efecto bloqueador de canales de calcio se anula completamente. De la misma forma, si en posición 4 se reemplaza el grupo arilo por grupos menos voluminosos como un grupo metilo, se obtienen compuestos agonistas de canales de calcio; esto es, aumentan la entrada de calcio al citoplasma y por lo tanto producen contracción vascular y un aumento de la presión arterial [25].

En la presente Memoria se estudiaron tres nuevas moléculas de la familia de las 1,4-dihidropiridinas, las que fueron sintetizadas en nuestro laboratorio mediante una variación de la síntesis de Hantzsch [26-28], a las cuales se les respetó el farmacóforo dihidropiridínico y se les incorporó un sustituyente fenilo o hidroxifenilo, en la posición 4 del anillo dihidropiridínico (figura 1).



<u>NOMBRE I.U.P.A.C. DEL COMPUESTO</u>	<u>MOLECULA</u>
4-(3-HIDROXIFENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA	I
4-(FENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA	II
4-(4-HIDROXIFENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA.....	III

Figura 1: Estructura química de las 1,4-DHPs estudiadas.

El objetivo que persiguen estas sustituciones en particular, es incorporar un grupo hidroxifenilo y evaluar su capacidad atrapadora de radicales libres.

Los radicales libres son especies muy reactivas, debido a que poseen un electrón desapareado y están asociadas a daño celular a nivel de ADN, lípidos y proteínas, lo que se podría traducirse en un gran número de enfermedades, como por ejemplo en procesos inflamatorios [6,7], enfermedad de Parkinson [8, 9,25], artritis reumatoídea [25], isquemia y daño por reperusión en el corazón y envejecimiento [29,30], entre otras.

Los radicales libres de mayor relevancia biológica son las especies reactivas del oxígeno (ROS), entre los que destacan el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), ya que éstos se generan a partir del propio metabolismo de los organismos que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones, para la producción energética. En la presente Memoria se estudiará la reactividad de estas nuevas 1,4-dihidropiridinas frente al anión radical superóxido, debido a que este es el de mayor abundancia en los sistemas biológicos, pero no el único, y su generación puede deberse tanto a procesos enzimáticos como no enzimáticos. (Figura 2), pese a que el organismo tiene su propio sistema de eliminación de este radical, se cree que este se puede ver sobrepasado como por ejemplo en periodos de estrés.

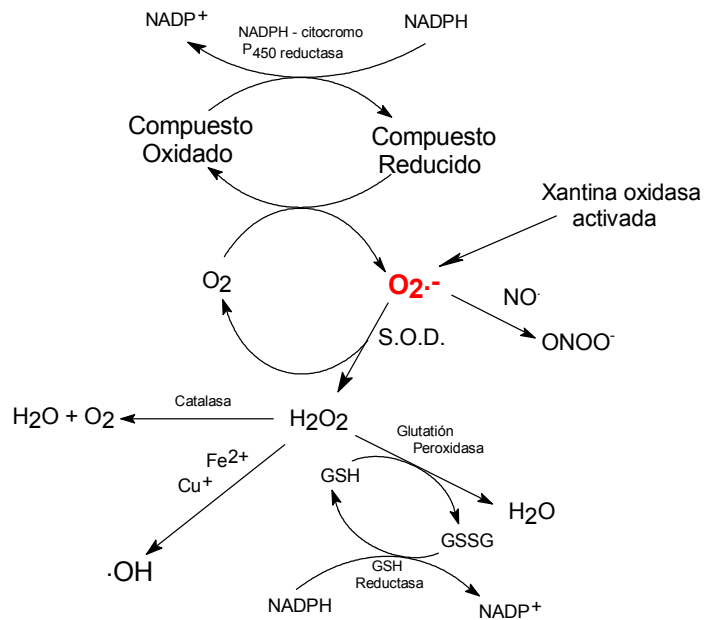
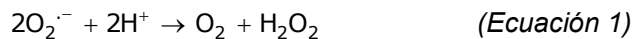


Figura 2: Mecanismos de generación de ROS en el organismo

El estudio de la reactividad de las dihidropiridinas frente a anión radical superóxido se realizó en medio aprótico (dimetilsulfóxido) debido a que este medio le otorga mayor estabilidad a las soluciones de este radical, puesto que es bien sabido que el anión radical superóxido sufre dismutación en medio prótico [35]:



Las reactividades de estas nuevas moléculas se compararan con 1,4-dihidropiridinas actualmente en uso en clínica como lo son: nimodipino, amlodipino y nisoldipino.

Los mecanismos involucrados en las oxidaciones electroquímicas, ya sea en medio acuoso y no acuoso de las 1,4-dihidropiridinas están bien documentados [36], no así el mecanismo por el cual la 1,4-dihidropiridina se oxida al reaccionar con el anión radical superóxido, el cual será el propósito primordial de este trabajo.

HIPOTESIS DE TRABJO

Se espera que la inclusión de un grupo hidroxifenilo en la posición 4 del anillo dihidropiridínico genere compuestos con propiedades antioxidantes.

En consecuencia, se espera que existan diferencias en las velocidades y constantes de reacción para las diferentes 1,4-dihidropiridinas frente al anión superóxido. Así, los estudios de reactividad frente anión radical superóxido debieran entregar antecedentes acerca del verdadero mecanismo involucrado en la generación del derivado piridínico.

Por otra parte, se espera que tales variaciones estructurales produzcan cambios en el comportamiento electroquímico.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- ❖ Caracterizar electroquímicamente las nuevas dihidropiridinas sintetizadas y su reactividad frente a al anión superóxido, en medio aprótico.

Objetivos Específicos.

- ❖ Caracterizar el comportamiento anódico de las 1,4-DHPs en medio aprótico, utilizando electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo.
- ❖ Implementar una metodología analítica cuantitativa para evaluar los cambios de concentración de las 1,4-DHPs a fin de estudiar su interacción con el anión radical superóxido en medio aprótico.
- ❖ Determinar las constantes de velocidad (k) para cada una de las 1,4-DHPs propuestas en el estudio con anión superóxido.
- ❖ Establecer en lo posible relaciones estructura-actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y EQUIPOS

Compuestos en estudio.

Compuesto I (DHP):

4-(FENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA

Formula Global: $C_{19}H_{23}NO_4$

PM: 329.4 g/mol

Compuesto II (3-OH-DHP):

4-(3-HIDROXIFENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA

Formula Global: $C_{19}H_{23}NO_5$

PM: 345.4 g/mol

Compuesto III (4-OH-DHP):

4-(4-HIDROXIFENIL)-2,6-DIMETIL-3,5-DIETOXICARBONIL-1,4-DIHIDROPIRIDINA

Formula Global: $C_{19}H_{23}NO_5$

PM: 345.4 g/mol

Compuestos de referencia.

Amlodipino

Formula Global $C_{20}H_{25}Cl_1N_2O_5$

PM: 408.8 g/mol

Nisoldipino

Formula Global $C_{20}H_{24}N_2O_6$

PM: 389.2 g/mol

Pureza: 97%

Nimodipino

Formula Global $C_{21}H_{26}N_2O_7$

PM: 418.15 g/mol

Pureza: 97%

β -nicotinamida adenina di-nucleótido, forma reducida, sal disodica

Formula Global: $C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$

PM: 709.4 g/mol

Pureza: 97%

Reactivos y Solventes.

3-aminocrotonato de etilo 99%, Aldrich.

4-hidroxibenzaldehido 98%, AlfaAesar.

3-hidroxibenzaldehido 97%, AlfaAesar.

Benzaldehido > 99%, Merck.

Ácido bórico (99%) p.a., Fluka Chemica.

Ácido clorhídrico (36%) p.a., Reutter.

Ácido fosfórico (85%) p.a., Merck.

Agua purificada para HPLC (Milli-Q).

Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a., Merck.

Dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6) Sigma.

Etanol absoluto (99,8%) p.a., Merck.

Éter Corona 18, Aldrich.

Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HFFTBA) $\geq 98\%$, Fluka

Hidróxido de sodio (pellets), Merck.

β -nicotinamida adenina di-nucleótido, forma reducida. Sigma.

Nitrógeno extra puro, AGA.

N,N-dimetilformamida (DMF) p.a., Merck.

Superóxido de potasio (KO_2), Aldrich.

Hidróxido de tetra-n-butilamonio 0.1M, Merck.

Tampones.

Britton Robinson 0.04 M.

Material de vidrio.

Todo el material de vidrio utilizado fue clase A. (ámbar para los productos de síntesis).

Equipos.**Equipos usados para el análisis de productos de síntesis:**

Espectroscopia NMR: espectrómetro Bruker Avance DRX 300.

FT-IR: espectrómetro Bruker IFS 55 Equinox.

Análisis elemental: Fisons Instrument.

Equipos de uso general

Balanza de precisión Precisa 40SM-200^a (sensibilidad 0,01 mg).

Sonicador Branson Branson 2210.

Medidor de pH WTW modelo pMx 3000.

Agitador magnético Heidolph MR 3002.

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

Sistema voltampérométrico y computacional:

Analizador voltamétrico BAS CV-50W y BAS CV-100W.

Celda electroquímica BAS (10 mL) protegida de luz.

Electrodo de trabajo: electrodo de carbón vítreo (BAS MF-2070).

Electrodo auxiliar: platino BAS MW-1032.

Electrodo de referencia: Ag/AgCl BAS RE-5B.

PC Pentium II Gateway para adquisición y tratamiento de datos.

Sistema espectroscópico UV-vis:

Espectrofotómetro UV-vis CHEMSTATION diode array.

Software 845X UV-Visible System.

Copyright Agilent Technologies 95-03 para tratamiento y adquisición de datos.

Sistema de flujo retenido.

Applied photophysics Rx 1000 Rapid kinetics Spectrometer Accessory.
Volumen de inyección 150µL de cada reactante.

Equipo de toma de punto de fusión:

Electrothermal 9200

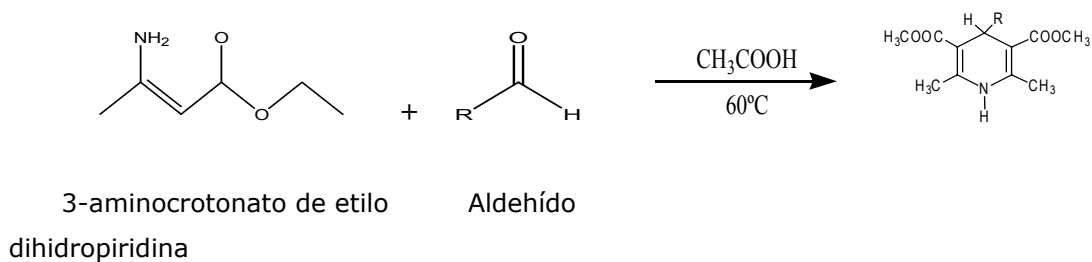
Baño termostático.

Equipo HAAKE K15

Métodos.

Síntesis de compuestos.

La síntesis de estos compuestos se realizó por una variante del método de Hantzsch [56-58] de acuerdo a la figura 3:



$R_1 = 4\text{-hidroxifenil}$; $R_2 = 3\text{-hidroxifenil}$; $R_3 = \text{fenil}$

Figura 3: Variante de la síntesis de Hantzsch.

Procedimiento general: Se mezclaron 27mL de 3-aminocrotonato de etilo y 10mL del aldehído correspondiente, según el producto que se desee sintetizar (benzaldehído para la 4-fenil-DHP, 3-hidroxibenzaldehído para la 3-OH-DHP, 4-hidroxibenzaldehído para la 4-OH-DHP), en 30mL de ácido acético glacial, se mantienen a 60°C con agitación durante 8 horas. La

solución resultante fue filtrada al vacío, el producto se lava con abundante agua, luego se procede a filtrar en caliente con etanol y carbón activado al menos tres veces. Los rangos de punto de fusión fueron: 158-160°C, 188-191°C, 232-235°C, para la DHP, 3-OH-DHP y 4-OH-DHP, respectivamente.

Preparación de las soluciones de trabajo.

Soluciones de 1,4-DHPs.

Se prepararon soluciones stock de cada 1,4-DHP, con una concentración de 0,001 M en DMSO. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución de la solución stock hasta obtener la concentración deseada. Estas soluciones se mantuvieron refrigeradas a -20°C y protegidas de la luz para evitar su descomposición.

Soluciones tampón Britton Robinson 0,04 M.

Se preparó con 100 mL de solución de ácido bórico 0,4 M, 100 mL de solución de ácido acético 0,4 M, 100 mL de solución de ácido fosfórico 0,4 M, enrasando a un volumen de 1 L con agua destilada.

Solución de anión radical superóxido

Se prepararon soluciones de superóxido de potasio 0.1M en dimetilsulfoxido con éter corona, de acuerdo al siguiente procedimiento: se pesaron 71.1 mg (1mmol) de KO_2 en polvo y 500-800 mg (2-3 mmol) de éter corona/18-corona-6 y se colocaron en un matraz seco, al cual se adicionaron 10 mL de DMSO. La mezcla fue sonicada durante 0,5-3 horas hasta obtener una solución de color amarillo pálido. A partir de esta solución madre, se prepararon diferentes soluciones.

Caracterización electroquímica.

Voltamperometría.

Para voltamperometría de pulso diferencial (VPD) se utilizó como concentración de rutina una solución 0.1mM, y para voltametría de barrido lineal (VBL) con electrodo de disco rotatorio, las concentraciones utilizadas

fueron 1.25mM para cada 1,4-DHP. Para voltametría cíclica (VC) las soluciones de trabajo tuvieron una concentración de 1mM. Para VPD y VC se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo estacionario de carbón vítreo (área = $0,072 \pm 0,004 \text{ cm}^2$), mientras que para VBL se utilizó un electrodo de disco rotatorio de la misma naturaleza. Como contraelectrodo se usó un alambre de platino y todos los potenciales fueron medidos frente a un electrodo de Ag/AgCl. Todas las 1,4-DHPs fueron caracterizadas en la región anódica entre 0 y 1500mV aproximadamente.

Medio acuoso: para este medio todos los compuestos fueron disueltos en tampón Britton Robinson (0,04 M) / etanol, 70/30. El pH del medio se ajustó adicionando alícuotas de NaOH o HCl concentrado.

Medio aprótico: se utilizó como solvente dimetilsulfoxido y como electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HFFBTA) 0,1 M.

Electrólisis a potencial controlado (EPC).

Se realizaron en medio aprótico (dimetilsulfóxido + HFFBTA 0.1M) con una concentración 0.1mM de las 1,4-DHPs en un volumen total de 30ml. Se utilizó una celda, con una malla de carbón vítreo reticulado como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia el potencial utilizado fue 1200mV para todos los compuestos.

Cálculo del número de electrones.

Estos estudios se basaron en la electrólisis exhaustiva a potencial controlado de los tres compuestos. Para el cálculo del número de electrones se estimó la sumatoria de las cargas finales (con corrección de la carga basal) de electrólisis sucesivas. Desde la carga total neta y empleando la ecuación de Faraday (ecuación 2) se calculó el número de electrones transferidos por mol de 1,4- DHP.

$$Q_{neta} = n F e \quad (\text{Ecuación 2})$$

Ecuación de Faraday, n = número de moles, F = constante de Faraday (96500 C / mol) y e = número de electrones.

Reactividad de las 1,4-DHPs frente a anión radical superóxido mediante espectroscopía UV- Visible.

Los rangos de concentraciones de utilizadas en las cinéticas, se determinaron en forma experimental, obteniéndose así, las condiciones óptimas de trabajo, en cuanto a la magnitud de señales que permitieran visualizar con claridad la evolución de los experimentos cinéticos.

Curvas de calibración

Para poder seguir los cambios producidos en la concentración del anión dihidropiridínico en el tiempo, se debieron realizar curvas de calibración para cada uno de estos aniones de la siguiente manera: se prepararon 5 soluciones de distintas concentraciones ($1 \times 10^{-4} \text{M}$, $7.5 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-5} \text{M}$, $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$, $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$), de cada 1,4-DHP, luego, a cada una de estas soluciones se le adicionó un exceso medido de hidróxido de tetrabutilamonio (OHBTM), con el fin de desplazar todo el equilibrio hacia la formación del anión y de manera cuantitativa, y por esto como toda la 1,4-DHP se transformó en anión, se consideró que las concentraciones iniciales de las soluciones de 1,4-DHPs inmediatamente después de la adición de la base eran iguales a la del anión formado, luego se graficó la concentración del anión versus absorbancia y de la pendiente de este gráfico se obtuvo el coeficiente de absorbilidad molar. De esta manera se lograron obtener los coeficientes de absorbilidad molar de todas las 1,4-DHPs y de sus respectivos aniones.

Cinéticas para la determinación de constantes de velocidad de la reacción entre anión radical superóxido y las 1,4-DHPs.

Para la determinación de los derivados piridínicos de las 1,4-DHPs, producto de su interacción con el anión radical superóxido, se procedió de la siguiente manera: a 3.5mL de la solución 0,1mM de 1,4-DHP en una cubeta con agitación, se le adicionaron 60 μ L de la solución stock de

KO₂ 0.1M, resultando una concentración de superóxido 0.0017M en la cubeta, Las constantes de la serie se compararon con las constantes de 1,4-DHPs comerciales de actual uso en clínica: amlodipino, nisoldipino, nimodipino, obtenidas de la misma manera.

Condiciones experimentales: se siguió el curso temporal de la reacción por 21600 segundos, la toma de espectros fue cada 600 segundos. Los espectros se registraron entre $\lambda = 200$ y 600 nm. Se controló la temperatura a 20°C, con un baño termostático conectado a la celda.

Determinación de la constante de velocidad de formación del anión 1,4-dihidropiridínico mediante la técnica de flujo retenido.

Para este efecto se utilizaron distintas concentraciones de las 1,4-DHPs 0.0083mM, 0.0125mM, 0.0250mM y 0.05mM de cada una en DMSO frente a una única concentración de KO₂ en DMSO 0.5mM. El curso temporal de la reacción de formación del anión se realizó acoplado un equipo de flujo retenido, de modo de inyectar en la cubeta volúmenes iguales de los reactantes y efectuar inmediatamente la medición inicial de reacción. Es importante destacar que todas las soluciones utilizadas en el equipo de flujo retenido deben ser preparadas al doble de la concentración deseada en la cubeta, debido a la dilución producida.

Condiciones experimentales: Se siguió el curso temporal de la reacción por 200 segundos, la toma de espectros fue cada 10 segundos, los espectros se registraron entre 200 y 600 nm. Se controló la temperatura a 20°C, con un baño termostático conectado a la celda.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización electroquímica.

Voltamperometría de pulso diferencial (VPD) en medio acuoso y aprótico.

Los voltamperogramas mostraron en general picos bien resueltos, como se aprecia en las figuras 4 Y 5. En medio aprótico sólo se observa una señal de oxidación (Figura 4), en cambio en medio acuoso las 1,4-DHPs con sustituyentes hidroxifenilo (3-OH y 4-OH) presentan dos señales (Figura 5). Una de estas señales puede ser atribuida a la electro-oxidación del núcleo dihidropiridínico y la otra, al grupo hidroxifenilo presente en ellas. Los valores de potencial de oxidación en ambos medios se muestran en la tabla 1.

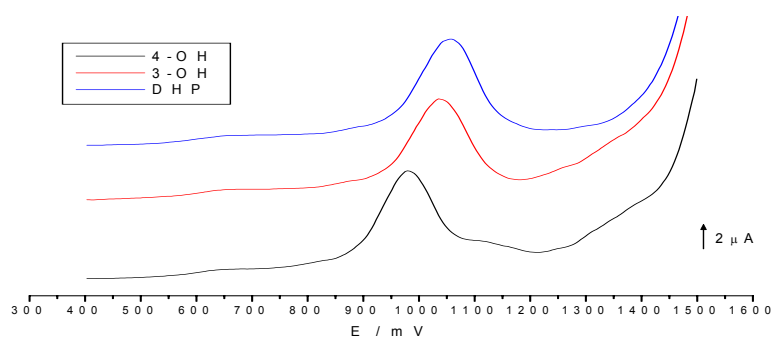


Figura 4: VPD Medio aprótico (Dimetilsulfóxido + HFFTB 0.1M)

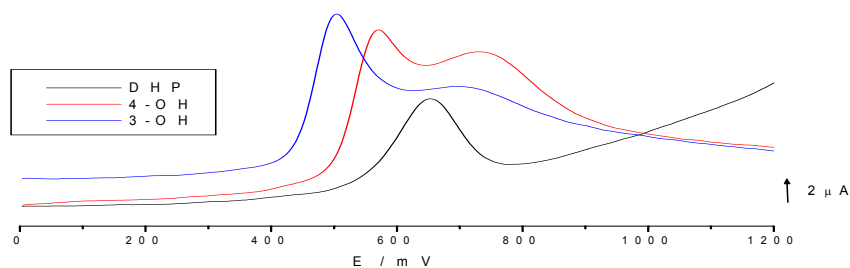


Figura 5: VPD a pH 7.4 en medio acuoso (Buffer B.R./ ETOH 70/30).

Tabla 1: Potenciales de Electro-oxidación para la serie en medio aprótico (DMSO+HFFTBA 0.1M) y en medio acuoso (Buffer B.R./ ETOH 70/30).

	4-OH-DHP	3-OH-DHP	DHP
Potencial / mV Medio aprótico	978	1038	1058
Potencial / mV Medio acuoso	500 y 700	562 y 730	646

Claramente el orden de facilidad de oxidación en ambos medios es el mismo, 4-OH-DHP >3-OH-DHP > DHP. Este orden podría ser explicado por la influencia que ejercería el sustituyente hidroxifenilo sobre el anillo dihidropiridínico. Así, el sustituyente 3-hidroxifenilo actúa como grupo atractor de electrones, en comparación con el 4-hidroxifenilo, disminuyendo la densidad electrónica en el carbono al cual está unido el anillo dihidropiridínico que es el centro de reacción, desfavoreciendo la electro-oxidación. Por otra parte, el sustituyente 4-hidroxifenilo aumenta la densidad electrónica y en consecuencia favorece más la oxidación que el 3-hidroxifenilo, esto es, los potenciales de oxidación de este compuesto son menos anódicos (menos positivos). Los estudios del efecto del pH sobre la electro-oxidación de los derivados se muestran en la figura 6. A partir de éstos, se desprende que el potencial de electro-oxidación es dependiente del pH a lo largo de todo el rango, observándose tres zonas de quiebre, lo que indica que pueden estar ocurriendo distintos mecanismos de transferencia de protones o electrones, dependiendo de la zona de pH. Este comportamiento se observa en las tres moléculas, indicando que en la electro-oxidación existe una transferencia de protones, que influye en la etapa determinante de la velocidad. En la Tabla 2, se muestran las pendientes de cada quiebre para la señal de oxidación del anillo dihidropiridínico y de la segunda señal que corresponde a la oxidación del grupo hidroxifenilo, las pendientes cercanas a 60 indican la transferencia de un protón por cada electrón.

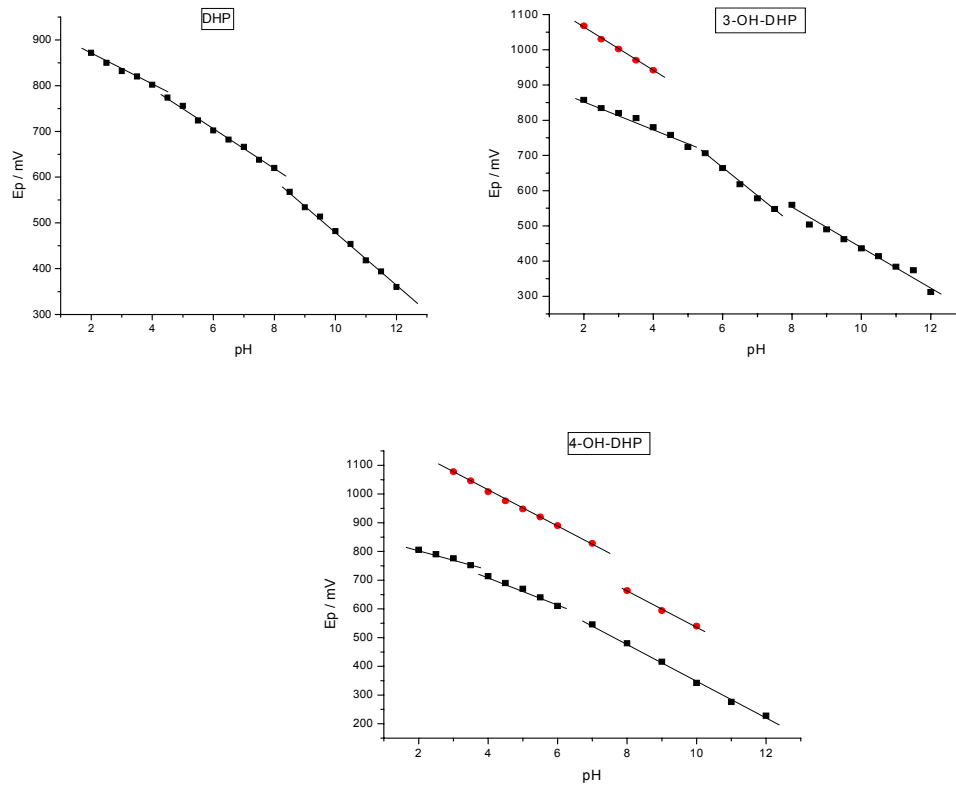


Figura 6: Influencia del pH en el potencial de pico en medio acuoso (Buffer B.R./ ETOH 70/30).

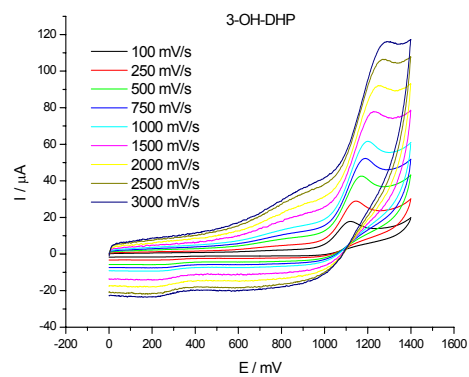
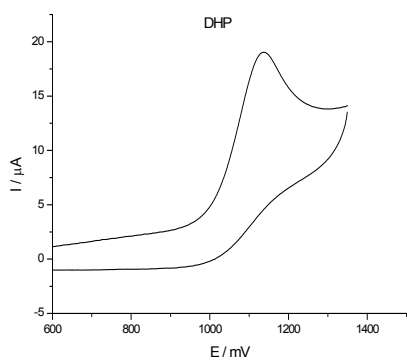
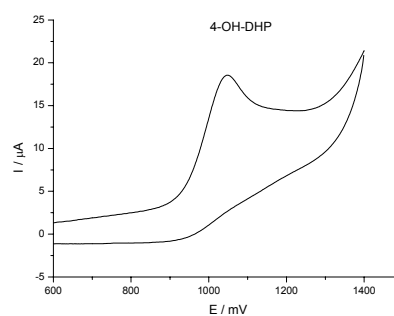
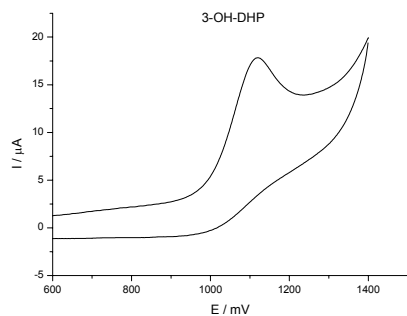
Tabla 2: Valores de pendientes de los quiebres en las distintas zonas de pH en medio acuoso

	Compuesto	Zona 1, (mV / pH)	Zona 2, (mV / pH)	Zona 3, (mV / pH)
SEÑAL 1	DHP	37	44	59
	3-OH-DHP	35	51	65
	4-OH-DHP	42	80	54
SEÑAL 2	DHP	-----	-----	-----
	3-OH-DHP	61	62	
	4-OH-DHP	64	-----	-----

*zona 1 = pH 2-4, zona 2= pH 4-8, zona 3= 8-12

Voltamperometría cíclica en medio aprótico.

Los compuestos presentaron una señal anódica irreversible a todas las velocidades de barrido ensayadas entre 0,1 y 3,0 V/s (Figura 7). Los gráficos $\log ip$ vs $\log v$ mostraron pendientes cercanas a 0,5 (Figura 8); indicando que la corriente está controlada por difusión. Los potenciales de oxidación fueron dependientes de la velocidad de barrido (Figura 7), sustentando el carácter irreversible de la oxidación de estas moléculas en este medio [36].



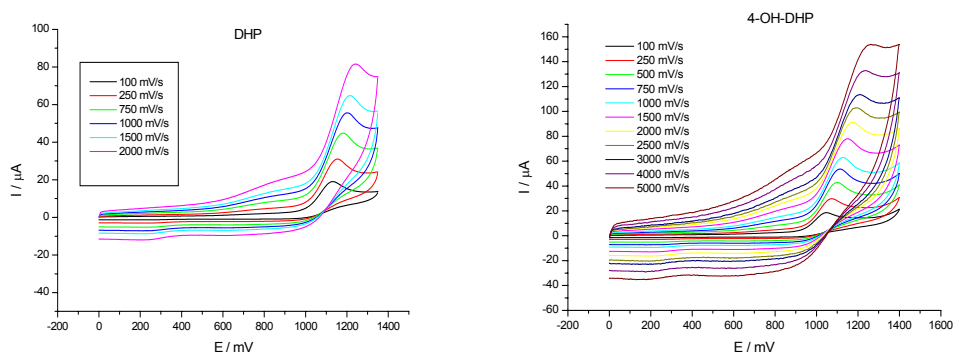
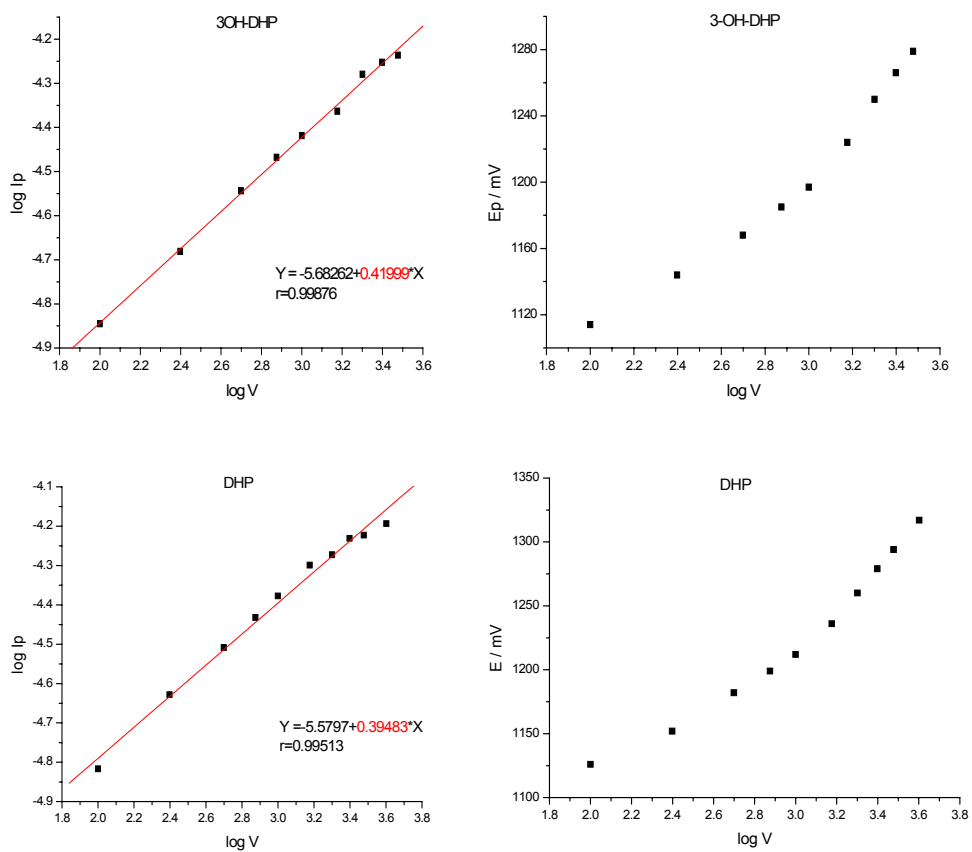


Figura 7: Voltamperogramas cíclicos de las tres moléculas en medio aprótico, se aprecia la señal de carácter irreversible.



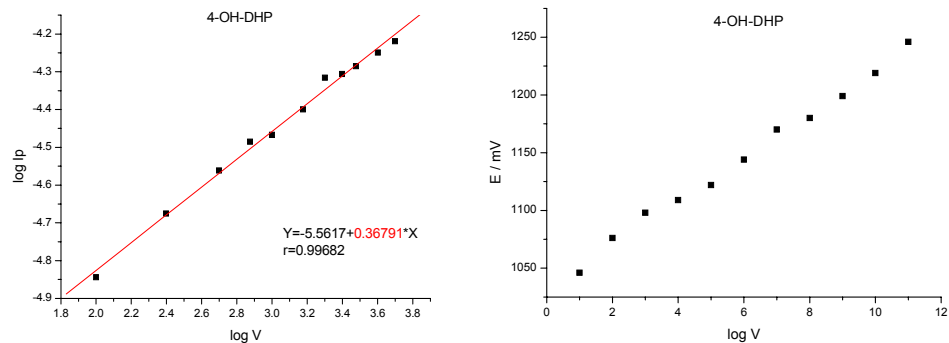
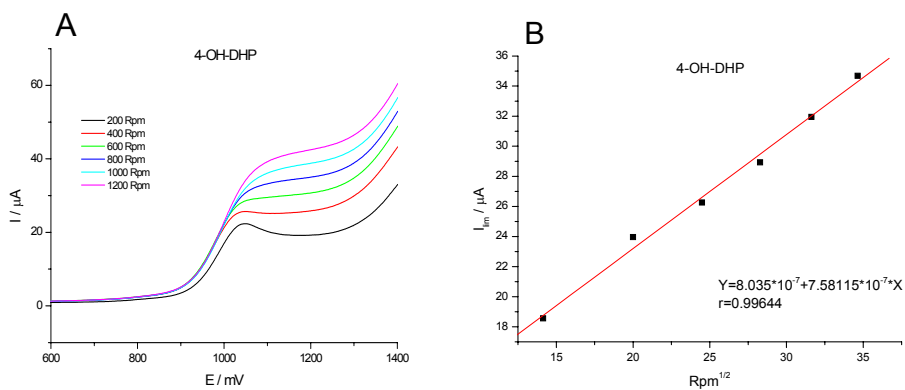


Figura 8: (VC) Dependencia de $\log i_p$ con $\log V$, Dependencia del potencial de pico con $\log V$

Voltamperometría de barrido lineal (VBL) con electrodo de disco rotatorio en medio aprótico.

Con el fin de obtener los coeficientes de difusión de los compuestos, se estudió el comportamiento de la corriente límite con la velocidad de rotación. Los resultados de estos estudios se representaron de acuerdo a Levich [34], esto es, se graficó la corriente límite vs la raíz de la velocidad de rotación del electrodo. Tal como se observa en la Figura 9, se obtuvieron dependencias lineales para todos los compuestos, tal como lo predice la respectiva ecuación de Levich para un control difusivo.



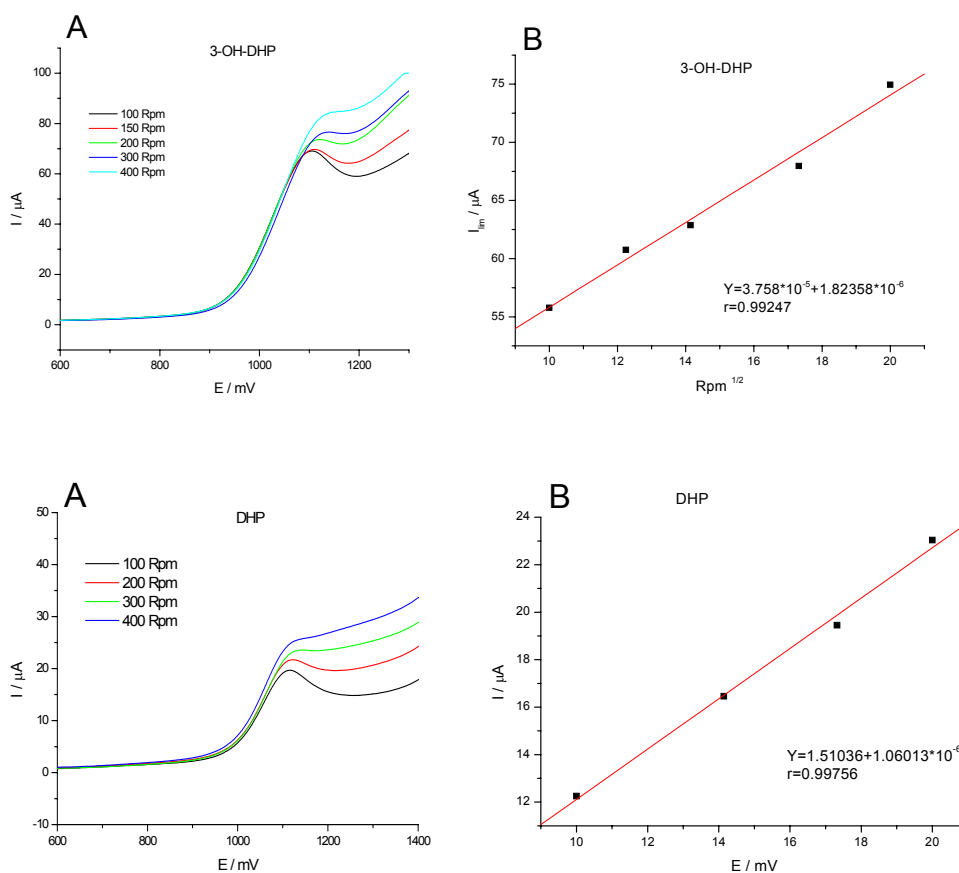


Figura 9: A: Voltamperogramas lineales a diferentes velocidades de rotación del electrodo, B: Dependencia de la corriente límite con la raíz de la velocidad de rotación. Condiciones: 5mM en dimetilsulfoxido+hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0,1 M.

Electrólisis a potencial Controlado (EPC) en medio aprótico.

Estos estudios coulombiométricos se efectuaron para determinar el número de electrones involucrados en el proceso de electro-oxidación. Soluciones que contenían una cantidad exactamente pesada de cada 1,4-DHP fueron sometidas a electrólisis a un potencial constante (DHP= 1200 mV, 3-OH-DHP= 1200 mV y 4-OH-DHP=1200 mV) de 45 minutos inicialmente y luego por 10 minutos hasta obtener valores de carga constantes (figura 10). A partir de la sumatoria de todas las cargas finales netas y empleando la ecuación de Faraday, se calculó el número de electrones para cada 1,4-DHP (tabla 3).

Tabla 3: N° de electrones de las 1,4-DHP involucrados en el proceso de electro-oxidación.

Compuesto	DHP	3-OH-DHP	4-OH-DHP
N° electrones	2	3	3

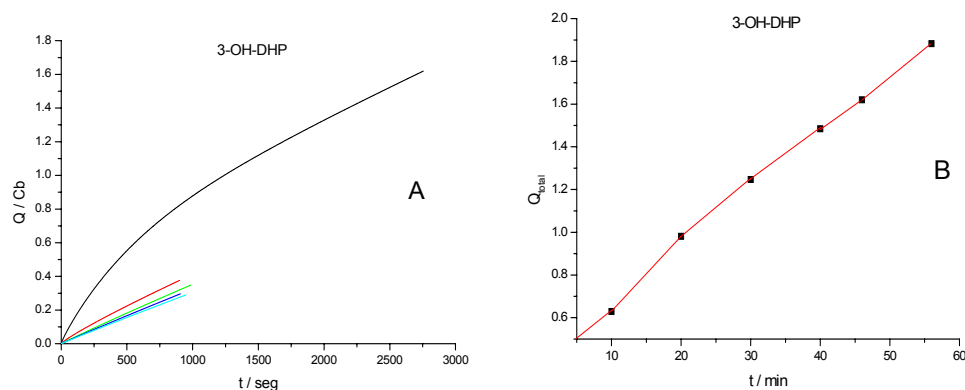


Figura 10: Electrólisis a potencial controlado, A: carga a distintos tiempos de electrolisis (curva negra: 45 min. y curvas de colores: cada 10 minutos), B: Carga total v/s tiempo (Solución de 3-OH-DHP $5 \times 10^{-4} M$).

Cálculo del coeficiente de difusión.

Los coeficientes de difusión (tabla 4), fueron calculados por medio de la ecuación de Levich (ecuación 3), utilizando los datos obtenidos con disco rotatorio y las electrólisis a potencial controlado.

$$I_{lim} = 0.2 \cdot \eta \cdot F \cdot A \cdot D^{2/3} \cdot \nu^{-1/6} \cdot Rpm^{1/2} \cdot C^{\circ} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde: η = número de electrones, F = constante de Faraday (95600 C/mol), A = área del electrodo (0.0707 cm^2), D = coeficiente de difusión (cm^2/s), Rpm = velocidad de rotación, ν = viscosidad cinemática del solvente ($0.01817 \text{ cm}^2/\text{s}$), C° = concentración de la solución en mol/cm^3 .

Tabla 4: Coeficientes de difusión en medio aprótico (dimetilsulfóxido).

	DHP	3-OH-DHP	4-OH-DHP
Coeficiente de Difusión (cm ² / s)	2.813x10 ⁻⁶	3.09x10 ⁻⁷	2.34x10 ⁻⁷

Reactividad frente a anión radical superóxido por espectroscopia Uv-Visible en medio aprótico.

Las 1,4-DHPs absorben alrededor de los 350 nm (Tabla 5) con coeficientes de absorbilidad molar significativamente menores que sus aniones dihidropiridínicos. Por otra parte, las 1,4-DHPs al reaccionar con anión superóxido forman el anión dihidropiridínico respectivo, el cual absorbe próximo a los 450 nm. El anión radical superóxido presenta una absorción a 280 nm, la cual interfiere con la absorción de la piridina que se forma como producto final de la reacción entre las 1,4-DHPs y el KO₂. Por este motivo, no es posible cuantificar los cambios de concentración de la 1,4-DHPs, ni de la piridina formada como producto final de la reacción. En otras palabras, debido a que la señal del anión superóxido, ya sea por la longitud de onda donde absorbe o por el ancho de la banda que solapa a las otras bandas, no es posible seguir dichas señales. Sin embargo, la banda de absorción del anión dihidropiridínico, que aparece a valores de longitud de onda mayores, permite realizar curvas de calibración y por lo tanto, cuantificar los cambios temporales de concentración de dicha especie.

En conclusión, debido a estas complejidades experimentales se ha implementado una nueva metodología para determinar la constante de velocidad cinética, para la reacción entre las 1,4-DHPs y el anión radical superóxido. Esta nueva metodología se basa en los siguientes hechos experimentales: (a) al agregar el anión radical superóxido a una solución de 1,4-DHP, se observa la formación de una nueva especie que absorbe aproximadamente a 450 nm. Esta especie corresponde a la formación de la especie aniónica de la DHP, como consecuencia de una reacción ácido-base entre el radical y la 1,4-DHP [35]. En consecuencia, el anión radical superóxido se comporta como una base fuerte, que actúa abstrayendo el protón de la posición 1 en las 1,4-DHPs.

(b) Por otra parte, se observa que después de alcanzado el equilibrio ácido-base entre la 1,4-DHP y su respectivo anión, la banda correspondiente a éste (450 nm aprox.) decae significativamente en el tiempo (fue seguido por 6 horas), mientras que la banda de la 1,4-DHP (aproximadamente a 350 nm) se mantiene prácticamente constante.

(c) Por lo tanto, se puede inferir que la caída en la absorbancia del anión DHP se produce como consecuencia de la reposición del equilibrio hacia la formación de la 1,4-DHP, la que a su vez está siendo oxidada a piridina. De esta manera, podemos asumir que la velocidad de desaparición del anión DHP es indirectamente, la velocidad de oxidación de las 1,4-DHPs a sus respectivos derivados piridínicos.

Además se confirmó experimentalmente, que el anión dihiropiridínico no reacciona directamente con el anión radical superóxido. Para este experimento se procedió de la siguiente manera: en primer lugar se formó el anión 1,4-DHP adicionando una base (OHBTA) a la solución de 1,4-DHP formándose así, una solución de anión 1,4-DHP. En segundo lugar, a esta solución de anión 1,4-DHP se le adicionó anión radical superóxido, tras lo cual no se observó cambio alguno en la banda correspondiente al anión 1,4-DHP, quedando esta completamente inalterada (Figura 11).

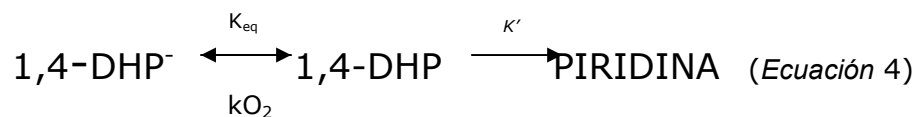
Cabe destacar que se utilizaron concentraciones de anión radical superóxido en exceso frente a la 1,4-DHP (60 veces), con el fin de obtener condiciones de *pseudo-primer* orden, es decir, la concentración de anión radical superóxido empleada es muy superior en comparación con la de 1,4-DHP. Se estableció experimentalmente que la concentración del radical durante el tiempo que dura el experimento se mantuvo prácticamente inalterada. En consecuencia, la constante de velocidad de la reacción está dada en función de la concentración de 1,4-DHP (ecuación 3).



$$\frac{d[\text{Piridina}]}{dt} = k [\text{DHP}]^n [\text{O}_2^{\cdot-}]^m \quad , \text{ quedando entonces:}$$

$$\frac{d[\text{Piridina}]}{dt} = k'[\text{DHP}], \text{ en que } k' = k [\text{O}_2^{\cdot-}]^m$$

Desde el punto de vista cinético se puede afirmar que nuestro sistema experimental puede ser descrito mediante las siguientes ecuaciones:



C= Piridina

$$\frac{dc}{dt} = k' \text{DHP}$$

$$\text{DHP} = K_{eq} \text{DHP}^-$$

$\frac{dc}{dt} = k' K_{eq} \text{DHP}^-$, Suponiendo que la $[\text{DHP}]$ es pequeña comparada con $[\text{DHP}^-]$ y $[\text{Piridina}]$, entonces queda:

$$\frac{dc}{dt} = - \frac{d\text{DHP}^-}{dt}$$

$$-\frac{d\text{DHP}^-}{dt} = k' K_{eq} \text{DHP}^-$$

$$-d\text{DHP}^- = k' K_{eq} \text{DHP}^- dt$$

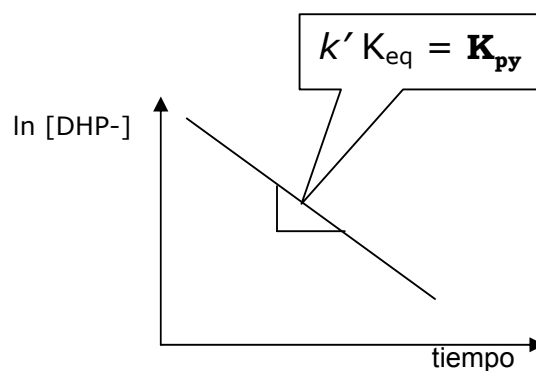
$$\frac{-d\text{DHP}^-}{\text{DHP}^-} = k' K_{eq} dt,$$

Integrando:

$$- \int \frac{d\text{DHP}^-}{\text{DHP}^-} = \int k' K_{eq} dt$$

$$-\ln \text{DHP}^- = k' K_{eq} t$$

$$\ln \text{DHP}^- = -k' K_{eq} t$$



Por lo tanto, si la suposición preliminar sobre el valor $n=1$ es correcta, entonces al graficar $\ln [\text{DHP}^-]$ v/s tiempo, el gráfico debería ser una línea recta con pendiente negativa, cuyo valor de pendiente es: $k' K_{eq} = K_{py}$, a partir de la cual entonces se calcula una constante de velocidad para la

formación de piridina, que tiene implícita la constante de equilibrio de la reacción, tal como se procede en casos de mecanismos complejos que involucran un equilibrio [31].

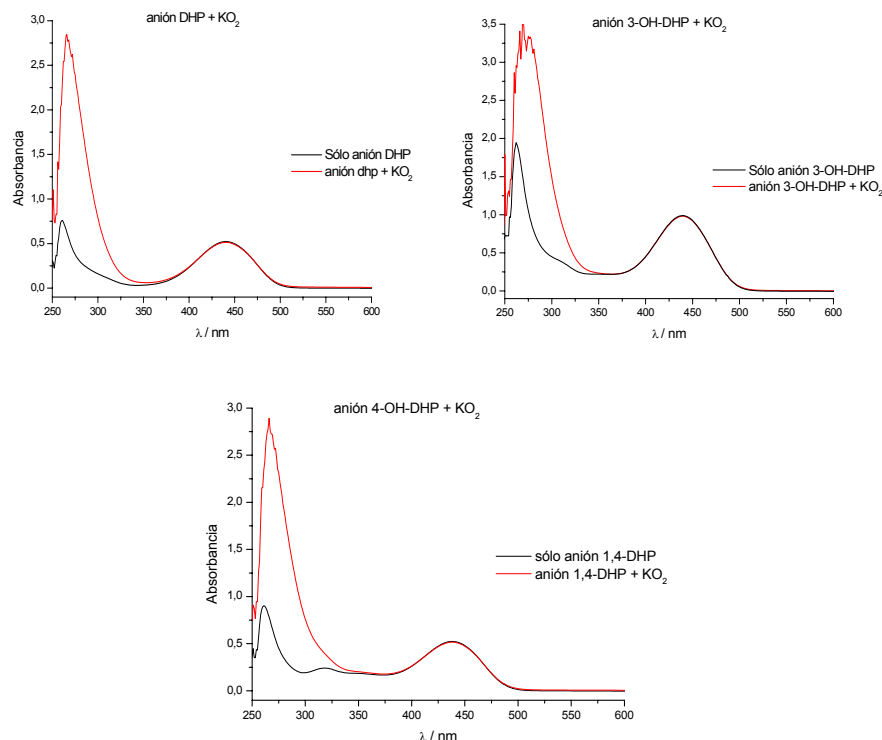


Figura 11: Espectros de los aniones 1,4 DHP antes (líneas negras) y después (líneas rojas) de la adición de KO_2

Curvas de calibración y coeficientes de extinción molar (ϵ).

Los espectros de todas las 1,4-DHPs y de sus respectivos aniones se aprecian en la figura 12.

En la Figura 13 se exhiben las diferentes curvas de calibración para los aniones de cada una de las 1,4-DHPs estudiadas. Para la obtención de los coeficientes de extinción molar de las 1,4-DHPs como tal y de sus respectivos aniones, se procedió de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos y los resultados se muestran en la tabla 5.

Se observó que los coeficientes de absorbilidad molar fueron mucho mayores para los aniones que para las 1,4-DHPs, con excepción del nisoldipino.

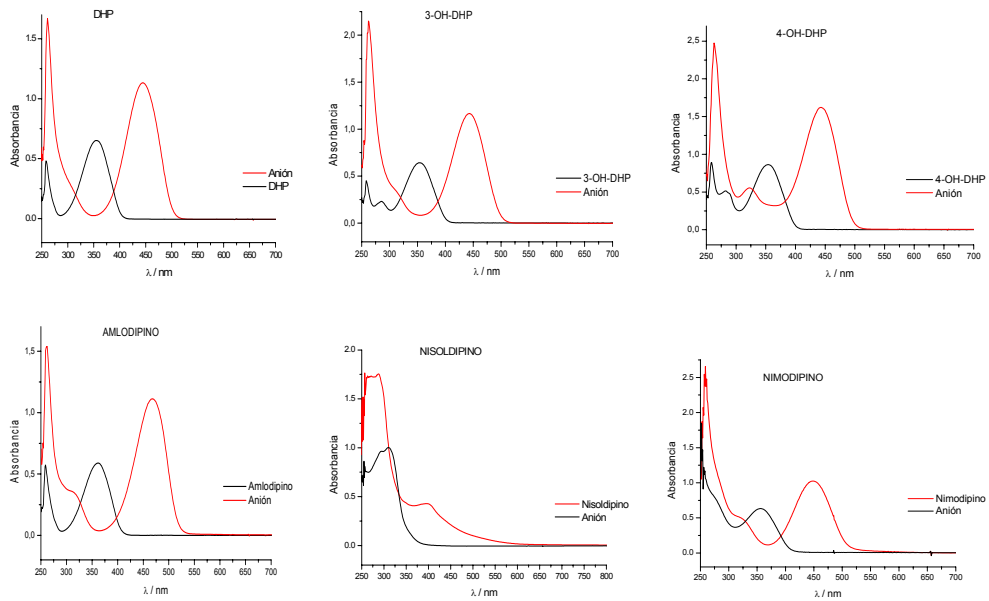
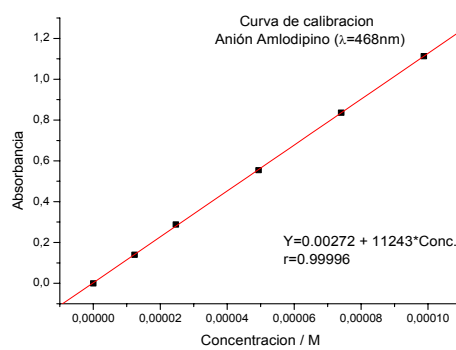
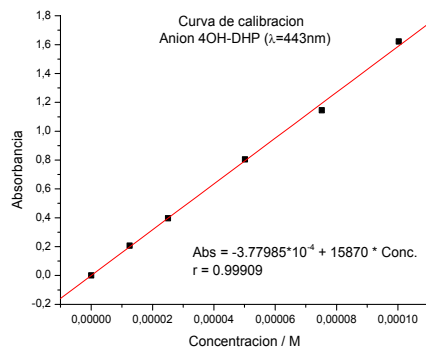
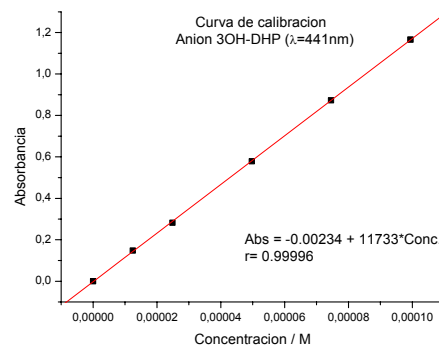
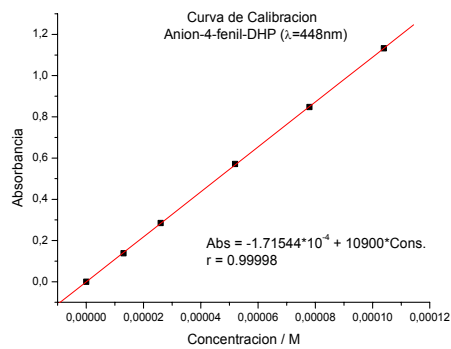


Figura 12: Espectros de todas las 1,4-DHPs y sus respectivos aniones 0.0001M



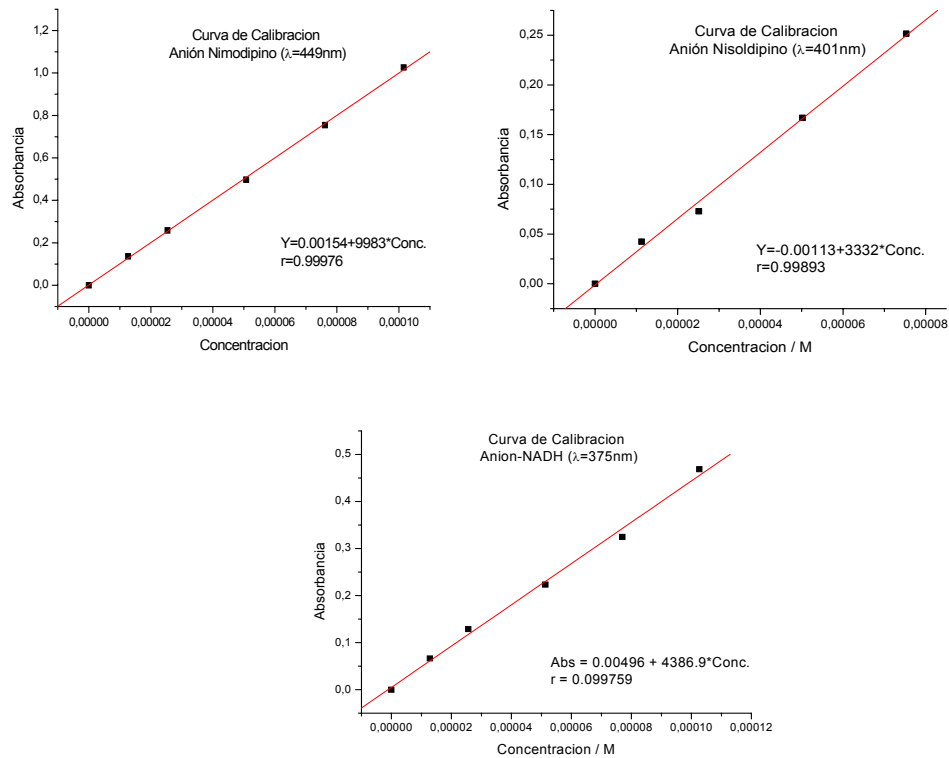


Figura 13: Curvas de calibración para los aniones de la serie y de los compuestos de referencia (amlodipino, nimodipino, nisoldipino y NADH)

Tabla 5: Coeficientes de extinción molar (ϵ), para los compuestos y sus respectivos aniones en dimetilsulfóxido.

Compuesto	$\epsilon / \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	$\epsilon / \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ del anión respectivo
DHP	6299 ($\lambda=355\text{nm}$)	10900 ($\lambda=448\text{nm}$)
3-OH-DHP	6451 ($\lambda=348\text{nm}$)	11733 ($\lambda=441\text{nm}$)
4-OH-DHP	8633 ($\lambda=357\text{nm}$)	15870 ($\lambda=443\text{nm}$)
NIMODIPINO	6612 ($\lambda=356\text{nm}$)	9983 ($\lambda=449\text{nm}$)
NISOLDIPINO	9976 ($\lambda=310\text{nm}$)	3332 ($\lambda=401\text{nm}$)
AMLODIPINO	5992 ($\lambda=362\text{nm}$)	11243 ($\lambda=468\text{nm}$)
NADH	1650 ($\lambda=334\text{nm}$)	4387 ($\lambda=375\text{nm}$)

Estudio cinético para la determinación de constantes de velocidad de la reacción entre anión radical superóxido y las 1,4-DHPs.

La evolución en el tiempo, tanto de los espectros (gráfico A), como de las especies: anión y 1,4-DHP (gráfico B), se presentan, en la figura 14 para los compuestos en estudio y en la figura 15 para los de referencia. Se observa la misma tendencia de decaimiento del anión 1,4-DHP para todos los compuestos.

Los coeficientes de extinción molar de los aniones se obtuvieron a partir de las respectivas curvas de calibración. Así, los cambios de absorbancia del anión 1,4-DHP en el tiempo se transformaron en concentración, para luego graficar $\ln [DHP]$ v/s tiempo. De las pendientes de estas rectas se obtuvo la constante de velocidad tal como se muestra en la figura 16.

Como compuestos de referencia se utilizaron dihidropiridinas comerciales (amlodipino, nisoldipino y nimodipino). No se pudo incluir el NADH, ya que la banda correspondiente a su anión después de seis horas de reacción no mostró variaciones significativas, por lo tanto no se pudo obtener su constante.

Todas las 1,4-DHPs estudiadas excepto la 4-OH-DHP, mostraron el mismo comportamiento, esto es, se mantuvo prácticamente sin variaciones la banda de absorción correspondiente a la 1,4-DHP, mientras que las bandas correspondientes al anión decaen en el tiempo. En el caso de la 4-OH-DHP, se observa que la banda correspondiente a la 1,4-DHP decae conjuntamente con la banda del anión.

Las constantes de velocidad para la serie sintetizada resultaron ser significativamente diferentes entre ellas y también con respecto a las dihidropiridinas comerciales utilizadas como referencia. El orden de las constantes de velocidad fue el siguiente: 3-OH-DHP > 4-OH-DHP > DHP > AMLODIPINO > NISOLDIPINO > NIMODIPINO (Tabla 6).

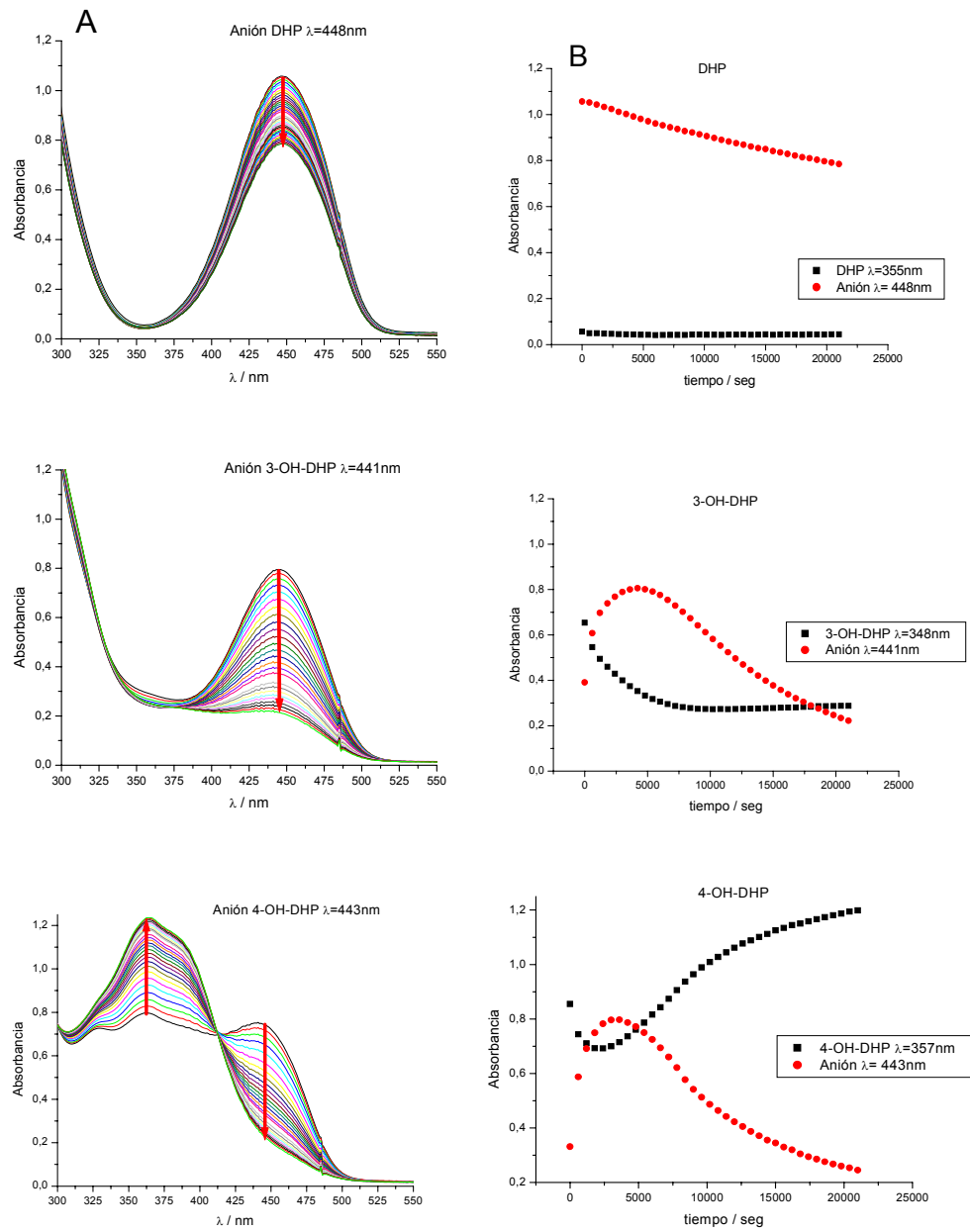


Figura 14: A: Evolución del espectro UV-Vis de las 1,4-DHPs en presencia de 0.5 mM anión radical superóxido. B: Evolución de la absorbancia correspondiente a la 1,4-DHP y de su respectivo anión. Tiempo: 21600 seg.

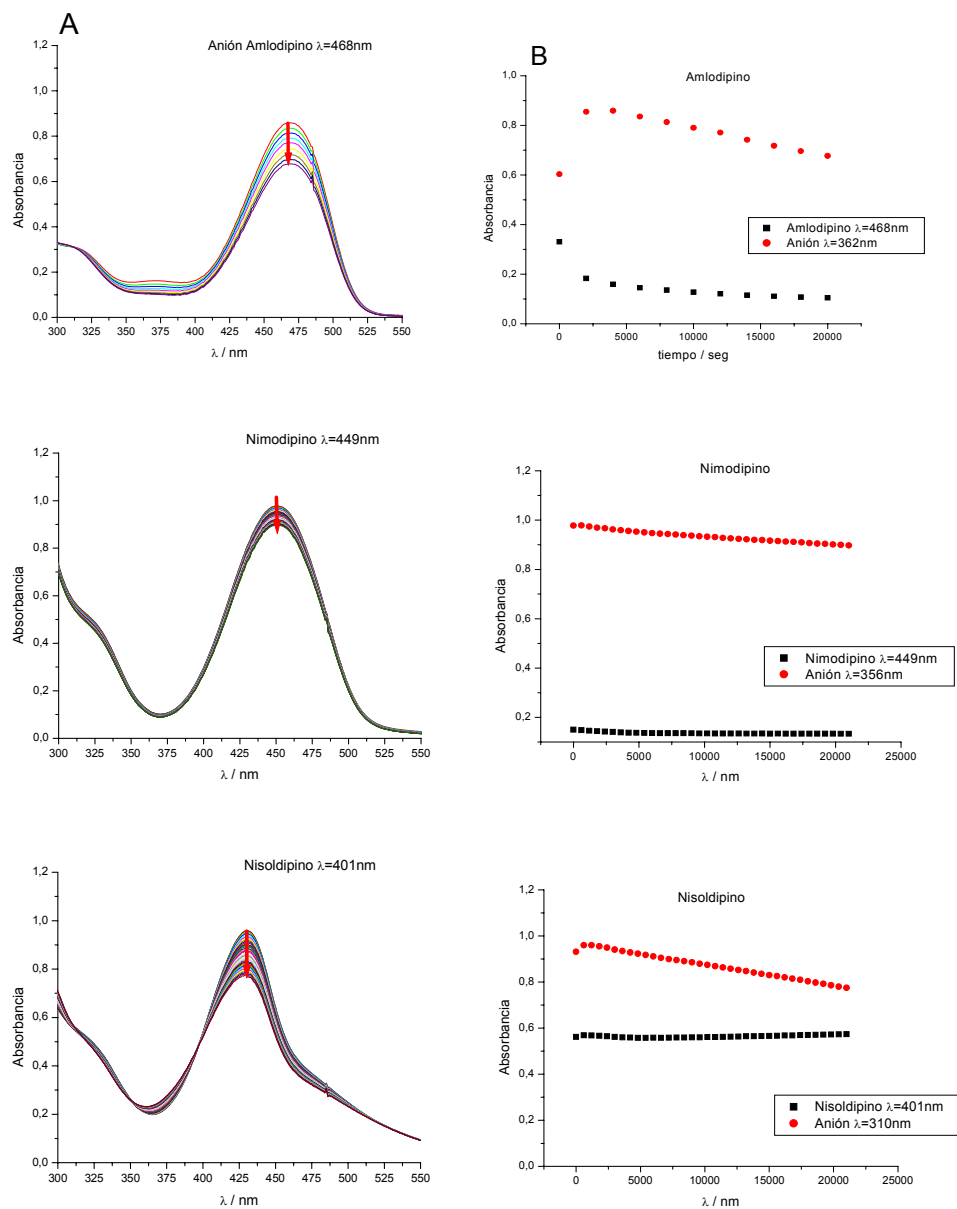


Figura 15: A: Evolución del espectro UV-Vis de las 1,4-DHPs de referencia en presencia de 0.5 mM anión radical superóxido. B: Evolución de la absorbancia correspondiente a la 1,4-DHP y de su respectivo anión. Tiempo: 21600 seg.

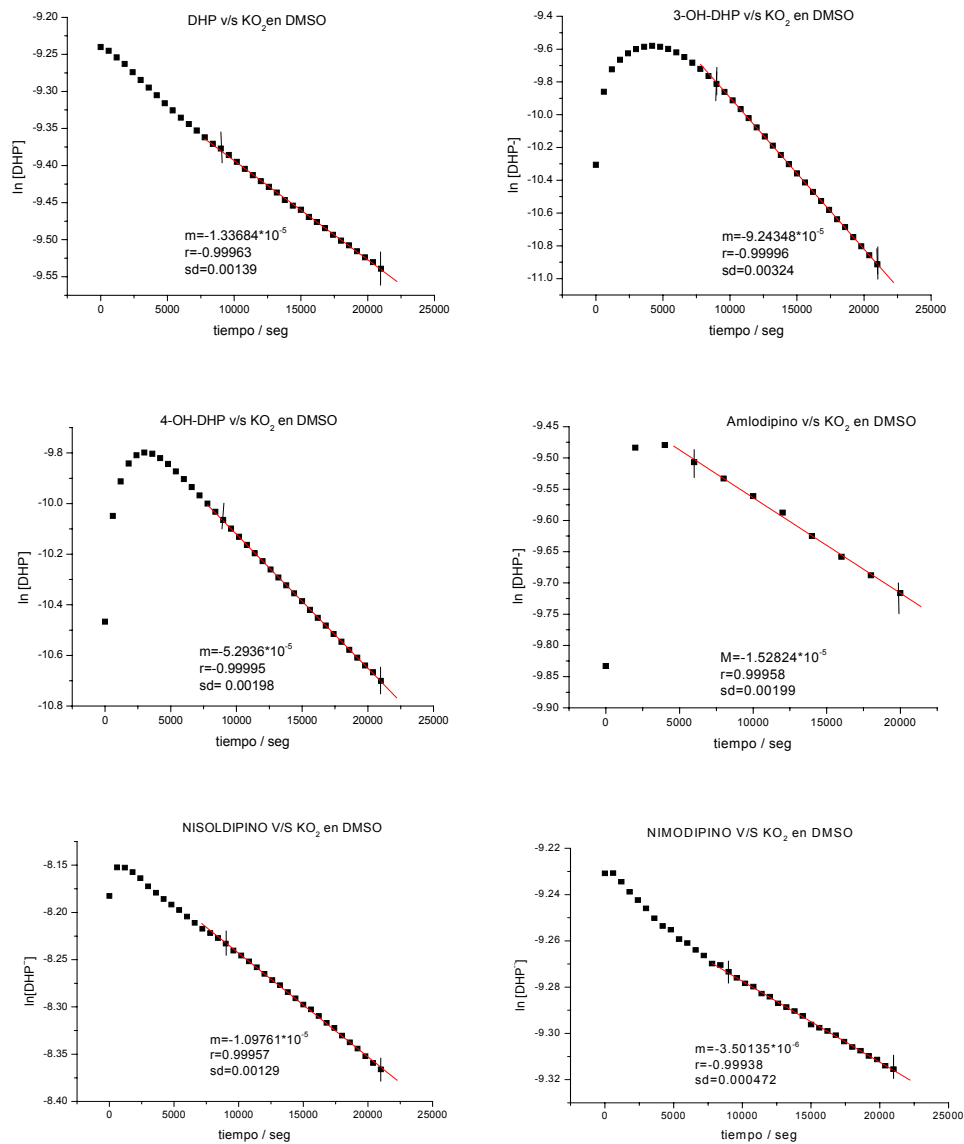


Figura 16: Obtención de las constantes desde las pendientes de los gráficos ln [DHP] v/s tiempo.

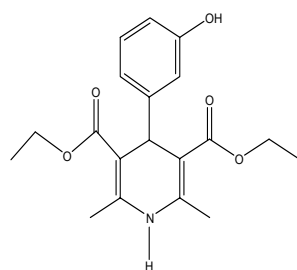
La figura 16 muestra como se obtuvieron finalmente las constantes de velocidad para cada uno de los compuestos, desde las pendientes de los gráficos:

ln [anión 1,4-DHP] v/s el tiempo, para la obtención de todas las constantes, se considero el mismo un intervalo de tiempo, el cual se aprecia acotado entre líneas verticales en los gráficos (entre 9600 y 21600 segundos).

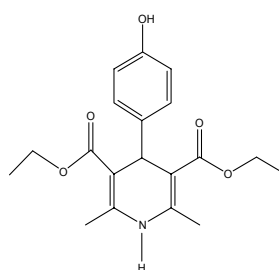
Tabla 6: Valores promedio de constantes de velocidad de oxidación para las 1,4-DHPs y los compuestos de referencia utilizados.

COMPUESTO	3-OH-DHP	4-OH-DHP	DHP	AMLODIPINO	NISOLDIPINO	NIMODIPINO
CONSTANTE (S ⁻¹)	9.5·10 ⁻⁵ (SD=1.81·10 ⁻⁶)	5.7·10 ⁻⁵ (SD=3.87·10 ⁻⁶)	1.6·10 ⁻⁵ (SD=5.9·10 ⁻⁶)	1.5·10 ⁻⁵ (SD=3.61·10 ⁻⁶)	1.1·10 ⁻⁵ (SD=3.15·10 ⁻⁶)	3.5·10 ⁻⁶ (SD=2.96·10 ⁻⁶)

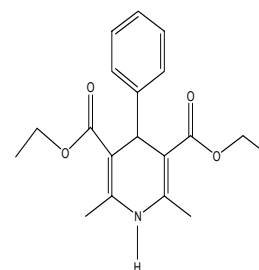
Los valores calculados para las constantes cinéticas de reacción entre las 1,4-DHP y el anión superóxido se observan en la tabla 6. Se encontró que los compuestos más reactivos resultaron ser las 1,4-DHP que tienen un sustituyente hidroxifenilo en la posición 4 (Figura 17). NADH no se incluyó como referencia en esta etapa, ya que al cabo de las 6 horas no se encontraron cambios en su concentración en este medio aprótico.



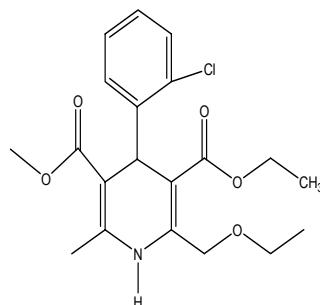
3-OH-DHP



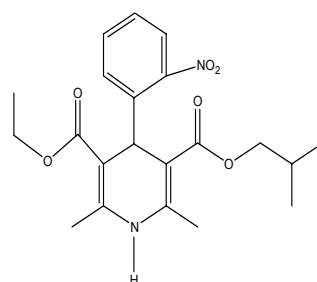
4-OH-DHP



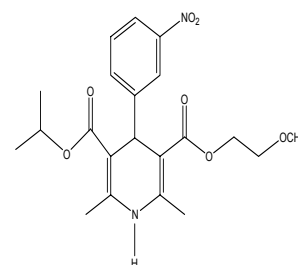
DHP



AMLODIPINO



NISOLDIPINO



NIMODIPINO

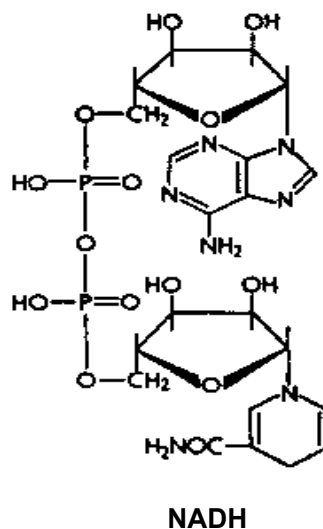


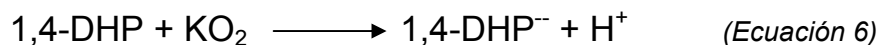
Figura 17: Estructura de las moléculas estudiadas para la formación del anión y de los derivados oxidados.

Estudio cinético para la determinación de la constante de velocidad de formación del anión 1,4-dihidropiridínico, mediante la técnica de flujo retenido.

Adicionalmente a los estudios resumidos en las secciones anteriores, también se estudió mediante la técnica de flujo retenido la velocidad de formación del anión 1,4-DHP al reaccionar con anión radical superóxido (ecuación 6). Para este efecto se utilizó NADH como compuesto de referencia y las constantes cinéticas se calcularon de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos. Para ello, se utilizaron los coeficientes de extinción molar, y las constantes se calcularon considerando una cinética de *seudo-primer* orden, utilizando el software 845X UV-Visible System y aplicando la ecuación:

$$a + b e^{-kt} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde “a” es la concentración inicial, “b” es la concentración al tiempo t y K es la constante en 1 / segundo.



Las constantes obtenidas resultaron ser muy similares entre las diferentes 1,4-DHP y además mostraron una gran variabilidad (Tabla 7). De los resultados obtenidos se puede concluir que este método no resulta ser adecuado para la determinación de las constantes, puesto que no fue reproducible y no permitió observar los cambios de velocidad en función de las distintas concentraciones iniciales, como era previsible. No obstante, el NADH presentó la cinética más rápida para formar el anión.

La evolución de los espectros durante el transcurso de la cinética para todos los compuestos y en las cuatro concentraciones se muestran en las figuras 18 a la 21.

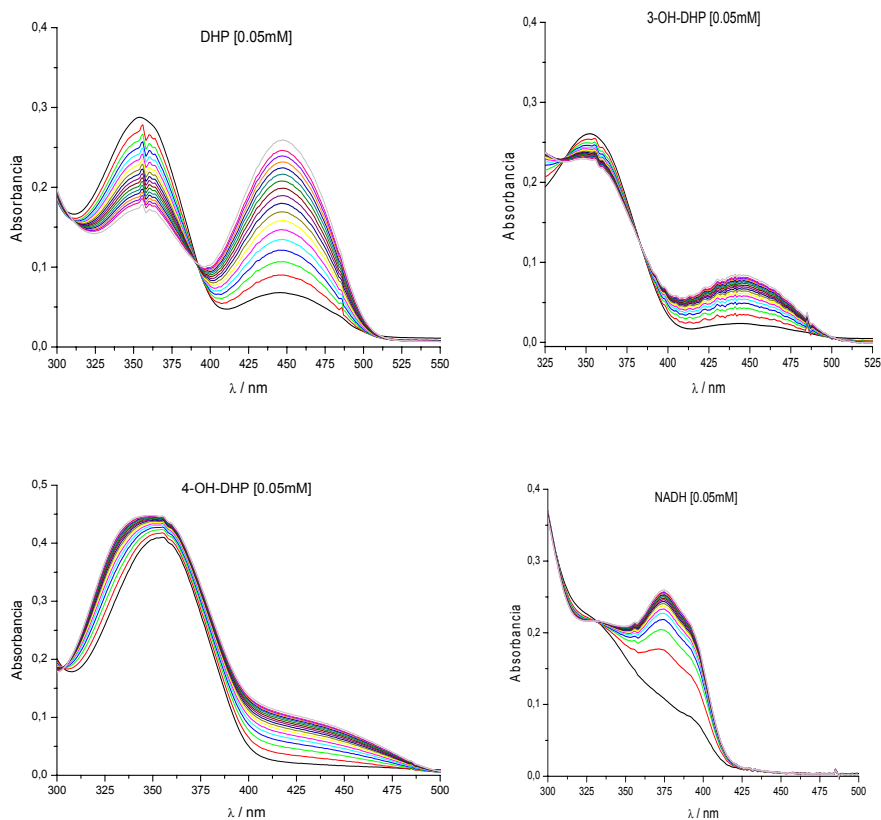


Figura 18: Formación del anión dihidropiridínico de las cuatro DHPs 0.05mM frente a anión radical superóxido 0.5mM.

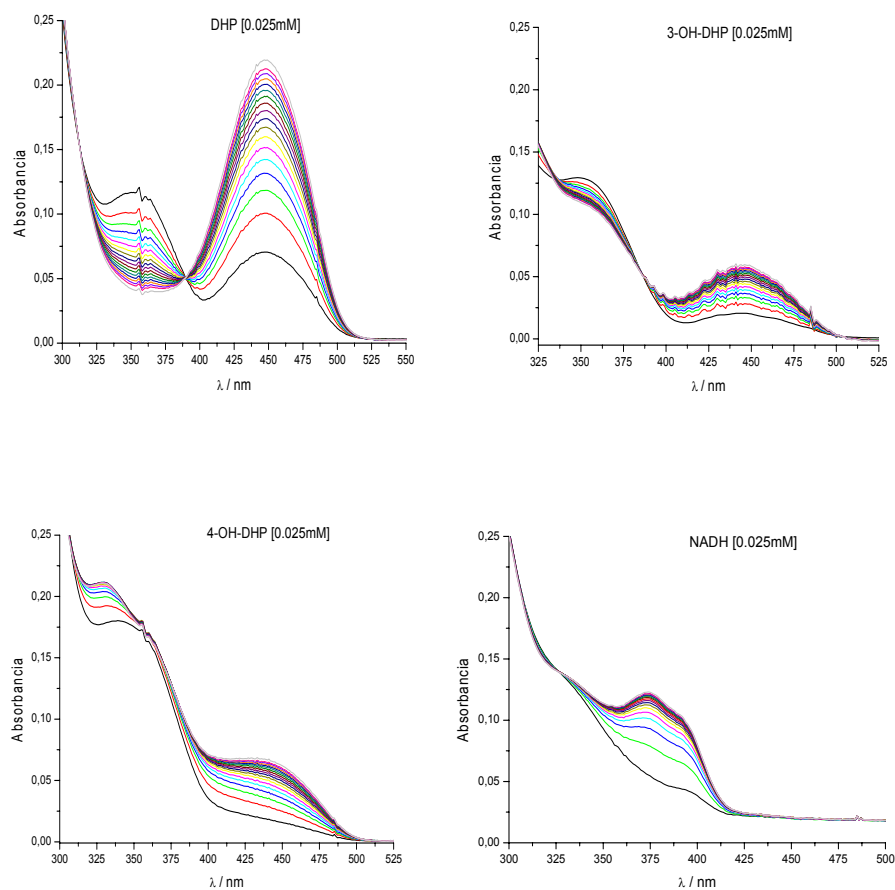
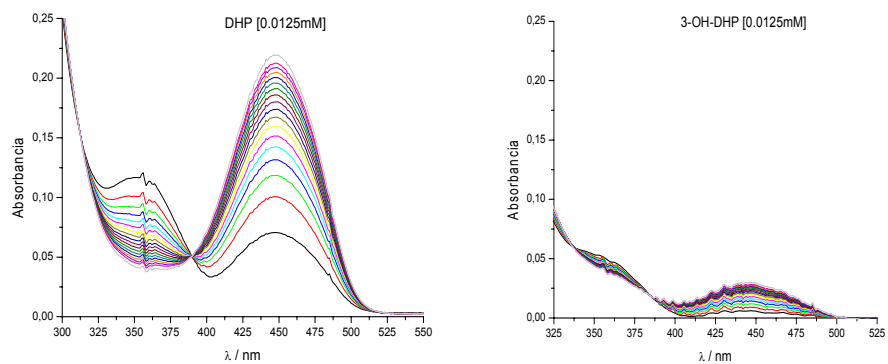


Figura 19: Formación del anión dihidropiridínico de las cuatro DHPs 0.025mM frente a anión radical superóxido 0.5mM.



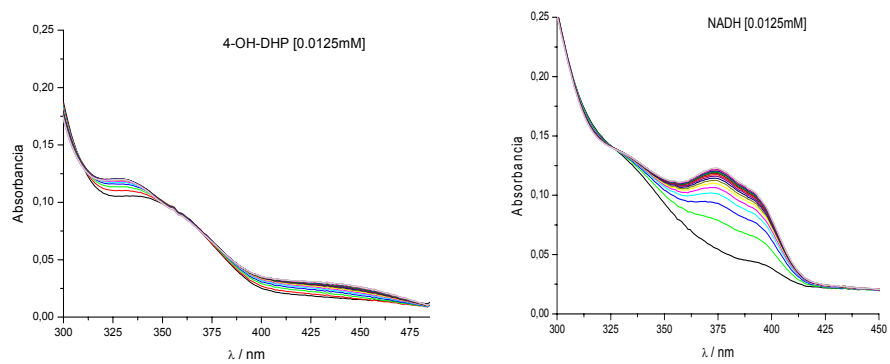


Figura 20: Formación del anión dihidropiridínico de las cuatro DHPs 0.0125mM frente a anión radical superóxido 0.5mM.

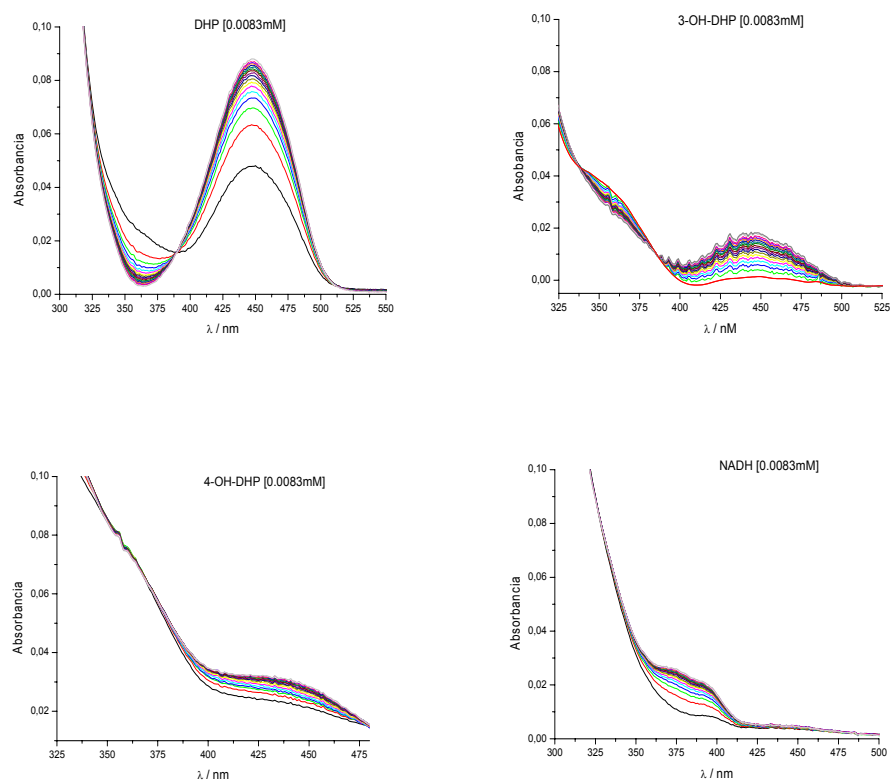


Figura 21: Formación del anión dihidropiridínico de las cuatro DHPs 0.0083mM frente a anión radical superóxido 0.5mM.

Tabla 7: Valores de constantes en S^{-1} de aparición del anión a cuatro concentraciones distintas de las DHPs y NADH frente a KO_2 0.5mM.

CONCENTRACION	DHP	3-OH-DHP	4-OH-DHP	NADH
0.0083 mM	$2.25 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $6.29 \cdot 10^{-8}$)	$1.15 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $7.69 \cdot 10^{-8}$)	$9.17 \cdot 10^{-7}$ (Sd= $7.61 \cdot 10^{-8}$)	$3.51 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $3.11 \cdot 10^{-7}$)
0.0125 mM	$1.74 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $1.90 \cdot 10^{-7}$)	$1.31 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $1.02 \cdot 10^{-7}$)	$1.29 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $2.06 \cdot 10^{-7}$)	$6.31 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $3.57 \cdot 10^{-7}$)
0.0250 mM	$1.07 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $3.36 \cdot 10^{-8}$)	$1.04 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $2.25 \cdot 10^{-8}$)	$9.72 \cdot 10^{-7}$ (Sd= $6.59 \cdot 10^{-9}$)	$4.61 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $1.03 \cdot 10^{-6}$)
0.05 mM	$8.16 \cdot 10^{-7}$ (Sd= $5.15 \cdot 10^{-8}$)	$1.14 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $8.54 \cdot 10^{-9}$)	$9.57 \cdot 10^{-7}$ (Sd= $4.03 \cdot 10^{-8}$)	$5.72 \cdot 10^{-6}$ (Sd= $2.60 \cdot 10^{-5}$)

Experimentos adicionales

Con el fin de comprobar si a partir de soluciones básicas de dimetilsulfoxido (DMSO+OHBTa), se genera anión radical superóxido u otros radicales libres, como ha sido reportado en la literatura [32,33], se diseñaron experimentos cinéticos similares a los anteriores. En un caso, se reemplazó la solución de KO_2 por DMSO + OHBTa, en el otro, se realizó el mismo experimento anterior, pero sólo utilizando dimetilformamida (DMF) + OHBTa. Estos experimentos se hicieron sólo con la 3-OH-DHP, que resultó ser la molécula más reactiva de la serie.

Tanto para el caso de la solución de DMSO, como para la solución de DMF, se procedió adicionando gotas de OHBTa a las soluciones de 1,4-DHP hasta la total formación del anión y luego se monitorearon las cinéticas en el tiempo.

Los estudios se resumen en la figura 22. El estudio cinético realizado con solución básica de DMSO mostró la misma tendencia que las cinéticas efectuadas con soluciones de KO_2 como generador del radical, esto es, la banda correspondiente al anión dihidropiridínico decae en el tiempo, mientras que la banda de la 1,4-dihidropiridina permanece constante. Por otra parte, en los experimentos en que se utilizó DMF + OHBTa como generador de radicales, no se observó ningún cambio. Ambas bandas de absorción (1,4-DHP y anión) permanecieron constantes en el tiempo, por lo que no varió ni la concentración del anión 1,4-DHP ni de la 1,4-dihidropiridina.

A partir de estos experimentos se puede deducir que el DMSO + OHTBA se comportó como generador de radicales y podría eventualmente sustituir al KO_2 . En cambio el DMF no actúa como generador de radicales superóxido. A estos estudios habría que agregar estudios de reproducibilidad para obtener una conclusión definitiva.

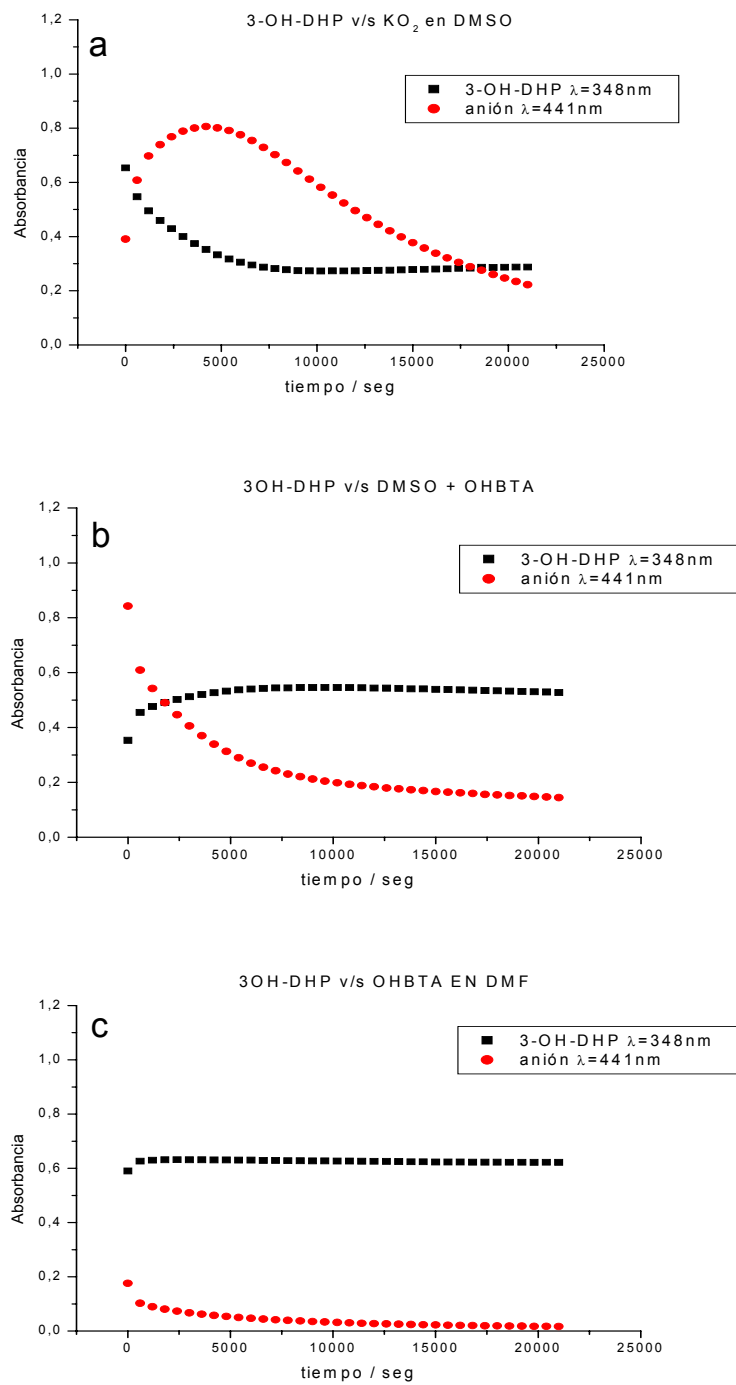


Figura 22: Curso temporal de la absorbancia de la 3-OH DHP [$1 \times 10^{-4} M$] y de su respectivo anión 1,4-DHP en presencia de: a: KO_2 , b: DMSO + OHTBA y c: DMF + OHTBA.

CONCLUSIONES

- La electro-oxidación en medio acuoso y aprótico de las 1,4-dihidropiridinas estudiadas sigue el mismo orden de facilidad de oxidación, esto es, 4-OH-DHP > 3-OH-DHP > DHP.
- El empleo de curvas de calibración de un intermediario de la reacción de oxidación, en este caso el anión dihidropiridínico, es una excelente alternativa para evaluar reacciones en las que no es posible seguir el curso temporal de los reactantes (1,4-DHPs), ni de los productos de la reacción (derivados piridínicos).
- La incorporación del sustituyente hidroxifenilo en la posición-4 del anillo dihidropiridínico, potencia la reactividad frente al anión radical superóxido, al ser comparada con la DHP y con las 1,4-DHPs comerciales.
- El sustituyente 3-hidroxifenilo demostró tener un mayor efecto sobre la reactividad frente a anión radical superóxido que el sustituyente 4-hidroxifenilo
- Claramente, las constantes de formación de los derivados piridínicos correspondientes a las 1,4-DHPs sustituidas con el grupo hidroxifenilo en posición-4 resultaron ser significativamente mayores que aquéllas correspondientes a las 1,4-DHP comerciales.
- Los valores de las constantes de formación del anión 1,4-DHP no mostraron diferencias significativas entre ellas.

REFERENCIAS

- [1] Flórez J., Farmacología humana, tercera edición, Barcelona, Masson, 1997, p.637-647
- [2] Wappl E., Mitterdorfer J., Glossmann H., Striessnig J. (2001). Mechanism of dihydropyridine interaction with critical binding residues of L-type Ca^{2+} channel α_1 subunits. *J. Biol. Chem.* 276:12730-12735.
- [3] Yamaguchi S., Okamura Y., Nagao T., Adachi-Akahane S. (2000). Serine Residue in the IIS5-S6 linker of the L-type Ca^{2+} channel α_{1C} subunit is the critical determinant of the action of dihydropyridine Ca^{2+} channel agonists. *J. Biol. Chem.* 275:41504-41511.
- [4] Katz A. (1985). Basic cellular mechanisms of action of the calcium-channel blockers. *Am. J. Cardiol.* 55:2B-9B.
- [5] Godfraind T., Muller R., Wibo M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38: 321-416.
- [6] Halliwell B., Gutteridge J.M. (1984), Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219 1-14.
- [7] Payá M., Ferrándiz M.L., Miralles F., Montesinos C., Ubeda A., Alcaraz M.,J., (1993), Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation, *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* 43(6), , 655-658.
- [8] Halliwell B., Gutteridge J.M., (1986), Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts, *Archiv. of Biochem. and Biophys.* 246 501-514.

- [9] Graham D.G., Tiffany S.M., Bell Jr. W.R., Gutknecht W.F. (1978), Autoxidation versus Covalent Binding of Quinones as the Mechanism of Toxicity of Dopamine, 6-Hydroxydopamine, and Related Compounds toward C1300 Neuroblastoma Cells *in Vitro Mol. Pharmacol.*, 14 644-653.
- [10] Mak T., Boheme P., Weglicki W.B. (1992). Antioxidant protective effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells: *Cir. Res.* 70:1099-1103.
- [11] Aruoma O.I., Smith C., Cecchini R., Evans P.J., Halliwell B. (1991). Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by blockers and agents that interfere with calcium metabolism-to physiologically significant process?. *Biochem. Pharmacol.* 42:735-743.
- [12] Henry P.D. (1991). Antiperoxidative actions of calcium antagonist and atherogenesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18:S6-S10.
- [13] Mak I., T., Boheme P., Weglicki W.B. (1995). Protective effects of calcium channel blockers against free radical-impaired endothelial cell proliferation. *Biochem. Pharmacol.* 50:1531-1534.
- [14] Mason R., Mak T., Trumbore W., Mason P. (1999). Antioxidant properties of calcium antagonists related to membrane biophysical interactions. *Am. J. Cardiol* 84:16L-22L.
- [15] Velená A., Zilbers J., Durbus G. (1999). Derivatives of 1,4-dihydropyridines as modulators of ascorbate-induced lipid peroxidation and high-amplitude swelling of mitochondria, caused by ascorbate, sodium linoleate and sodium pyrophosphate. *Cell. Biochem. Funct.* 17:237-252.
- [16] Cominacini L., Pasini A.F., Garbin U., Pastorino A.M., Davoli A., Nava C., Campagnola M., Rossato P., Cascio V. (2003). Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* 302:679-684.

- [17] Rojstaczer N., Triggle D. (1996). Structure-function relationships of calcium antagonists. Effects on oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 51:141-150.
- [18] Belch J.J.F., Chopra M., Hutchison S., Lorimer R., Sturrock R.D., Forbes C.D., Smith W.E. (1989). Free radical pathology in chronic arterial disease. *Free Rad. Biol. Med.* 6:375-378.
- [19] Prabha P.S., Das U.N., Koratkar R., Sangeetha Sagar P., Ramesh G. (1990). Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acid in uncontrolled essential hypertension. *Prostagland. Leukotr. Essent. Fatty Ac.* 41:23-27.
- [20] Díaz-Araya G., Godoy L., Naranjo L., Squella A., Letelier M.E., Núñez-Vergara L.J. (1998). Antioxidant effects of 1,4-dihydropyridine nitrous and aryl derivatives on the Fe⁺³/ascorbate-stimulated lipid peroxidation in rat brain slices - possible role of endogeneous iron. *Gen. Pharmacol.* 31:385-391.
- [21] Sugawara H., Tobise K., Onodera S. (1994). Absence of antioxidant effects of nifedipine and diltiazem on myocardial membrane lipid peroxidation in contrast with of nisoldipine and propranolol. *Biochem. Pharmacol.* 47:887-892.
- [22] Van Amsterdam F.Th.M., Roveri A., Maiorino M., Ratti E., Ursini F. (1992). Lacidipine: A dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 12:183-187.
- [23] Toniolo R., Di Narda F., Bontempelli G., Ursini F. (2000). An electroanalytical investigation on the redox properties of lacidipine supporting its anti-oxidant effect. *Bioelectrochem.* 51:193-200.
- [24] Mason R., Mak T., Trumbore W., Mason P. (1999). Antioxidant properties of calcium antagonists related to membrane biophysical interactions. *Am. J. Cardiol* 84:16L-22L.

[25] Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C., (1992), Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598-620.

[26] Berson J., Brown E. (1955). Studies on dihydropyridines. I. The preparation of unsymmetrical 4-Aryl-1,4-dihydropyridines by the Hantzsch-Beyer synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 444-453.

[27] Katritzky A., Ostercamp D., Yousag T. (1987). The mechanisms of heterocyclic ring closures. *Tetrahedron.* 43:5171-5186.

[28] Stout D., Meyers A. (1982). Recent advances in the chemistry of dihydropyridines. *Chem Rev.* 82:223-243.

[29] Takemura G., Onodera T., Millard R.W., Ashraf M., (1993), Demonstration of hydroxyl radical and its role in hydrogen peroxide-induced myocardial injury: Hydroxyl radical dependent and independent mechanisms, *Free Rad. Biol. & Med.* 15:13.

[30] Birincioglu M., Asoy T., Olmez E., Acet A., (1997), Protective effect of ACE inhibitors on ischemia-reperfusion-induced arrhythmias in rats: Is this effect related to the free radical scavenging action of these drugs?, *Free Rad. Res.* 27 389.

[31] Frost and Pearson, Kinetics and Mechanism, Second Edition, John Wiley & sons, Inc., New York, United States, 1961, p.8-15, 193-196.

[32] Xiangli Qiao, Shiming Cheng, Li Tan, Hu Zheng, (2001), Investigation of formation of superoxide anion radical in DMSO by ESR: Part 1. Influence of Fe^{2+} and Cu^{2+} , *Magn. Reson. Chem.* 39 207-211.

[33] Mitsuo Hashimoto, Yumi Nakai, Masahiro Kohno, Kunihiko Tajima, (1997), DMPO Spin Trapping of Superoxide Anion in Strong Alkaline DMSO Solution, *Chem. Lett.*, 71-72.

[34] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & sons, Inc., New York, United States, 1980, p. 288-289.

[35] Ortiz Yañez, Maria Eugenia. *Generación electroquímica de anión radical superóxido y reactividad con 1,4-dihidropiridinas-4-sustituidas*. Tesis (Doctorado en Química) Santiago Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2004, 125h.

[36] López Alarcón, Camilo Ignacio. *Síntesis y caracterización electroquímica de 1,4-dihidropiridinas-4-sustituidas*. Tesis (Doctorado en Química) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2004, 106h.