



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACEÚTICO

JAVIER OCTAVIO MORALES MONTECINOS

“ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO DE LA INCLUSIÓN DE 5-NITROINDAZOL EN
CICLODEXTRINAS”.

DIRECTORA DE TESIS Y PROFESOR PATROCINANTE

Dra. CAROLINA JULLIAN MATTHAEI

2007

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia entera, por su paciencia, cariño y apoyo incondicional durante todos estos años de estudios de pregrado. Especialmente a mi papá, Juanito; a mi mami, Verónica; y mi aweli Elenita.

También quiero agradecer a mis amigos del pregrado, especialmente al León y la Pame, con los que tanto compartí durante toda esta etapa.

A mi profe guía, la Dra. Carolina Jullian, muy rigurosa tutora de tesis, excelente investigadora y académica. Aprendí mucho con ella respecto a este lindo tema.

Finalmente quiero dar las gracias enormemente a Masiel Cerón, a quien quiero mucho. Por su paciencia, y por que ha sido fundamental en todos estos años, gracias.

A todos quienes fueron parte de mi etapa de pregrado, les dedico esta memoria.

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	ii
Tabla de Contenidos.....	iii
Índice de figuras, tablas y ecuaciones	v
Resumen	viii
Summary	x
1. Introducción	1
2. Objetivo General	9
3. Objetivos Específicos.....	9
4. Materiales y Métodos	10
4.1. Reactivos.....	10
4.2. Equipos	10
4.3. Metodología.....	11
4.3.1. Asignación inequívoca de los espectros RMN para el 5-NI, β CD y DM β CD.....	11
4.3.2. Confirmación de la Inclusión	11
4.3.3. Determinación de la estequiometría del complejo	11
4.3.4. Determinación de la constante de asociación por la metodología de solubilidad de fase.....	13
4.3.5. Determinación de la geometría de inclusión	15
5. Resultados y Discusión	16
5.1. Asignación completa de los espectros RMN para el 5-NI	16

5.2.	<i>Resultados para el complejo entre el 5-NI y βCD</i>	21
5.2.1.	<i>Confirmación de la Inclusión</i>	21
5.2.2.	<i>Determinación de la estequiometría del complejo</i>	23
5.2.3.	<i>Determinación de la constante de asociación por solubilidad de fase.</i>	24
5.2.4.	<i>Determinación de la geometría de inclusión</i>	25
5.3.	<i>Resultados para el complejo entre el 5-NI y DMβCD</i>	28
5.3.1.	<i>Confirmación de la Inclusión</i>	28
5.3.2.	<i>Determinación de la estequiometría del complejo</i>	30
5.3.3.	<i>Determinación de la constante de asociación por solubilidad de fase.</i>	31
5.3.4.	<i>Determinación de la geometría de inclusión</i>	33
6.	Conclusiones	39
7.	Referencias	41

Índice de figuras y tablas

Figura 1: Esquema de la estructura de cono truncado que tienen las CD. En su región interna es donde hospeda sustratos hidrófobos, mientras que hacia el exterior orienta sus hidroxilos que le confieren solubilidad en agua. A la derecha se muestra la D-(+)-glucopiranososa y se indica la numeración de los protones.....	1
Figura 2: Mecanismo por el que se incrementa la penetración de fármaco (D).....	4
Figura 3: Modelo que explica la relación entre la constante de asociación.....	5
Figura 4: Estructura del 4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dioxido, o Nifurtimox.....	7
Figura 5: Estructura del 1-(2-(bencilamino)-2-oxoetil)-2-nitro-1H-imidazol o Benznidazol.....	7
Figura 6: Estructura del 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol.....	8
Figura 7: Diagrama teórico de solubilidad de fase.....	13
Figura 8: Espectro ¹ H-RMN de 5-NI, con la asignación de cada señal a su protón. En 4,7 ppm aparece la señal del solvente.....	16
Figura 9: Espectro ¹³ C-RMN con la asignación de cada señal a su carbono.....	18
Figura 10: Espectro bidimensional ROESY del 5-NI en CDCl ₃	19
Figura 11: 5-NI con la numeración de la molécula. Las señales fueron asignadas de acuerdo a la numeración.....	20
Figura 12: Espectros de ¹ H-RMN. El espectro a corresponde a una solución de 5-NI libre. El espectro b corresponde a una solución del sustrato 5-NI con βCD.....	21
Figura 13: Espectros de ¹ H-RMN. El espectro a corresponde a una solución de βCD libre. En el espectro b, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con βCD, se puede observar el desplazamiento de las señales.....	22
Figura 14: Espectros de absorción con variación de <i>r</i> . El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.....	23
Figura 15: Gráfico de variación continua (Job Plot) del complejo (5-NI) – β-CD, con máximo en <i>r</i> = 0,5.....	23
Figura 16: Espectros de absorción con aumento de [β-CD]. El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.....	24

Figura 17: Gráfico del experimento de solubilidad de fase para el complejo (5-NI) – β -CD. Se observa el incremento lineal, lo que confirma la estequiometría 1:1.....	24
Figura 18: Espectro ^1H -RMN de la β CD en D_2O , se omite H-1, que aparece en 4,99.	25
Figura 19: Ampliación del espectro 2D-ROESY para el complejo entre 5-NI y β CD en la región aromática del 5-NI.	26
Figura 20: Ampliación del espectro 2D-ROESY obtenido para el complejo entre 5-NI y β CD en D_2O	27
Figura 21: Estructura propuesta del complejo de inclusión del 5-NI con β CD.	27
Figura 22: Espectros de ^1H -RMN. El espectro a corresponde a una solución de 5-NI libre. En el espectro b, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con $\text{DM}\beta\text{CD}$, se puede observar el desplazamiento	28
Figura 23: sección alifática de los espectros de ^1H -RMN. El espectro a corresponde a una solución de 5-NI. El espectro b es una solución de 5-NI con $\text{DM}\beta\text{CD}$	29
Figura 24: Espectros de ^1H -RMN. El espectro a corresponde a una solución de $\text{DM}\beta\text{CD}$ libre. En el espectro b, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con $\text{DM}\beta\text{CD}$, se puede observar el desplazamiento de las señales.	30
Figura 25: Espectros de absorción con variación de r . El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.....	31
Figura 26: Gráfico de variación continua (Job Plot) del complejo (5-NI) – $\text{DM}\beta\text{CD}$, con máximo en $r = 0,5$	31
Figura 27: Espectros de absorción con aumento de $[\text{DM}\beta\text{CD}]$. El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.	32
Figura 28: Gráfico del experimento de solubilidad de fase para el complejo (5-NI) – $\text{DM}\beta\text{CD}$. Se observa el incremento lineal, lo que confirma la estequiometría 1:1.....	32
Figura 29: Espectro ^1H -RMN de la $\text{DM}\beta\text{CD}$ en D_2O , H-1 aparece en 5,16.	33
Figura 30: Espectro 2D-HSQC de la $\text{DM}\beta\text{CD}$ en D_2O	34
Figura 31: Espectro 2D-HSQC del complejo entre 5-NI y la $\text{DM}\beta\text{CD}$ en D_2O	34
Figura 32: Ampliación del espectro 2D-ROESY obtenido para el complejo entre 5-NI y $\text{DM}\beta\text{CD}$ en D_2O	35
Figura 33: Estructura propuesta del complejo entre 5-NI y $\text{DM}\beta\text{CD}$	36

Figura 34: Comparación de las geometrías propuestas para los complejos entre el 5-NI y la β CD (izquierda) y DM β CD (derecha).....	38
Tabla 1: Algunas características de α -, β -, γ - y δ -CD.....	3
Tabla 2: Desplazamiento químico de las señales en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el 5-NI. Se indican las correlaciones de largo alcance C-H observadas en el espectro HMBC.	18
Tabla 3: Diferencias de los desplazamientos entre los compuesto libres y formando complejos..	37

Resumen

En esta tesis se estudió el efecto que tendrían la β CD y la 2,6-DM β CD sobre la solubilidad de un nuevo nitroderivado antichagásico, el 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol. Además se propuso la estructura tridimensional que adopta el 5-nitroindazol al interior de la cavidad de las diferentes CDs.

Por medio de la metodología de variación continua y de solubilidad de fase, se encontró que ambas CDs generan compuestos de inclusión con una estequiometría de 1:1. Las constantes de asociación, K_a , encontradas fueron $186,5 \text{ M}^{-1}$ y $3687,8 \text{ M}^{-1}$ para la β CD y la DM β CD respectivamente. Se observó que 10 mM de β CD aumenta al doble la solubilidad del 5-NI; mientras que la DM β CD, a la misma concentración, aumenta seis veces la solubilidad del compuesto.

El espectro ROESY del 5-NI libre permitió determinar la geometría que adopta el compuesto en solución acuosa. Se observó que el protón 7 del anillo aromático establece una interacción con los protones de la cadena alifática lateral, 1', 2' y 4'. Esto significaría que en solución, la cadena se encuentra plegada orientándose hacia la región aromática.

Estos espectros también permiten establecer cómo es la inclusión del 5-NI al interior de las CDs. En el caso del complejo entre el 5-NI y β CD, el espectro ROESY indica que existen interacciones entre los protones aromáticos, 4, 6 y 7 del 5-NI y los protones del interior de la cavidad de la CD. Junto con esto se encontró que los protones que forman parte de la cadena alifática, 2' y 4', se desplazan cuando se encuentran formando el complejo de inclusión, lo que significaría que también interactúan con el interior de la cavidad. Lo anterior sugiere que el compuesto se incluye en la cavidad de la CD casi completamente. Por otro lado, también se observan interacciones entre el protón 7 del anillo aromático del 5-NI y los protones de la cadena alifática, indicando que ésta se encuentra plegada hacia la región aromática, de la misma forma que el 5-NI libre en solución.

El complejo entre el 5-NI y la DM β CD, presenta una geometría de inclusión distinta, ya que las interacciones de la región aromática del 5-NI y los protones de la cavidad de la CD, indican que la orientación del 5-NI deja el núcleo bencénico hacia la abertura más ancha, mientras que el núcleo pirazólico, del indazol, hacia la abertura de diámetro menor. Además los desplazamientos de las señales de los protones de la cadena alifática, indican que se encuentra completamente incluida en la CD; sin embargo, se puede decir que la cadena se encuentra menos plegada en este complejo, pues no se observan interacciones con el protón 7 del 5-NI.

Summary

“Spectroscopic study of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins”

In this thesis we studied the impact of the β CD and 2,6-DM β CD on the solubility of a new antichagasic nitroderivative, 1-(2-(dimethylamino) ethyl) -3-metoxi-5-nitro-1H-indazol . In addition, we proposed the three-dimensional structure that adopts 5-nitroindazol inside the cavity of different CDs.

With the continuous variation and phase solubility methodologies, we found that both generate inclusion complexes with the different CDs. The stoichiometry was 1:1, and the association constants, K_a , was 186.5 M⁻¹ and 3687.8 M⁻¹, for both β CD and DM β CD respectively.

The geometry of the 5-NI derivative in aqueous solution, was determined by 2D-ROESY spectra. The aliphatic amino chain is folded and interacts with the aromatic H-7.

The 2D-ROESY spectrum of the complex of 5-NI inside the CD, indicates that there are interactions between the aromatic protons, 4, 6 and 7 of 5-NI and protons inside the cavity of the CD. Besides the protons that are part of the aliphatic chain, 2' and 4', they shift to a high field when they are forming the inclusion complex. This suggests, that the compound is included in the cavity of the CD almost completely. On the other hand, there are certain interactions between the proton 7 of the aromatic ring of 5-NI and protons in the aliphatic chain, indicating that it is folded toward the aromatic region in the same way that 5-NI free solution .

Whereas the complex between 5-NI and DM β CD, shows a different geometry of inclusion. Interactions of aromatic protons of the 5-NI with the CD, show that the orientation of 5-NI includes benzenic core towards the secondary rim, while the pirazolic core, is near the primary rim.

1. Introducción

En la química supramolecular, las ciclodextrinas (CDs) son consideradas como las más importantes dentro de los complejos de inclusión¹. La versatilidad de los complejos de inclusión que ellas forman permite su aplicación en diversos campos como alimentos, textiles, medicamentos, cosméticos, procesos de separación, protección ambiental y catálisis^{1,2}.

Las CDs son oligosacáridos cíclicos que contienen por lo menos 6 unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas entre sí por medio de enlaces glicosídicos α -(1,4). Esta estructura química adopta espacialmente la forma de un cono truncado (ver Figura 1), que en su exterior presenta grupos hidroxilos que le dan características hidrofílicas y es responsable de su solubilidad en agua; mientras que hacia el interior de la cavidad quedan expuestos los protones 3 (cerca del borde de mayor diámetro), 5 y 6 (delimitando el borde de diámetro menor) del azúcar, junto con los oxígenos que forman los enlaces α -(1,4), generando una cavidad hidrofóbica. Esta región es la responsable de la principal aplicación de estos compuestos como formadores de complejos de inclusión.

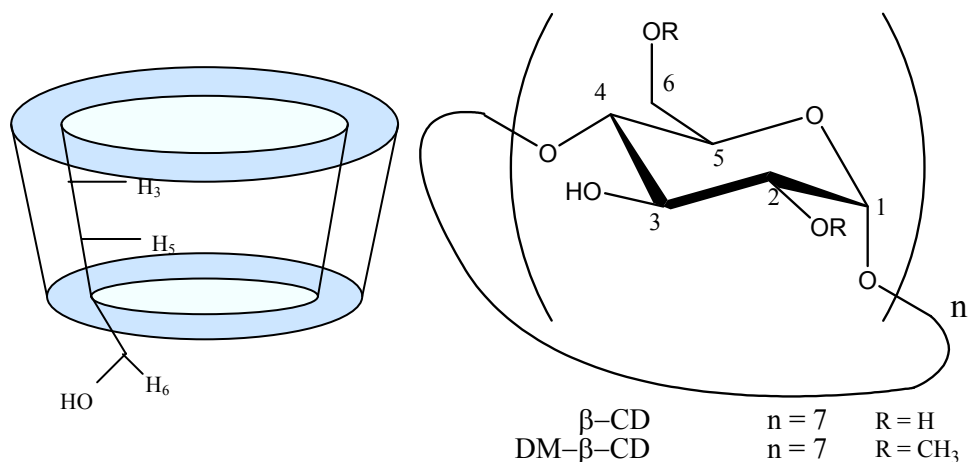


Figura 1: Esquema de la estructura de cono truncado que tienen las CD. En su región interna es donde hospeda sustratos hidrofóbicos, mientras que hacia el exterior orienta sus hidroxilos que le confieren solubilidad en agua. A la derecha se muestra la D-(+)-glucopiranososa y se indica la numeración de los protones.

La IUPAC define un complejo o un compuesto de inclusión como aquel en que un componente (el ligando) genera una cavidad en forma de largos túneles o canales, dentro de la

cual una segunda especie (el huésped) se localiza. No hay enlazamiento covalente entre el ligando y el huésped, si no que la atracción generalmente es debida a fuerzas de van der Waals³. Las CDs corresponden al ligante de esta definición, que en su interior hospeda moléculas con características fisicoquímicas adecuadas, formando complejos de inclusión.

De acuerdo al número de unidades de D-(+)-glucopiranosas se clasifican en α -, β -, y γ -CD con 6, 7 y 8 unidades respectivamente. Estos compuestos tienen un origen natural y se han sintetizado numerosos derivados con el objeto de modificar sus características fisicoquímicas, sobretodo su solubilidad que es relativamente baja. Recientemente se han sintetizado y aislado derivados con un mayor número de unidades, obteniéndose δ -CD^{4,5}. Sin embargo no todas presentan las mismas características en la formación de complejos de inclusión. Usualmente la cavidad de la α -CD es de un tamaño insuficiente para hospedar en su interior moléculas, mientras que la δ -CD por su gran tamaño forma complejos de inclusión con una pobre estabilidad. Por otro lado la γ -CD es un reactivo relativamente caro. La β -CD tiene una baja solubilidad en agua (ver Tabla 1) debido a los puentes de hidrógeno que se establecen entre sus hidroxilos secundarios, formando una red. Por ello, se han creado derivados sustituidos, que interrumpen la formación de los puentes. Es así como, por ejemplo la hidroxipropil- β -CD tiene una solubilidad de 60% p/p⁶. Esto hace que la familia de derivados de la β -CD sea la de mayor aplicación en variadas industrias, ya que han demostrado tener una cavidad que puede hospedar una amplia gama de moléculas, además que muchos derivados se encuentran comercialmente disponible facilitando su estudio.

La estructura de las CDs, al estar formadas por la D-(+)-glucopiranosas, tienen una altura promedio, alrededor de los 7,9 Å. Sin embargo, su diámetro varía en función de las unidades que forman el anillo, como se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1: Algunas características de α -, β -, γ - y δ -CD.

Tipo de CD	Diámetro de la cavidad /Å	Peso Molecular	Solubilidad en agua / g/ 100mL
α -CD	4,7 – 5,3	972	14,5
β -CD	6,0 – 6,5	1135	1,85
γ -CD	7,5 – 8,3	1297	23,2
δ -CD	10,3 – 11,2	1459	8,19

Se ha observado que, debido a su tamaño, la α -CD compleja de mejor manera cadenas alifáticas, mientras que la β -CD acomoda en su interior preferentemente estructuras aromáticas⁷.

Los complejos de inclusión que forman las CD por lo general son entre una o dos unidades de éstas y la molécula huésped, por lo tanto, los factores que gobiernan la estabilidad del complejo de inclusión dependerán por un lado de la CD en uso y de la molécula incluida en estudio. Las fuerzas que permiten la formación de los complejos son interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, de van der Waals y la pérdida de tensión de los anillos que se incluyen.

Diversos estudios han demostrado que factores como el tipo de CD^{8,9}, el tamaño de la cavidad^{10,11}, la temperatura^{12,13}, el pH¹⁴ y el estado de ionización¹⁵ son factores que afectan la constante de asociación en un complejo de inclusión.

Dada la amplia gama de moléculas que pueden ser incluidas en las CDs sus aplicaciones son muy variadas. En el campo de los medicamentos y su formulación, las CDs tienen un gran potencial debido a sus características químicas y los efectos que producen en los fármacos con los que forman complejos. Sin embargo su aplicación está limitada por su biocompatibilidad. De este modo se encuentran diferencias en la ruta de administración de la CD. Una inyección intravenosa de CD es excretada casi completamente por medio del riñón, ya que el ser humano no tiene las enzimas necesarias para la degradación de la CD. Son bacterias y hongos quienes tienen la capacidad de degradarlas puesto que contienen la enzima (amilasa)

apropiada para su biotransformación. Esto se traduce en que las CDs que se administran por vía oral sean degradadas en el colon previo a su excreción.

Es bien sabido que las CDs forman complejos con fármacos que poseen una solubilidad acuosa reducida, aumentando así su solubilidad aparente, actuando como *carriers* hidrofílicos para moléculas poco solubles^{16,17}. Otra aplicación interesante en el mismo campo es la de incrementar la disolución de tabletas formuladas con altas dosis de fármacos, que no forman complejos de inclusión con las CD, por ejemplo el paracetamol¹⁸.

Este incremento en la solubilidad, junto con su velocidad de disolución y la permeabilidad del fármaco, generan un aumento de su biodisponibilidad. La permeabilidad de fármacos insolubles se incrementa por hacer que haya una concentración de fármaco mayor en el sitio de absorción, por ejemplo, piel, mucosa o córnea (Figura 2). En estos casos es importante que el aumento de la cantidad de CD no llegue a interferir con la absorción ya que un exceso puede disminuir la disponibilidad¹⁹.

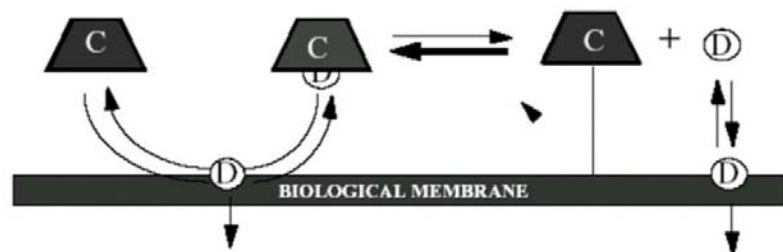


Figura 2: Mecanismo por el que se incrementa la penetración de fármaco (D) a través de complejos de inclusión con CD (C)²⁰.

Por otro lado el efecto de los complejos de inclusión ha sido utilizado para disminuir la irritación que causan algunos fármacos²¹. Esto es, por que el complejo presenta mejor efectividad y potencia que el fármaco sólo (por el incremento de la biodisponibilidad), lo que permite reducir las cantidades administradas y conservar el efecto terapéutico, pero disminuir la toxicidad²².

Otro importante efecto es el de aumentar la solubilidad de fármacos contra la deshidratación, hidrólisis, oxidación y fotodescomposición, aumentando así la vida útil de los fármacos^{23,24}. Esto puede deberse a que la CD protege a la molécula físicamente, inhibiendo así la interacción del fármaco con vehículos o con sus rutas metabólicas. En general podemos pensar que, así como existe una constante de velocidad de degradación del fármaco libre (k_0), también existirá una constante de velocidad de degradación para el fármaco incluido en la CD (k_{CD}), y esta es menor que k_0 , es decir, la degradación de la molécula complejada es menor que libre²⁵. De la Figura 3 se desprende que mientras se desplace el equilibrio hacia la forma complejada, la velocidad de eliminación global será menor.

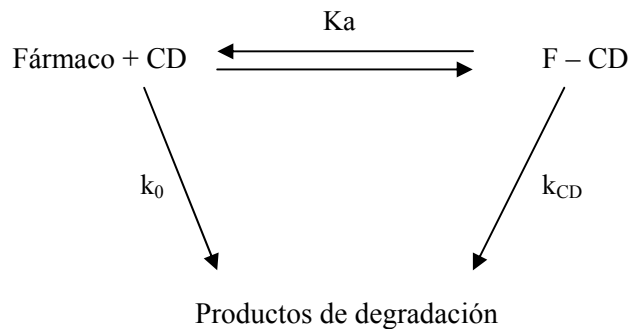


Figura 3: Modelo que explica la relación entre la constante de asociación y las constantes de degradación del fármaco²⁵.

Es por todos estos motivos que la química de las CDs es un área de la química muy investigada, y presenta un particular interés en la formulación de nuevos medicamentos con mejores características, sobretodo farmacocinéticas.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis vectorial de carácter crónico en inmunocompetentes, y oportunista, en inmunodeprimidos²⁶, causada por el parásito *Tripanosoma cruzi*.

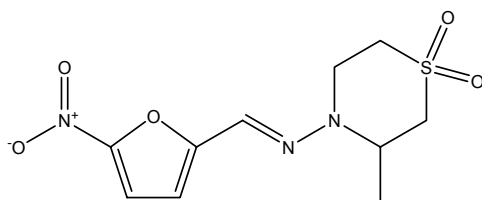
En América Latina es la cuarta enfermedad de importancia como carga, después de las respiratorias, diarreas y el SIDA. En Chile las zonas endémicas se encuentran desde la I a la VI región incluyendo la Metropolitana²⁷.

Es una enfermedad que se presenta en tres etapas: una aguda, que frecuentemente no presenta síntomas, y cuando lo hace suele cursar con fiebre y signo de entrada del parásito o chagoma; una etapa latente, o crónica indeterminada, representa el estado del 50 al 70% de los pacientes chagásicos²⁸ y puede manifestarse asintomática por 10 a 30 años hasta que evoluciona a la siguiente etapa; la etapa crónica, o determinada, puede aparecer en forma de cardiopatía, colopatía y esofagopatía. Aunque la enfermedad carece de un tratamiento eficaz, lo que focaliza las estrategias de control a disminuir la transmisión vectorial, el tratamiento farmacológico antiparasitario en las tres etapas ha demostrado traer beneficios para el paciente, sobretodo en pacientes agudos, en los que disminuye drásticamente la parasitemia, a niveles no detectables. Es por esto que la Guía Clínica²⁶ indica el tratamiento farmacológico para todo paciente chagásico, mientras no esté en una etapa crónica terminal.

El nifurtimox (Figura 4), un derivado del nitrofurano, fue autorizado para su uso en 1965, y hasta hoy se utiliza en las tres etapas de la enfermedad, alcanzando una cura parasitológica en la fase aguda del 76% de los pacientes tratados. Este fármaco es tripanomicida ya que al interior del parásito genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan estrés oxidativo, sobre el cual el tripanosoma no presenta mecanismos de detoxificación.

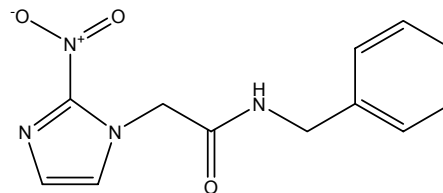
Aunque las células del paciente tienen mecanismos que le protegen de la acción de ROS, una de las causas por la que se considera que la terapia farmacológica para esta enfermedad es insuficiente, corresponde a la elevada toxicidad, y por lo tanto una peligrosa relación riesgo/beneficio.

Con el mismo mecanismo de acción actúa el benznidazol (Figura 5), un nitroimidazol que presenta una efectividad muy similar a la del nifurtimox pero una menor toxicidad.



NIFURTIMOX

Figura 4: Estructura del 4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dioxido, o Nifurtimox



BENZNIDAZOL

Figura 5: Estructura del 1-(2-(bencilamino)-2-oxoetil)-2-nitro-1H-imidazol o Benznidazol

Tanto los derivados del nitrofurano como los del nitroimidazol presentan una limitada solubilidad acuosa, lo que les otorga pobres características farmacocinéticas, sobretodo en su absorción, limitando la biodisponibilidad de estos fármacos. Se han realizado esfuerzos por incrementar la solubilidad a través de la creación de prodrogas en forma de ésteres o hemiésteres²⁹, pero pocos estudios existen con CDs y complejos de inclusión.

Recientemente se han realizado ensayos con CDs y nitroimidazoles obteniéndose buenos resultados en el incremento de la solubilidad, con constantes de asociación (K_a) en el rango de 1000 y 1900 M^{-1} . Los estudios se realizaron con tres CDs y las K_a aumentaron en el orden de HP β CD, β CD, M β CD. Esta última CD presenta una cavidad mayor que las otras dos, además de un entorno más hidrofóbico, lo que permitiría que la inclusión de la región apolar del nitroimidazol sea más efectiva aumentando su K_a . Además se observa que la adición de un polímero soluble en agua, como la polivinilpirrolidona, incrementa más aún la solubilidad del nitroimidazol, lo que podría deberse a que el polímero actúa aumentando la constante de asociación aparente del complejo³⁰.

Es por todo esto que se requiere seguir progresando en la investigación de nuevos compuestos antiprotozoarios, que por un lado tengan una solubilidad adecuada para su absorción (y la posibilidad de convertirse en formulaciones orales) y que por otro lado tengan una toxicidad reducida, con mejores índices riesgo/beneficio.

Recientemente se han desarrollado nuevos nitrocompuestos, derivados de los nitroimidazoles, como antiprotozoarios³¹. Estos son compuestos que también tienen la facultad de

provocar estrés oxidativo³² y corresponden a una rama que comienza su investigación en el control de la tripanosomiasis. Sin embargo, su solubilidad acuosa es muy limitada, por lo que no representan una ventaja frente a las otras familias en este aspecto.

De acuerdo a estos antecedentes resulta interesante realizar estudios de inclusión de estos compuestos en CDs, específicamente el 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol (Figura 6). Se espera que, debido a la estructura aromática que presenta este compuesto, se produzca la inclusión con esta región de la molécula, lo que se traduciría en un aumento de la solubilidad acuosa del 5-NI.

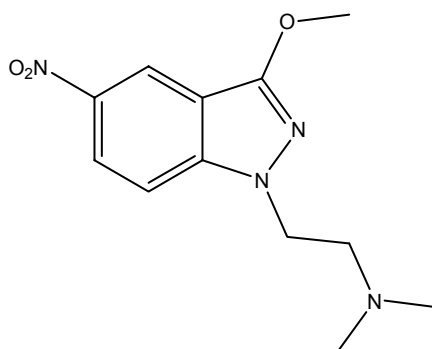


Figura 6: Estructura del 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol.

2. Objetivo General

Estudiar las características fisicoquímicas de los complejos de inclusión de 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol (5-NI) con β -CD y con 2,6-dimetil- β -CD.

Estudiar la geometría de inclusión de los complejos por RMN.

3. Objetivos Específicos

1. Formar los complejos de inclusión en solución acuosa
2. Determinar el aumento de la solubilidad del 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol por efecto de la CD
3. Determinar las constantes de asociación y la estequiometría de los complejos formados.
4. Caracterizar el 5-NI y los complejos formados por RMN
5. Determinar la geometría de inclusión de los complejos formados por espectroscopia RMN de 2D.

4. Materiales y Métodos

4.1. Reactivos

El compuesto en estudio 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol, derivado del 5-nitroindazol (5-NI) fue sintetizado por Jorge Rodríguez, alumno del programa de doctorado, y este compuesto corresponde a uno de los compuestos de su Tesis de doctorado, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

La β -ciclodextrina (β CD), heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM β CD), agua deuterada D₂O, fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich.

4.2. Equipos

Para la obtención de los espectros de absorción, se utilizó un espectrómetro de absorción UV₂ UNICAM, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm. Los barridos fueron realizados entre longitudes de onda de 250 y 700nm.

Los estudios de RMN se realizaron por medio de un espectrómetro de RMN BRUKER AVANCE DRX300. Los espectros se obtuvieron en una sonda inversa. Todos los desplazamientos químicos se estandarizaron a la señal de HDO a 4,70 ppm. Las mediciones fueron hechas con secuencias de pulso estándar BRUKER.

Los complejos fueron preparados en agua bidestilada, las soluciones se agitaron a 120 rpm en un baño de agua JULABO termoregulado a 30 °C, durante 24 horas.

4.3. Metodología

4.3.1. Asignación inequívoca de los espectros RMN para el 5-NI, β CD y DM β CD

La asignación inequívoca del 5-NI se realizó analizando las señales obtenidas en espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, y espectros de 2D COSY, ROESY, HMBC y HSQC. Para la asignación inequívoca de las CDs se registraron los espectros ^1H -RMN y HSQC.

Los experimentos en 2D HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) que correlacionan ^1H con ^{13}C , indican los enlaces C-H directamente unidos y las correlaciones entre C e H distantes, respectivamente.

4.3.2. Confirmación de la Inclusión

Para confirmar la formación del complejo de inclusión entre el sustrato, 5-NI, y las CDs investigadas se les registraron espectros de ^1H -RMN. El desplazamiento químico de las señales del 5-NI formando complejo con la CD en comparación con las del 5-NI libre y de las CDs, da cuenta de la inclusión o no del sustrato en la cavidad de la CD.

4.3.3. Determinación de la estequiometría del complejo

La estequiometría de los complejos se evaluó por la metodología de variación continua, conocida como Job Plot³³. Este método permite determinar la estequiometría del complejo basado en la variación de alguna propiedad física del sustrato, como la absorbancia, en presencia del ligante (CD). La reacción del complejo de inclusión entre 5-NI y la CD, donde no se conoce la estequiometría, queda descrita por la siguiente ecuación:



De acuerdo a la metodología, se calculan valores de $\Delta A = A - A_0$, donde A_0 y A representan la absorbancia en ausencia y presencia de CD respectivamente. Posteriormente se grafica $\Delta A[5\text{-NI}]_T$ (donde T indica concentración total) contra fracción molar, r , que se obtiene mediante la Ecuación 2, manteniendo la concentración total constante.

$$r = \frac{[5\text{-NI}]_T}{[5\text{-NI}]_T + [\text{CD}]_T} \quad \text{Ecuación 2}$$

En el gráfico, la estequiometría del complejo (n) está dada por el máximo absoluto, y queda definido por:

$$r = (n + 1)^{-1} \quad \text{Ecuación 3}$$

que es lo mismo que:

$$n = \frac{1}{r} - 1 \quad \text{Ecuación 4}$$

Para su determinación se preparan dos soluciones madre, una de 5-NI y una de CD, cada una con una concentración de 0,3 mM. Las soluciones para el método se preparan con razones molares entre 0,1 y 0,9, manteniendo una concentración total $[5\text{-NI}]_T + [\text{CD}]_T = 0,3$ mM. Se les registra su espectro de absorción UV/Vis y el análisis se realiza a la longitud de onda de máxima absorción, que corresponde a 362nm, donde la absorptividad molar (ϵ_{1M}^{1cm}) del 5-NI es $6922,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.3.4. *Determinación de la constante de asociación por la metodología de solubilidad de fase*

El método de solubilidad de fase es uno de los métodos más usados para investigar el efecto de un agente solubilizador o ligante, en este caso una CD, frente a un sustrato de baja solubilidad³⁴, en este caso el 5-NI.

Esta metodología, consiste en agregar sobre soluciones de concentración creciente del ligante, cantidades en peso del sustrato en exceso. Por agitación se disuelve el sustrato, a temperatura controlada durante un tiempo determinado, suficiente para alcanzar la nueva solubilidad en CD. Luego se filtran las soluciones para evitar que en la mezcla permanezca sólido no solubilizado e interfiera con la determinación del sustrato en solución. Finalmente se grafica la concentración total del sustrato solubilizado contra la concentración del ligante, o CD para el caso (Figura 7).

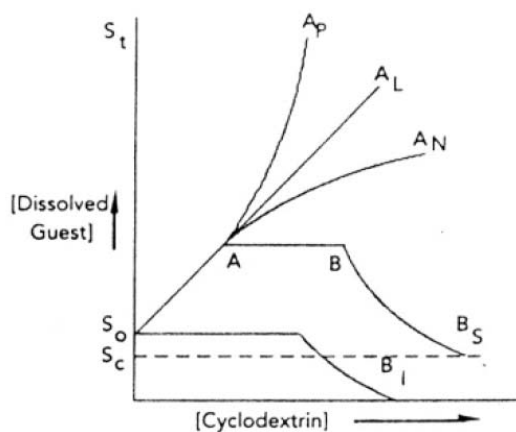


Figura 7: Diagrama teórico de solubilidad de fase.

En la Figura 7, se muestran las formas de las curvas que se pueden obtener en estos experimentos. S_t corresponde a la solubilidad del sustrato cuando varía la concentración de CD, y S_0 es la solubilidad del sustrato libre. A grandes rasgos existen dos variedades de complejos: los de tipo A son aquellos en que la solubilidad del complejo aumenta, mientras que los del tipo

B, los complejos tienen baja solubilidad. Un complejo B_S quiere decir que el complejo tiene una solubilidad máxima y un complejo B_I significa que es insoluble. Por otro lado los complejos A_L presentan un incremento de la solubilidad con un comportamiento lineal conforme aumenta la concentración de CD. Uno A_P quiere decir que el incremento se desvía positivamente de la linealidad y uno A_N negativamente. A_L supone un complejo de primer orden respecto del ligante, mientras que un complejo A_P corresponde a un orden superior. El tipo A_N puede ser explicado por alteraciones del solvente a altas concentraciones del ligante, o que el ligante se compleja consigo mismo a concentraciones elevadas.

Independiente del sistema que formen el sustrato con la CD, la ecuación de equilibrio para un complejo en que se desconoce la estequiometría, es la siguiente:



donde la constante de asociación K_a queda determinada por la expresión:

$$K_a = \frac{(S_m L_n)}{S^m \cdot L^n} \quad \text{Ecuación 6}$$

Por otro lado las concentraciones de los componentes se pueden expresar en términos de cantidades conocidas, como la solubilidad del sustrato libre (S_0), y la concentración total de ligante añadido (L_T) de la siguiente forma:

$$(S_m L_n) = \frac{S_T - S_0}{m} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$L = L_T - n(S_m L_n) \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde S_T y L corresponden a la concentración total de sustrato en solución y concentración L es la concentración de ligante libre. S^m queda definido como la S_0 ya que se espera que en solución permanezca la solubilidad máxima del compuesto libre. Con estas

expresiones, a partir de la K_a (Ecuación 6) y suponiendo una estequiometría 1:1, se puede obtener una ecuación que la relaciona con valores conocidos:

$$S_T = \frac{K_a S_o L_T}{1 + K_a S_o} + S_o \quad \text{Ecuación 9}$$

Esta expresión se comporta como una ecuación de la recta si se grafica S_T contra L_T , y el complejo es del tipo A_L . En esta recta, el intercepto corresponde a S_o , con el que se calcula K_a a partir de la pendiente de la recta, como sigue:

$$K_a = \frac{\text{pendiente}}{S_o (1 - \text{pendiente})} \quad \text{Ecuación 10}$$

De este modo, sobre soluciones con concentraciones crecientes en CD (1, 3, 5, 8 y 10 mM) se agregan cantidades en exceso de 5-NI (3 mg para β CD y 5 mg para DM β CD). Estas soluciones se agitan por 24 horas. Luego se filtran con filtros Millex-GV con membrana Durapore de 0.45 μ m y se les determina la concentración total de 5-NI (S_T) por espectroscopia de absorción UV/Vis midiendo a la longitud de onda de máxima absorción, en 362 nm ($\epsilon_{1M}^{1cm} = 6922,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La K_a se obtiene de la pendiente del gráfico de [5-NI] contra [CD], de acuerdo a la Ecuación 10.

4.3.5. *Determinación de la geometría de inclusión*

Para la determinación de la geometría de inclusión se registran los espectros 2D-ROESY que permiten establecer la correlación espacial que existe entre protones espacialmente vecinos.

Las condiciones de medición para los espectros 2D-ROESY fueron con un ancho espectral de 3000 Hz, tamaño de datos de 16K /8K, retardo de relajación de 2s, y 32 escaneos con un tiempo de mezcla de 400ms.

5. Resultados y Discusión

5.1. Asignación completa de los espectros RMN para el 5-NI

Mediante el análisis de los espectros ^1H y ^{13}C , y posteriormente el análisis de los espectros bidimensionales COSY, HSQC, HMQC y ROESY se hizo la asignación inequívoca del 5-NI.

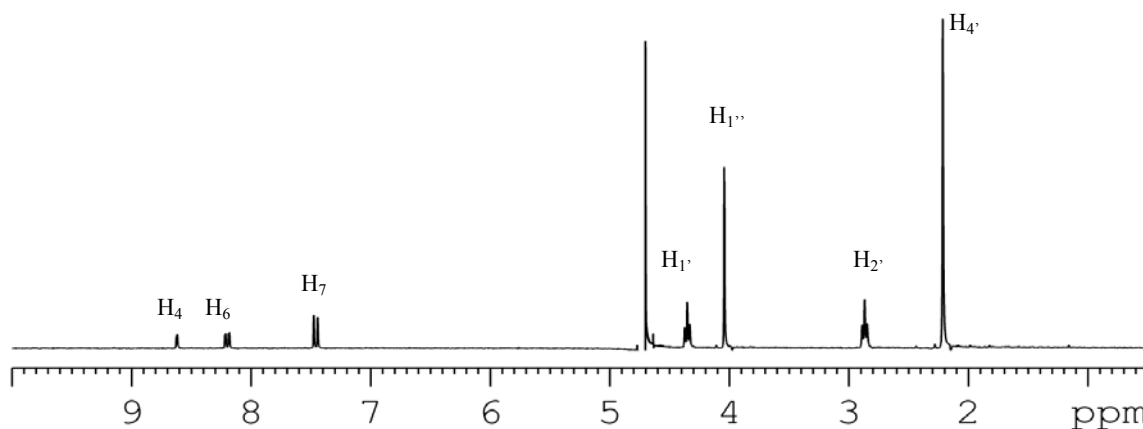


Figura 8: Espectro ^1H -RMN de 5-NI, con la asignación de cada señal a su protón. En 4,7 ppm aparece la señal del solvente.

La Figura 8 corresponde al espectro de ^1H -RMN del 5-NI en solución acuosa, donde se observa a campo bajo los tres protones aromáticos del anillo 5-nitroindazólico correspondientes a H-4, H-6 y H-7. El H-4 es un doblete que acopla con H-6 y es el que aparece más desapantallado a 8,6 ppm, por el efecto del grupo nitro vecino. H-6 es un doblete ya que acopla con H-4 y H-7, y también aparece desapantallado por efecto del grupo electroceptor vecino. H-7 es un doblete que acopla con H-6 y aparece en la región de los protones aromáticos, sin sufrir ningún efecto importante.

Entre 2,0 y 4,5 ppm se observan los protones alifáticos, distinguiéndose los dos metilos equivalentes H-4' en 2,2 ppm como un singulete que integra para 6 protones. En 4,0 ppm se observa la señal del metoxilo, que corresponde a un singulete que integra para 3 y se

encuentra desapantallado por efecto del oxígeno, y es corroborado por medio del espectro bidimensional HMBC, siendo el único carbono que no correlaciona con protones distantes, como se aprecia en la Tabla 2.

La asignación de los dos metilenos 1' y 2' se realizó por medio de la correlación de largo alcance que se establece en el espectro HMBC. El C-1', de acuerdo a la Tabla 2, correlaciona sólo con H-2', mientras que C-2' correlaciona tanto con H-1' como con H-4'. Esto determina que el C-1' es el carbono de enlace al anillo aromático, mientras que el C-2' es aquel que enlaza la amina terciaria que sostiene los dos metilos equivalentes. Lo anterior es además corroborado por el desplazamiento que se observa en el espectro de protones, donde H-1' aparece muy desapantallado, en 4,4 ppm, por el efecto del anillo aromático vecino; mientras que H-2' aparece en el rango de los metilenos unidos a nitrógeno alifático, en 2,9 ppm.

La Tabla 2 detalla los desplazamientos, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento para las señales del 5-NI en D₂O en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, de acuerdo a la numeración establecida en la Figura 11.

En la Figura 9 se observa el espectro de ¹³C-RMN con los carbonos asignados. La asignación de estas señales se realizó por medio del espectro bidimensional HSQC, que permite establecer cuáles son aquellos carbonos que enlazan a su protón correspondiente. De esta forma se puede establecer que los desplazamientos son: C-4 a 118,6; C-6 a 122,5; C-7 a 108,6; C-1' a 58,2; C-2' 47,4; C-4' a 45,7 y C-1'' a 56,5 ppm, de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2: Desplazamiento químico de las señales en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el 5-NI. Se indican las correlaciones de largo alcance C-H observadas en el espectro HMBC.

^{13}C -RMN		^1H -RMN			HMBC
Carbono	δ /ppm	Protón	J /Hz	δ /ppm	C-H largo alcance
C ₃	158,3	-	-	-	H ₄ , H _{1''}
C _{3a}	111,9	-	-	-	H ₇
C ₄	118,6	H ₄	d; 4J : 1,90	8,62	H ₆ , H ₇
C ₅	140,8	-	-	-	H ₄ , H ₆ , H ₇
C ₆	122,5	H ₆	dd; 4J : 1,90; 3J : 9,47	8,20	H ₄
C ₇	108,6	H ₇	d; 3J : 9,47	7,45	-
C _{7a}	143,0	-	-	-	H ₄ , H ₆ , H ₇
C _{1'}	58,2	H _{1'}	t; 6,50	4,35	H _{2'}
C _{2'}	47,4	H _{2'}	t; 6,50	2,86	H _{1'} , H _{4'}
C _{4'}	45,7	H _{4'}	s	2,21	H _{2'}
C _{1''}	56,5	H _{1''}	s	4,00	-

s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete

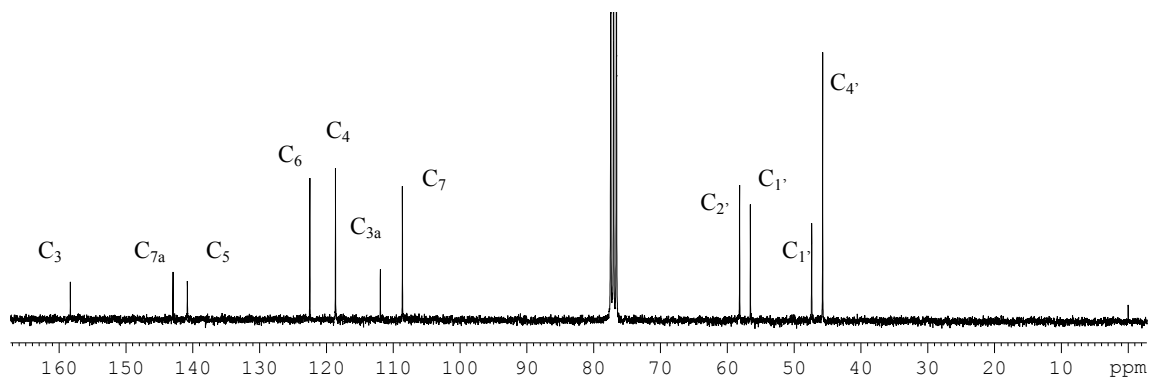


Figura 9: Espectro ^{13}C -RMN con la asignación de cada señal a su carbono.

Los carbonos cuaternarios que no tienen correlaciones visibles en el espectro HSQC, se asignan por medio del espectro HMBC, que permite correlacionar protones con carbonos a larga distancia. De este modo se establecen los desplazamientos de C-3, que acopla a larga distancia de acuerdo a la Tabla 2 con los H-4 y H-1''. El C-3a que acopla a larga distancia

con el H-7. El C-5 que acopla a larga distancia con H-4, H-6 y H-7. Por ultimo C-7a que acopla con H-4, H-6 y H-7.

La Figura 10 muestra una ampliación del espectro 2D-ROESY del 5-NI en CDCl_3 . Los 2D-ROESY correlacionan a los hidrógenos que se encuentran espacialmente próximos, presentando picos diagonales y picos de cruce simétricos.

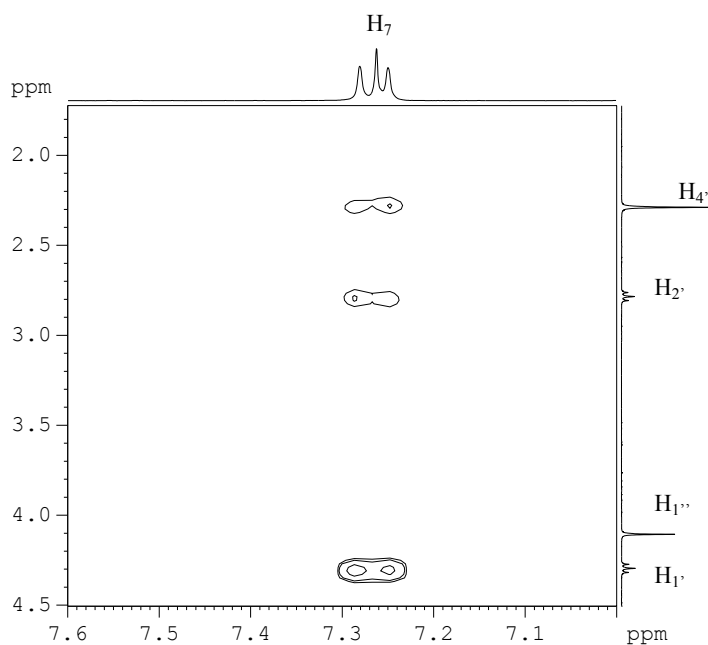


Figura 10: Espectro bidimensional ROESY del 5-NI en CDCl_3 .

Los picos de la diagonal corresponden al espectro ^1H -RMN, mientras que fuera de la diagonal y en forma simétrica aparecen picos que indican la correlación espacial que existe entre ^1H que se encuentran próximos, sin importar si son adyacentes o no estructuralmente; estos picos son llamados de cruce simétricos. Estos aparecerán cuando la distancia entre los dos ^1H sea igual o inferior a $4,0 \text{ \AA}$, y será más intensa cuanto más cercanos estén.

En la Figura 10, que corresponde a una zona del espectro ROESY, se observa una interacción que da cuenta de cómo es la estructura tridimensional que adopta el 5-NI en

solución. Los dos metilos equivalentes en 4' presentan una interacción dipolar con el H-7 que pertenece al anillo aromático y demuestra que la cadena alifática del compuesto se encuentra plegada hacia el anillo, como se aprecia en la Figura 11. H-7 es un doblete, pero se encuentra superpuesto con la señal del solvente que normalmente aparece alrededor de 7,28 ppm.

En el espectro ROESY también se obtienen resultados que corroboran la asignación de los protones, ya que se observan las interacciones escalares que se establecen entre los protones vecinos aromáticos, H-6 y H-7; y alifáticos, H-1' y H-2'.

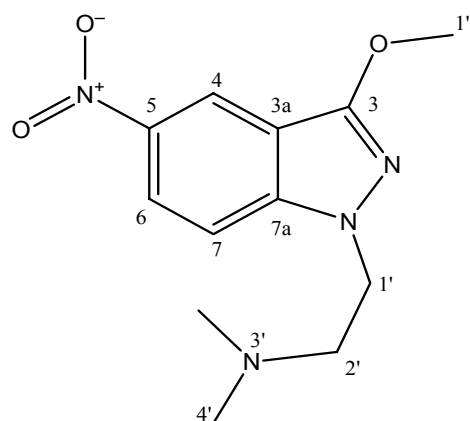


Figura 11: 5-NI con la numeración de la molécula. Las señales fueron asignadas de acuerdo a la numeración.

5.2. Resultados para el complejo entre el 5-NI y β CD

5.2.1. Confirmación de la Inclusión

En la Figura 12 se observa el desplazamiento químico de los protones aromáticos del 5-NI libre y unido a la CD. Se observa un desplazamiento a campo alto de los tres protones aromáticos debido a la formación del complejo con la β CD.

Estos protones se encontrarían incluidos en la CD, y corresponden a aquellos que representan la fracción hidrofóbica de la molécula, es decir, aquellos que son parte del anillo aromático, en las posiciones 4, 6 y 7 que se presume se encuentran al interior de la cavidad hidrofóbica de la CD. Todas las señales se encuentran desplazadas hacia campo alto, lo que indica que la inclusión provoca un apantallamiento de sus electrones. Además se observa en el espectro global de ^1H -RMN que los protones de la cadena alifática, 1', 2' y 4', también están desplazados hacia campo alto, queriendo decir que esta fracción de la molécula también se incluye, presentando una interacción con la CD.

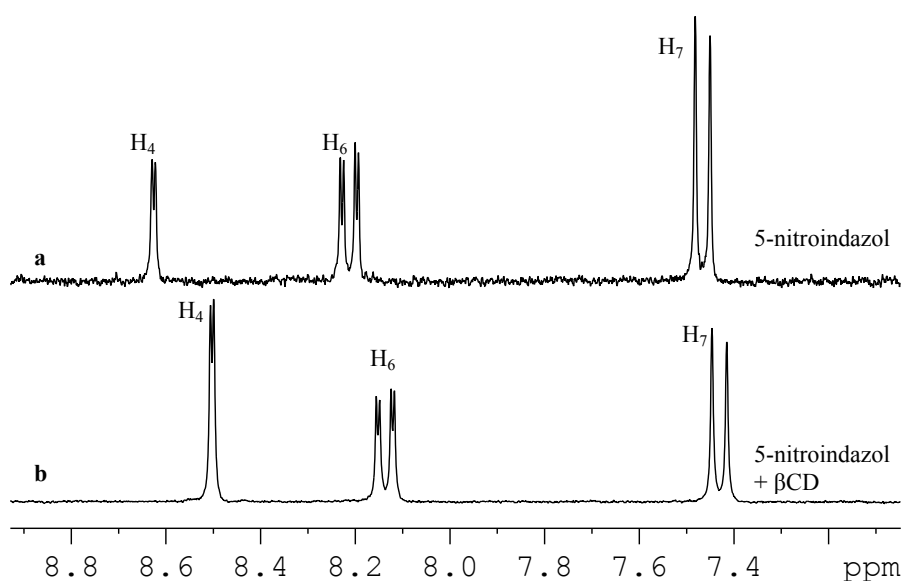


Figura 12: Espectros de ^1H -RMN. El espectro **a** corresponde a una solución de 5-NI libre. El espectro **b** corresponde a una solución del sustrato 5-NI con β CD.

La Figura 13 muestra el desplazamiento que ocurre en las señales características de la β CD cuando se encuentra libre y cuando se encuentra con el sustrato incluido.

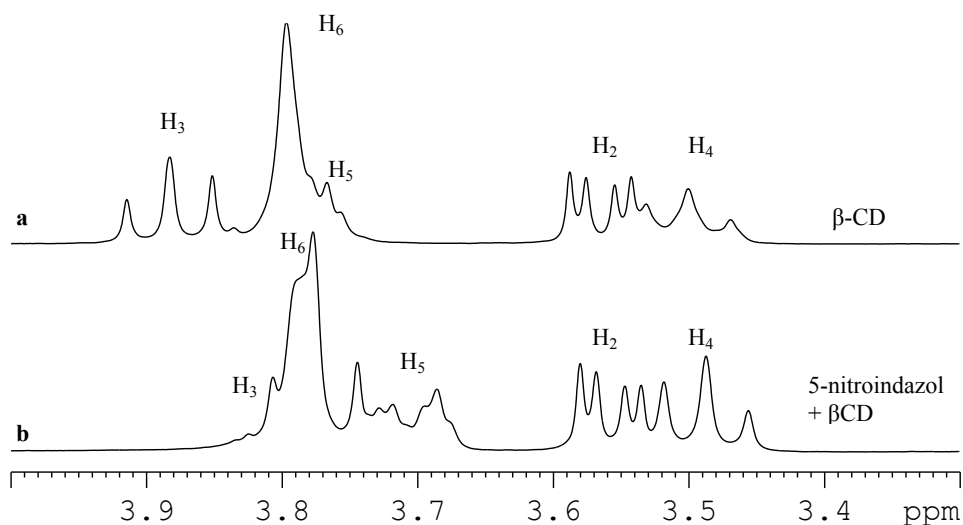


Figura 13: Espectros de ¹H-RMN. El espectro **a** corresponde a una solución de βCD libre. En el espectro **b**, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con βCD, se puede observar el desplazamiento de las señales.

Son los protones del interior de la CD, H-3 y H-5 aquellos que sufren el mayor desplazamiento. Mientras que el H-6, que se encuentra cerrando el extremo de diámetro menor de la CD tiene un desplazamiento a campo alto menor. H-3 corresponde al triplete que aparece alrededor de 3.9 ppm, y cuando se encuentra formando el complejo de inclusión, se desplaza a campo alto más allá que 3.8 ppm. Esto es provocado por el efecto anisotrópico del anillo aromático, que genera grandes densidades electrónicas que apantallan los hidrógenos del interior de la cavidad de la CD. Es por esto mismo, que también se encuentran apantallados H-5 y H-6, ya que están sometidos al efecto apantallador de los dobles enlaces conjugados y son desplazados hacia campo alto. Sin embargo, ya que el desplazamiento ocurre con intensidad decreciente desde H-3, H-5 y hasta el H-6, es muy posible que la inclusión ocurra desde la abertura de mayor diámetro hacia la de menor, apantallando con mayor fuerza H-3 y disminuyendo hacia H-6.

5.2.2. Determinación de la estequiometría del complejo

Se registraron los espectros UV/Vis de los complejos de 5-NI con β CD, variando sus fracciones molares entre 0 y 1. La concentración total, $[5\text{-NI}] + [\beta\text{CD}]$ se mantuvo constante en 0,3 mM.

En la Figura 14 se observan los diferentes espectros de absorción debidos a las diferentes fracciones molares del complejo formado entre 5NI y β CD. La determinación de ΔA se realizó en el máximo de absorción de menor energía que corresponde a la longitud de onda de 362nm.

La gráfica de $\Delta A \times [5\text{-NI}]_T$ v/s r se observa en la Figura 15. Claramente se ve que el máximo corresponde a un valor de $r = 0,5$; indicando una estequiometría para el complejo 5-NI - β CD de 1:1, de acuerdo a la Ecuación 4.

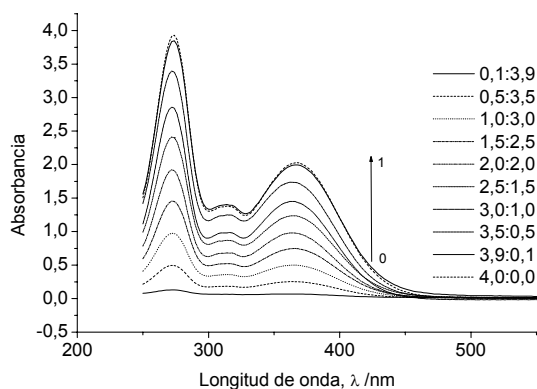


Figura 14: Espectros de absorción con variación de r . El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.

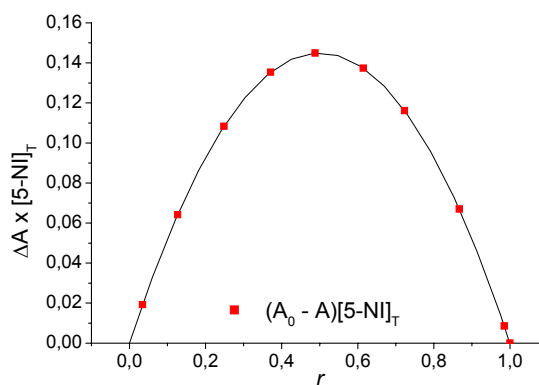


Figura 15: Gráfico de variación continua (Job Plot) del complejo (5-NI) - β CD, con máximo en $r = 0,5$.

5.2.3. Determinación de la constante de asociación por solubilidad de fase

En la Figura 16 se observa como aumenta la absorbancia de la solución en presencia de concentraciones crecientes de β CD. Esto se debe al aumento de la solubilidad del 5-NI por efecto de la formación del complejo de inclusión. La solubilidad molar del 5-NI en solución acuosa es de $1,80 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (0,476 g/L) mientras que en presencia de 0,010M de β CD llega a $4,31 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (1,140 g/L) lo que en estas condiciones, significa un aumento a más del doble de la solubilidad del 5-NI.

Según Higuchi-Connors, al graficar $[5\text{-NI}]$ contra $[\beta\text{CD}]$ (Figura 17), si se obtiene una recta, podemos decir que corresponde a un sistema A_L , lo que significa que la estequiometría del complejo formado corresponde a una complejo 1:1, que está totalmente de acuerdo a los resultados obtenidos de acuerdo al punto 5.2.2.

De acuerdo a la Ecuación 10, de la pendiente e intercepto de la recta, se obtiene la constante de asociación, K_a , con un valor de $186,5 \text{ M}^{-1}$.

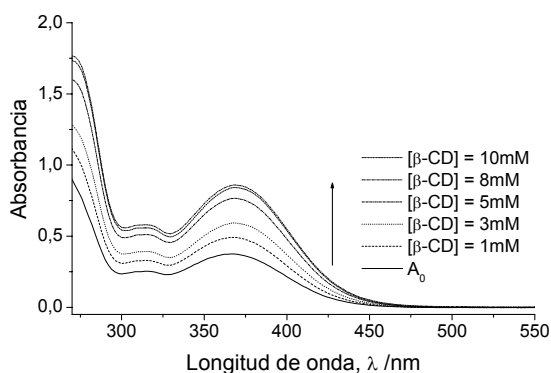


Figura 16: Espectros de absorción con aumento de $[\beta\text{-CD}]$. El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.

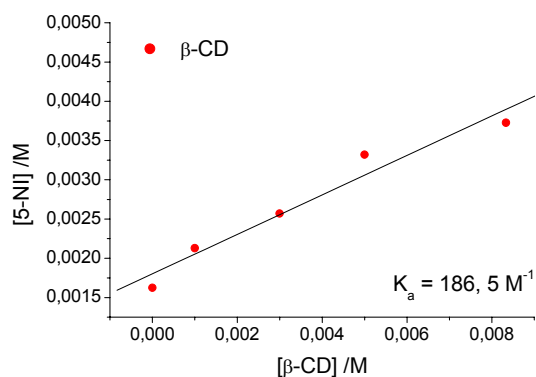


Figura 17: Gráfico del experimento de solubilidad de fase para el complejo (5-NI) – β -CD. Se observa el incremento lineal, lo que confirma la estequiometría 1:1.

5.2.4. Determinación de la geometría de inclusión

En la Figura 18 se observa la región del espectro ^1H -RMN para la βCD en D_2O , que muestra las señales de los protones 2 al 6. Para realizar la asignación de las señales se registró el espectro bidimensional HSQC, y por medio del análisis estructural de la D-(+)-glucopiranososa, se estableció la asignación de sus hidrógenos. El protón anomérico, H-1, aparece en 4,99 ppm (doblete). Luego en 3,88 ppm se observa el H-3 (tripleto), en 3,78 ppm se aprecia el H-5 (doble tripleto), casi superpuesto con H-6 a 3,80 ppm. Los hidrógenos externos de la βCD H-2 y H-4 aparecen en 3,56 ppm (doble doblete) y en 3,50 ppm (tripleto) respectivamente.

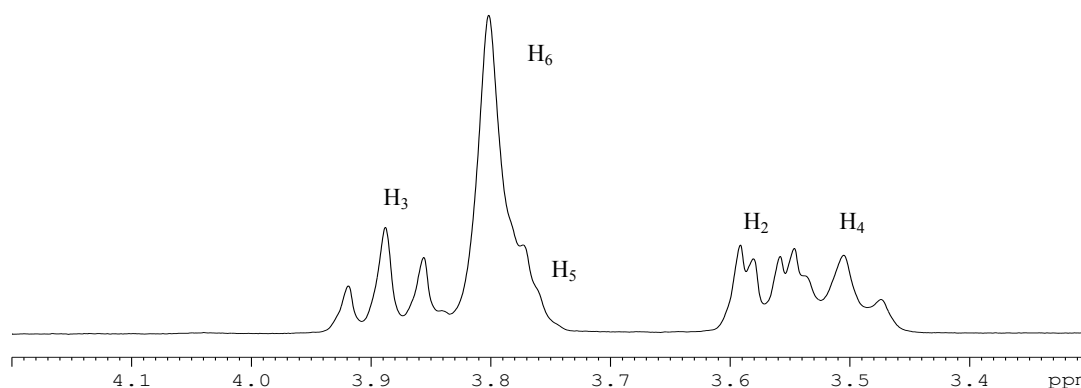


Figura 18: Espectro ^1H -RMN de la βCD en D_2O , se omite H-1, que aparece en 4,99.

De la misma forma que se hizo la asignación de los protones internos de la βCD , se realizó la asignación de los protones de la CD, pero cuando ésta forma el complejo. Es decir, se le registró un espectro HSQC al complejo para determinar los desplazamientos químicos de los protones internos de la CD al estar formando el complejo de inclusión.

Por medio del espectro bidimensional ROESY se pueden establecer cuáles son las interacciones que ocurren entre los protones del 5-NI y la βCD . De acuerdo a la Figura 19, se puede decir que el protón aromático H-4 correlaciona con los protones de la CD 3 y 5. Mientras que los protones aromáticos H-6 y H-7 del 5-NI, presentan interacciones dipolares con los protones H-6 y H-5 de la CD.

Los resultados anteriores indican que el 5-NI se incluye en la cavidad, presentando el H-4 hacia el extremo de diámetro mayor; mientras que los H-6 y H-7 se encuentran incluidos en la región de la CD que contiene los protones 5 y 6, es decir el extremo de diámetro menor.

En la Figura 20, que corresponde a una ampliación del espectro ROESY, se puede observar una correlación dipolar entre los protones alifáticos H-2' y H-4' y el protón del anillo aromático H-7, implicando que la cadena alifática se encuentra plegada hacia la región aromática, tal y como sucede cuando el 5-NI se encuentra libre en solución acuosa. Además en el espectro global se puede ver una interacción entre el H-7 y el metileno H-1' del 5-nitroindazol.

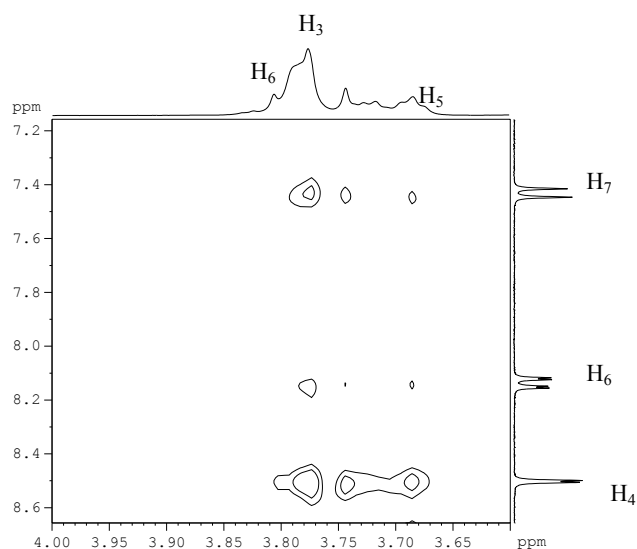


Figura 19: Ampliación del espectro 2D-ROESY para el complejo entre 5-NI y β CD en la región aromática del 5-NI.

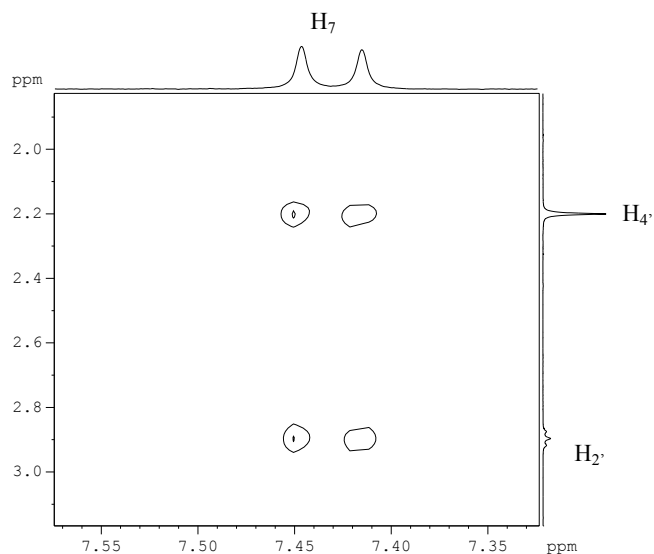


Figura 20: Ampliación del espectro 2D-ROESY obtenido para el complejo entre 5-NI y β CD en D_2O .

De acuerdo a estos resultados se puede proponer una geometría de la inclusión del 5-NI en la cavidad de la CD como se observa en la Figura 21. Esta geometría cumple con los antecedentes encontrados, ya que se observa la orientación del H-4 hacia el extremo de diámetro mayor y los protones 6 y 7 hacia la abertura de menor diámetro. También se observa que la cadena alifática del compuesto se encuentra plegada hacia el anillo aromático. Se muestra además, que la cadena alifática se encuentra incluida por la parte superior de la CD, ya que en el espectro 1H -RMN estas señales se encuentran desplazadas hacia ampo alto, significando que se encuentran al interior de la cavidad.

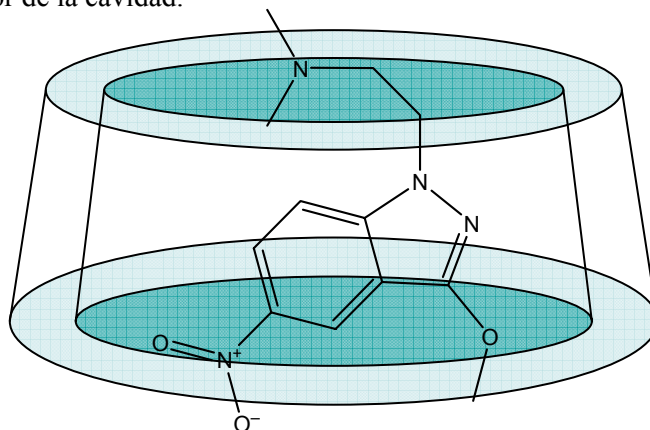


Figura 21: Estructura propuesta del complejo de inclusión del 5-NI con β CD.

5.3. Resultados para el complejo entre el 5-NI y DM β CD

5.3.1. Confirmación de la Inclusión

Se puede identificar que en los espectros del 5-NI libre y en los espectros del complejo, se produce un desplazamiento tanto de las señales del 5-NI como de las señales de la DM β CD hacia campo alto. Además, el desplazamiento observado de estas señales, resulta ser mayor que en el complejo de 5-NI con β CD, lo que indicaría que para esta CD el sustrato tiene mayor afinidad, produciendo un mayor apantallamiento sobre los protones, desplazándolos a campo alto.

En la Figura 22 se observa el espectro ^1H -RMN del 5-NI y del complejo de 5-NI con DM β CD. Se observa el desplazamiento hacia campo alto de los protones aromáticos del 5-NI cuando hay inclusión en la DM β CD. Las tres señales sufren un desplazamiento hacia campo alto por efecto de la inclusión en la CD lo que está determinado por el apantallamiento que esto produce. El máximo desplazamiento se observa para H-4 y luego H-6. A pesar de que el H-7 también se desplaza hacia campo alto, el corrimiento es bastante menor.

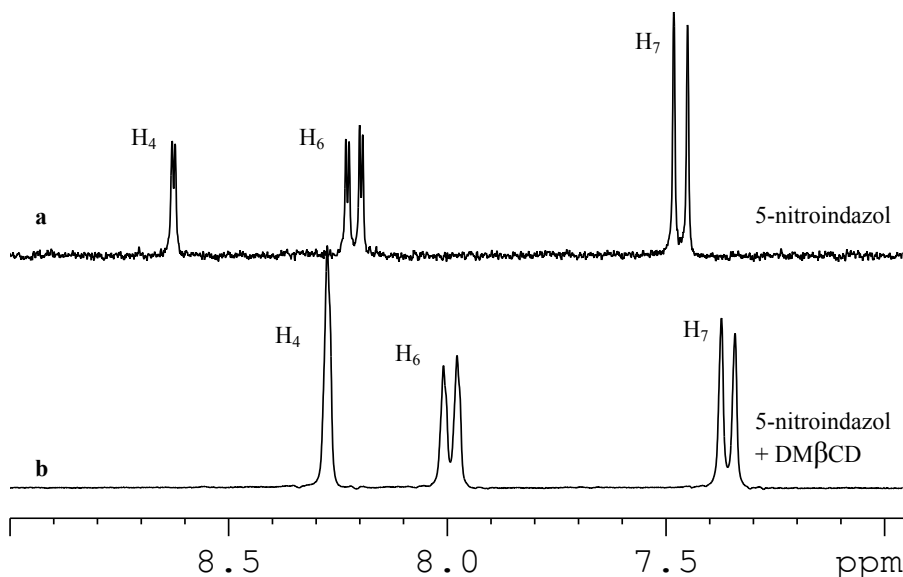


Figura 22: Espectros de ^1H -RMN. El espectro **a** corresponde a una solución de 5-NI libre. En el espectro **b**, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con DM β CD, se puede observar el desplazamiento de las señales, que confirman la inclusión del sustrato en la DM β CD.

La Figura 23, muestra los desplazamientos de los protones alifáticos del 5-NI al estar formando el complejo de inclusión con la DM β CD. Los H-1' y H-2' presentan un desplazamiento a campo alto por efecto de la inclusión, al igual que los protones de los metilos unidos a la amina. Mientras que el metoxilo no presenta desplazamiento. Esto indicaría que de alguna manera los hidrógenos interactúan con el interior de la CD, al ocurrir la inclusión, del mismo modo en que se observa para el complejo con la CD nativa.

La Figura 24 muestra el desplazamiento que ocurre en las señales características de la DM β CD cuando se encuentra libre y cuando se encuentra con el sustrato incluido.

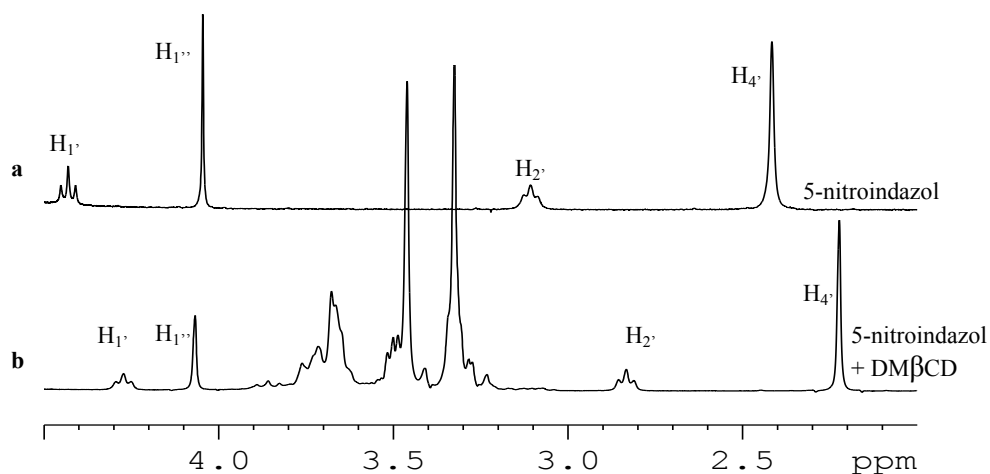


Figura 23: sección alifática de los espectros de H¹-RMN. El espectro **a** corresponde a una solución de 5-NI. El espectro **b** es una solución de 5-NI con DM β CD.

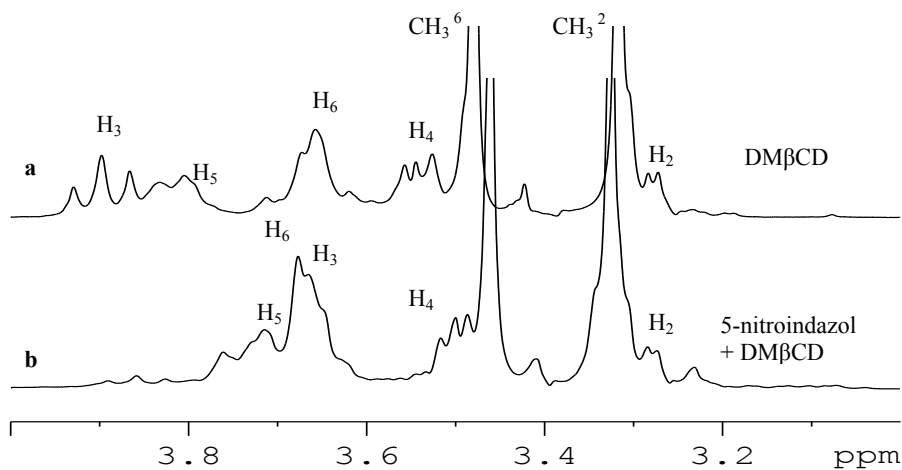


Figura 24: Espectros de ^1H -RMN. El espectro **a** corresponde a una solución de DM β CD libre. En el espectro **b**, que corresponde a una solución del sustrato 5-NI con DM β CD, se puede observar el desplazamiento de las señales.

Como se aprecia en la Figura 24, las señales que sufren mayor desplazamiento hacia campo alto son los protones que se encuentran al interior de la DM β CD, en la región hidrofóbica, y que corresponden a los H-3 y H-5. Lo anterior confirma que la molécula de 5-NI se incluye en la cavidad de la DM β CD.

El efecto de la inclusión es muy importante sobre el H-3, ya que es el protón que más se desplaza hacia campo alto. Lo mismo sucede con H-5, que se encuentra desplazado hacia campo alto. Sin embargo, H-6 sólo sufre un leve desplazamiento hacia campo bajo, casi sin ningún efecto. Esto sugiere que la inclusión debe ocurrir en la sección de mayor diámetro en el interior de la DM β CD, ya que son los protones 3 y 5 aquellos que son afectados por el anillo aromático del 5-NI.

5.3.2. *Determinación de la estequiometría del complejo*

En la Figura 25 se observan los espectros de absorción en presencia de diferentes fracciones molares de 5-NI y DM β CD, donde la fracción molar varía entre 0 y 1, y conservando la concentración total igual a 0,3 mM.

Se realiza el análisis de los datos en los máximos de absorción que corresponden a 362 nm. Del método de variación continua, se obtiene un gráfico (Job Plot en Figura 26) con el máximo para un valor de $r = 0,5$ que corresponde a una estequiometría de 1:1, de acuerdo con la Ecuación 4.

Este resultado pone de manifiesto que los complejos de inclusión que forma el 5-NI con las CDs, corresponden a complejos 1:1.

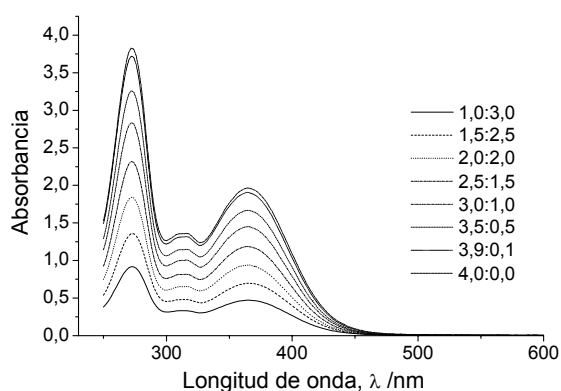


Figura 25: Espectros de absorción con variación de r . El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.

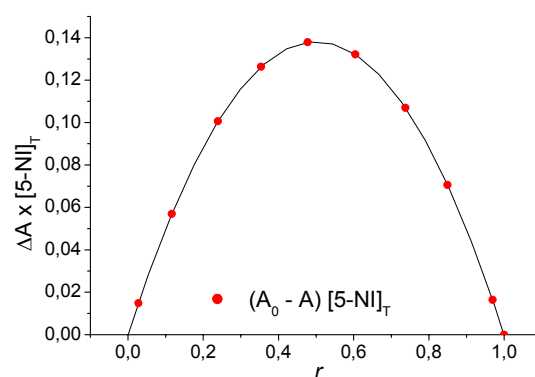


Figura 26: Gráfico de variación continua (Job Plot) del complejo (5-NI) – DMβCD, con máximo en $r = 0,5$.

5.3.3. *Determinación de la constante de asociación por solubilidad de fase*

La Figura 27 muestra los espectros de absorción de las soluciones con concentraciones crecientes de DM-CD para la metodología de solubilidad de fase.

Puesto que el complejo entre 5-NI y DMβCD es un complejo con estequiometría 1:1, el cálculo de la K_a se realizó de acuerdo a la Ecuación 10. Con este complejo la solubilidad del 5-NI aumenta a $1,05 \cdot 10^{-2}$ M (2,772 g/L) cuando la [CD] es 0,010 mM. Ya que la solubilidad del 5-NI en solución acuosa es de $1,80 \cdot 10^{-3}$ M, significaría un aumento de casi seis veces comparado con la solubilidad del 5-NI libre.

Nuevamente el gráfico de solubilidad de fase (Figura 28), confirma lo anteriormente encontrado por la metodología de variación continua. El incremento de la concentración de 5-NI es lineal con respecto al aumento de la concentración de DM β CD (A_L) lo que corresponde a una estequiometría de 1:1. Luego de la pendiente del gráfico y del intercepto, se extrae el valor de la constante de asociación K_a .

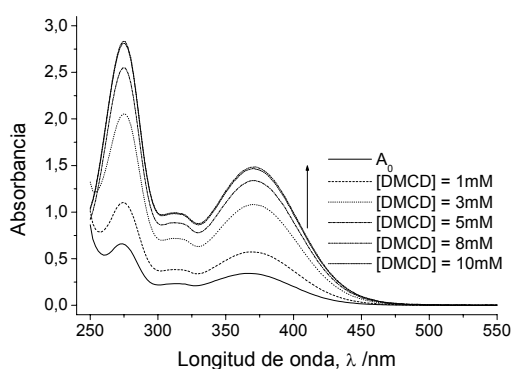


Figura 27: Espectros de absorción con aumento de [DM β CD]. El tratamiento de datos se realizó a una λ de 362nm.

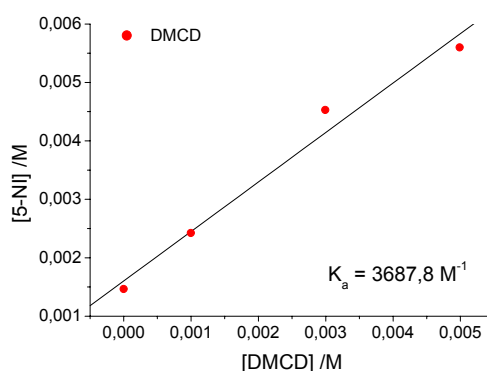


Figura 28: Gráfico del experimento de solubilidad de fase para el complejo (5-NI) – DM β CD. Se observa el incremento lineal, lo que confirma la estequiometría 1:1.

El valor obtenido de K_a , $3687,8 \text{ M}^{-1}$, es un valor muy superior al de la constante de asociación que presentó la β CD. Esto está en relación con la estructura de la DM β CD, ya que presenta en los carbonos 2 y 6 grupos metoxilos, que le confieren un mayor tamaño en su cavidad interna, permitiendo que el 5-NI sea incluido más efectivamente. Además estos metoxilos hacen que el ambiente en que será añadido el sustrato sea más hidrofóbico, incluyendo mejor el fragmento aromático de la estructura.

El aumento de la cavidad explica los resultados obtenidos por medio de los espectros de ^1H -RMN, ya que coincide con que la molécula se encuentra en mayor parte incluida en la CD, estableciendo un complejo con alta asociación.

5.3.4. Determinación de la geometría de inclusión

La Figura 29 corresponde al espectro de ^1H -RMN de la DM β CD en D_2O . Sólo se muestran los protones 2 al 6, y las señales de los grupos metoxilos.

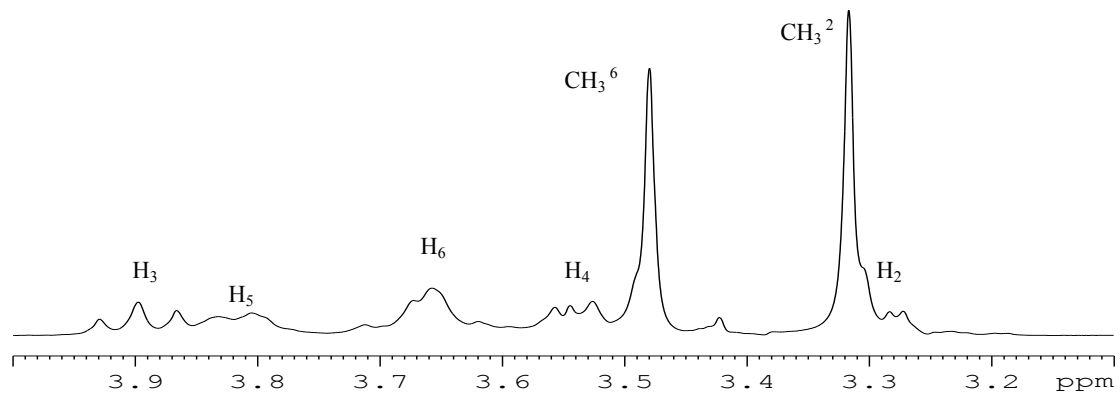


Figura 29: Espectro ^1H -RMN de la DM β CD en D_2O , H-1 aparece en 5,16.

Por medio del espectro 2D-HSQC (Figura 30) que correlaciona los carbonos con los protones directamente unidos se realizó la siguiente asignación de las señales de la DM β CD: el protón anomérico H-1 aparece a 5,16 ppm (doblete). En 3,89 ppm se observa la señal del H-3 (triplete), luego el H-5 a 3,81 ppm (doble triplete) y el H-6 a 3,65 ppm. Las señales de H-2 y H-4 aparecen casi superpuestas con las de los metilos 2 y 6 a 3,54 ppm (doble doblete) y a 3,29 ppm (triplete) respectivamente.

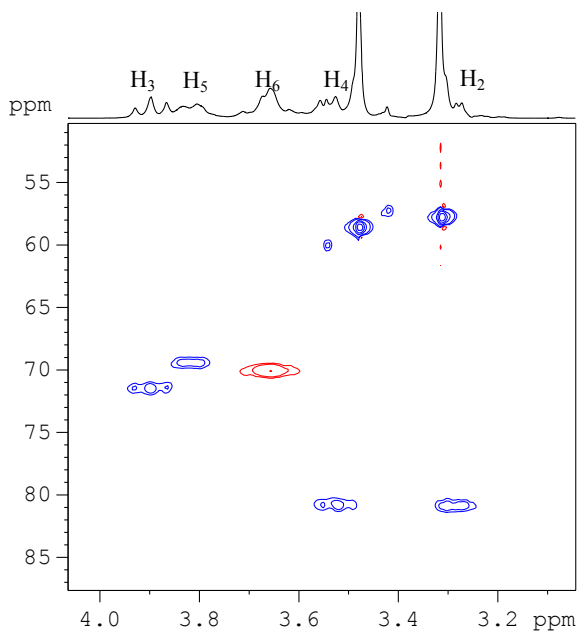


Figura 30: Espectro 2D-HSQC de la DMβCD en D₂O.

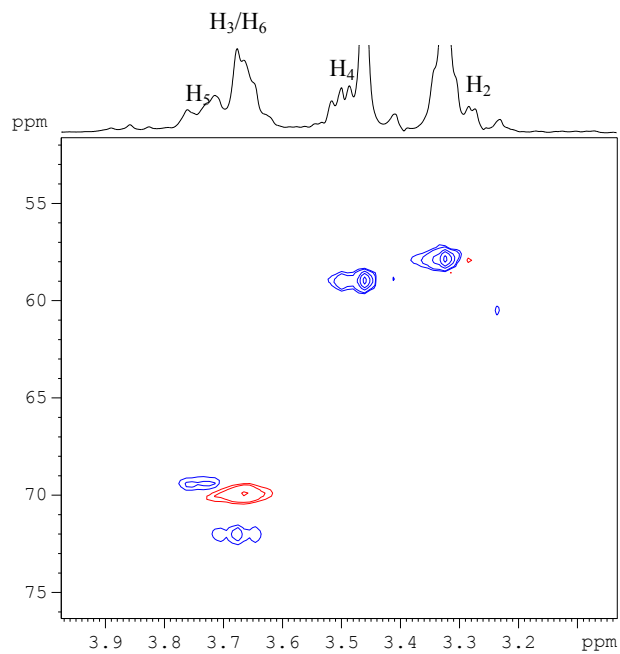


Figura 31: Espectro 2D-HSQC del complejo entre 5-NI y la DMβCD en D₂O.

La Figura 31 corresponde al espectro 2D -HSQC del complejo formado por el 5-NI y la DMβCD. Este espectro permite asignar inequívocamente las señales de los protones 3, 5 y 6 de la CD, y permite reconocer los hidrógenos metilénicos que aparecen con fase contraria a los metilos y metinos, de modo que H-3 aparece a 3,67 ppm, H-5 a 3,73 ppm y H-6 a 3,66 ppm.

La Figura 32 es una ampliación del espectro 2D-ROESY, en la región de picos de cruce entre los protones de la DMβCD y los protones aromáticos del 5-NI. Se observa que existe una interacción dipolar entre los protones 4, 6 y 7 del sustrato con la señal de la DMβCD, en la que se superponen las señales de los protones 3 y 6 de la DMβCD. Sin embargo, de acuerdo a los corrimientos observados de estos dos protones, el que tiene mayor desplazamiento es el H-3, mientras el H-6 prácticamente no se desplaza al formar el complejo de inclusión. En base a esto, podemos suponer que serían los H-3 aquellos que interactuarían con el 5-NI y, por lo tanto, que la inclusión es por el lado ancho de la CD. Además se puede observar que el H-4 del 5-NI interactiona con el H-5 de la DMβCD, sugiriendo que esta región del compuesto se encuentra más incluida en la cavidad.

Se puede observar también, que existe una interacción entre H-7 y el metileno 1' de la cadena alifática. Sin embargo, en el espectro no aparecen las correlaciones entre H-2' y H-4' alifáticos que se podían ver en el complejo 5-NI- β CD. Estos dos hechos indican que el 5-NI se encuentra con su cadena alifática no tan plegada como en el complejo 5-NI- β CD, tan sólo presentando una interacción entre los protones más próximos de la cadena lateral, cuando está formando el complejo de inclusión con la DM β CD. También, debido a los desplazamientos observados en el espectro ^1H -RMN de estos protones, la cadena alifática debiera encontrarse incluida en la cavidad de la CD.

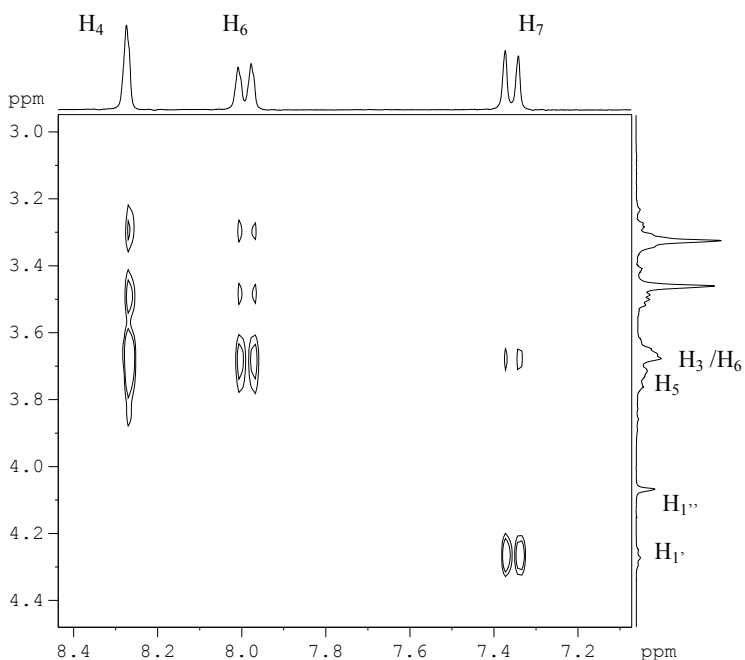


Figura 32: Ampliación del espectro 2D-ROESY obtenido para el complejo entre 5-NI y DM β CD en D₂O.

Todos estos antecedentes nos permiten proponer una geometría de inclusión que considera la interacción de los protones 4, 6 y 7 del anillo aromático del 5-NI con el H-3 de la DM β CD y la interacción entre el H-4 del sustrato con el H-5 de la CD, como se puede observar en la Figura 33. Aunque la inclusión parece ser por el lado más ancho de la CD, el compuesto se ubica casi por completo dentro de la cavidad, ya que la cadena alifática, que está menos plegada hacia la región aromática del 5-NI, se encuentra incluida en la cavidad, interaccionando con el interior de la CD, razón por la que se observan desplazadas estas señales en la Figura 23. Por

otro lado el metoxilo queda por fuera de la abertura más estrecha de la CD, por lo que no presenta una interacción con protones del interior, y es consistente con los resultados obtenidos.

Aunque la evidencia pareciera ser muy similar, los complejos que forma el 5-NI y las dos CDs estudiadas, son diferentes. Esto se determina gracias a que en el espectro 2D-ROESY, sólo para el complejo con β CD se observa una interacción dipolar entre H-6 y la CD. Lo que quiere decir que la geometría propuesta debe permitir esa interacción. Sin embargo, en el caso del complejo con $DM\beta$ CD, la geometría propuesta debe ser consistente con que no se observe esta señal en el espectro. Así es como se estima la siguiente geometría, en que el H-6 no presente interacciones con protones de la cavidad de la CD.

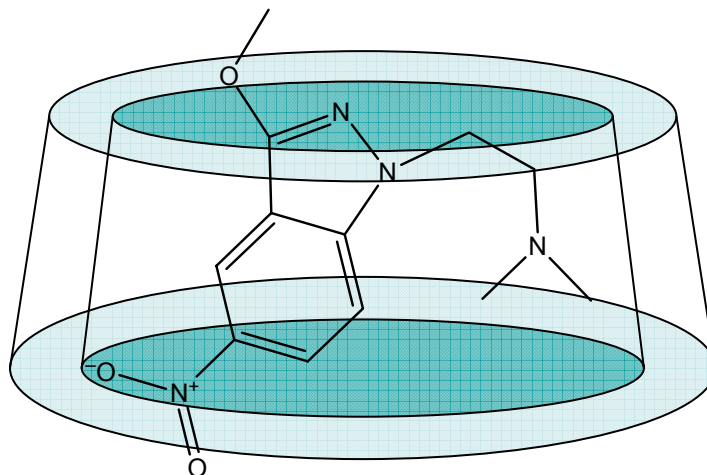


Figura 33: Estructura propuesta del complejo entre 5-NI y $DM\beta$ CD.

Tabla 3: Diferencias de los desplazamientos entre los compuesto libres y formando complejos.

Compuesto	Protón	$\Delta\delta = (\delta_0 - \delta_{\text{unido}})$	$\Delta\delta = (\delta_0 - \delta_{\text{unido}})$
		5-NI - β CD	5-NI – DM β CD
5-NI	H-4	0,13	0,35
	H-6	0,08	0,21
	H-7	0,06	0,14
	H-1'	0,08	0,16
	H-2'	0,23	0,28
	H-4'	0,23	0,20
	H-1''	-0,03	-0,02
CD	H-3	0,11	0,22
	H-5	0,08	0,08
	H-6	0,02	-0,01
Complejo	K_a	186,5 M ⁻¹	3687,8 M ⁻¹

Finalmente se presenta en la Tabla 3, las diferencias en los desplazamientos de las señales, considerando como δ_0 el desplazamiento químico de la señal en que el 5-NI se encuentra libre, y como δ_{unido} el desplazamiento de la señal cuando el 5-NI se encuentra formando el complejo de inclusión.

Con respecto a la región aromática se puede decir, que es el complejo entre 5-NI y DM β CD aquel que presenta corrimientos más importantes, lo que estaría relacionado con el carácter de la interacción entre ambas moléculas, reflejándose en una K_a mucho mayor para este complejo.

Los resultados también indican que la cadena alifática toma parte en la interacción en ambos complejos de inclusión. Sin embargo, el H-1' marca una diferencia en la interacción, ya que en el complejo con β CD, sólo se observa un leve acoplamiento, mientras que en el complejo con DM β CD el corrimiento de la señal es más marcado, hecho que corrobora lo

observado en los espectros bidimensionales. Pero, en ambos casos, la cadena alifática forma parte importante en la inclusión.

En estos complejos, la interacción entre el metoxilo y los protones de las CDs es muy menor, ya que los corrimientos son casi inexistentes, lo que se ve reflejado en las geometrías propuestas. Por otro lado, considerando los corrimientos de las señales de las CDs, se puede decir que las interacciones son principalmente con el protón 3 del interior de la cavidad, luego el protón 5 y con muy poca interacción el protón 6. Con la DM β CD se observa un corrimiento mayor, lo que estaría relacionado con las diferencias encontradas en las K_a .

Todos estos antecedentes se resumen en las geometrías de inclusión propuestas para ambos complejos, y que se observan en la Figura 34.

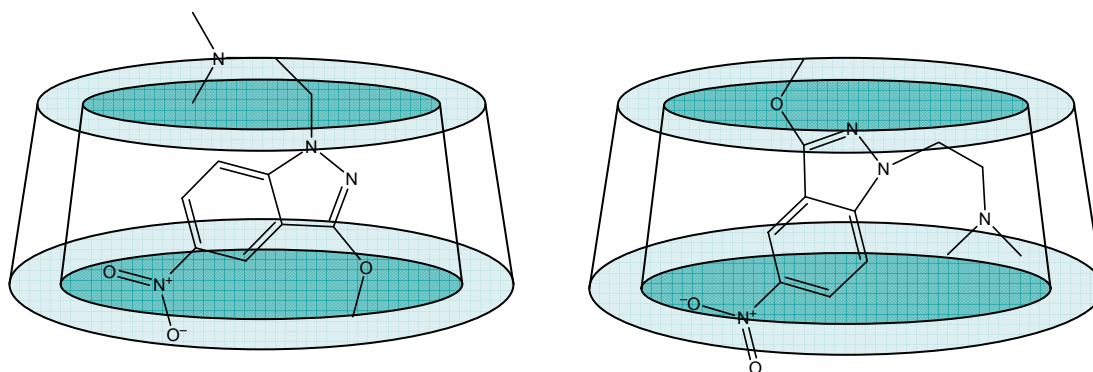


Figura 34: Comparación de las geometrías propuestas para los complejos entre el 5-NI y la β CD (izquierda) y DM β CD (derecha).

6. Conclusiones

Se confirmó que se pueden formar complejos de inclusión para el 1-(2-(dimetilamino)etil)-3-metoxi-5-nitro-1H-indazol, y se espera que derivados de la familia de los 5-NI formen similares tipos de complejos de inclusión sobre todo, por que comparten la región aromática en su estructura.

La formación de los complejos de inclusión del 5-NI con las dos CDs, nos permitió aumentar la solubilidad en fase acuosa del 5-NI.

Podemos decir que la CD derivatizada aumenta en mayor cantidad la solubilidad del 5-NI en comparación con la CD nativa.

La estequiometría para ambos complejos es de 1:1 con valores estimados de constantes de asociación de 186,5 y 3687,8 M⁻¹ para la β CD y la DM β CD respectivamente.

En los espectros 2D-ROESY se observó que el 5-NI libre en solución acuosa, se encuentra con la cadena alifática plegada hacia el protón 7 del anillo aromático.

Con esta misma metodología, RMN bidimensional, se estimó la geometría de inclusión de los complejos formados. Se observó que la inclusión del 5-NI es diferente dependiendo de la CD utilizada. Para el caso de la β CD, el grupo nitro se encuentra fuera de la cavidad por la abertura de diámetro mayor, junto con el grupo metoxilo, que no forma parte de la interacción. Por otro lado, tanto los protones aromáticos, como aquellos presentes en la cadena alifática, forman parte de la interacción. Sin embargo, el protón 1' del 5-NI presenta una interacción muy leve con la CD, lo que significaría que se encuentra fuera de la cavidad.

En el caso de la DM β CD, la inclusión del 5-NI en la CD en este caso deja hacia el exterior de la abertura mayor, a los grupos nitro y metoxilo. En este complejo la interacción ocurre con todo el resto del 5-NI, y con mayor intensidad que el complejo con β CD.

Ya que estos derivados presentan por lo general menores características farmacológicas que el nifurtimox, sería interesante ver cómo se modifica su potencia al encontrarse formando complejos de inclusión con CDs. Una de las causas de su poca potencia podría ser debida a su baja solubilidad acuosa, por lo que se esperaría que el complejo presentara mejores características que el compuesto libre en solución.

7. Referencias

- ¹ J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev* 1998, 98: 1743-1753
- ² Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R K, Cyclodextrins in Drug Delivery: An updated Review. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2005; 6(2): E329-E357
- ³ Nic M, Jirat J, Kosata B. IUPAC Compendium of Chemical Terminology (Gold Book) Electronic Version, Inclusion Compound. [en línea] <<http://goldbook.iupac.org/I02998.html>> [consulta 7 Noviembre 2007]
- ⁴ Endo T, Nagase H, Ueda H, Kobayashi S, Nagai T. Isolation, purification, and characterization of Cyclomaltodecaose (curly epsilon-Cyclodextrin), Cyclomaltoundecaose (zeta-Cyclodextrin) and Cyclomaltotridecaose (é-Cyclodextrin). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1997; 45: 532-536.
- ⁵ Endo T, Nagase H, Ueda H, Shigihara A, Kobayashi S, Nagai T. Isolation, purification and characterization of Cyclomaltooctadecaose (v-Cyclodextrin), Cyclomaltonadecaose (xi-Cyclodextrin), Cyclomaltoeicosaose (o-Cyclodextrin) and Cyclomaltheneicosaose (ã-Cyclodextrin). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1998; 46: 1840-1843.
- ⁶ Qi Z H, Sikorski C T. Controlled delivery using cyclodextrin technology. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 1999; 728: 113-130
- ⁷ Davis M E, Brewster M E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2004; 3: 1023-1035
- ⁸ Castillo J A, Canales J P, Garcia J J, Lastres J L, Bolas F, Torrado J J. Preparation and characterization of albendazole beta-cyclodextrin complexes. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1241-1248
- ⁹ Diaz D, Escobar Llanos C M, Bernad M J B. Study of the binding in an aqueous medium of inclusion complexes of several cyclodextrins involving fenoprofen calcium. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 107-110
- ¹⁰ Arias-Blanco M J A, Moyano J R, Martinez J I P, Gines J M. Study of inclusion complex of gliclazide in α -cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 18: 275-279
- ¹¹ Mura P, Adragna E, Rabasco A M, et al. Effects of the host cavity size and the preparation method on the physicochemical properties of ibuprofen-cyclodextrin systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 279-287
- ¹² Tros de Ilarduya M C, Martin C, Goni M M, Martinez-Oharriz M C. Solubilization and interaction of sulindac with beta-cyclodextrin in the solid state and in aqueous solution. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24: 301-306.
- ¹³ Zarzycki P K, Lamparczyk H. The equilibrium constant of β -cyclodextrin-phenolphthalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 18: 165-179

-
- ¹⁴ Dalmora M E A, Oliveira A G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. *Int J Pharm.* 1999; 184: 157-164
- ¹⁵ Diaz D, Bernad M J B, Mora J G, Llaons C M E. Solubility, ¹H-NMR, and molecular mechanics of mebendazole with different cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 111-115
- ¹⁶ Chowdary K P R, Nalluri B N. Nimesulide and beta-cyclodextrin inclusion complexes: physicochemical characterization and dissolution rate studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000; 26: 1217-1220
- ¹⁷ Pose-Vilarnovo B, Perdomo-Lopez I, Echezarreta-Lopez M, Schroth-Pardo P, Estrada E, Torres-Labandeira J J. Improvement of water solubility of sulfamethizole through its complexation with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin—Characterization of the interaction in solution and in solid state. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 13: 325-331
- ¹⁸ Tasic L M, Jovanovic M D, Djuric Z R, The influence of beta-cyclodextrin on the solubility and dissolution rate of paracetamol solid dispersions. *J. Pharm Pharmacol.* 1992; 44: 52-55
- ¹⁹ Miyazawa H, Ueda H, Nagase T, Endo T, Kobayashi S, Nagai T. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci.* 1995; 3: 153-162
- ²⁰ Loftsson T, Stefansson E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug Dev Ind Pharm.* 1997; 23: 473-481
- ²¹ Rajewski R A, Stella V J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci.* 1996; 85: 1142-1168
- ²² Nicolazzi C, Venard V, Le Faou A, Finance C. In vitro antiviral activity of the gancyclovir complexed with beta cyclodextrin on human cytomegalovirus strains. *Antiviral Res.* 2002; 54: 121-127
- ²³ Babu R, Pandit J K. Effect of aging on the dissolution stability of glibenclamide/beta-cyclodextrin complex. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1215-1219
- ²⁴ Li J, Guo Y, Zografi G. The solid-state stability of amorphous quinapril in the presence of beta-cyclodextrins. *J Pharm Sci.* 2002; 91: 229-243
- ²⁵ Singla A K, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm.* 2002; 235: 179-192
- ²⁶ Apt W, Heitman I, Jercic M, Jofré L, Muñoz P, Hauck I, San Martín A, Sapunar J, Torres M, Zulantay I. Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas. *Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas.* Chile. 2006. 5
- ²⁷ Olea A. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea] <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [consulta: 20 Octubre 2007]
- ²⁸ OMS Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. Ginebra, 2002

-
- ²⁹ Mahtoz N M, Eadl T A, Diab A K. Metronidazole twin ester prodrugs: synthesis, physicochemical properties, hydrolysis kinetics and anti-giardial activity. *Eur J Med Chem.* 1998; 33: 675–683
- ³⁰ Chadha R, Jain D V S, Aggarwal A, Singh S, Thakur D. Binding constants of inclusion complexes of nitroimidazoles with β -cyclodextrins in the absence and presence of PVP. *Thermo Acta.* 2007; 459: 115-115
- ³¹ Arán V J et al. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13: 3197-3207
- ³² Olea-Azar C, Cerecetto H, Gerpe A, González M, Arán V J, Rigol C, Opazo L. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochimica Acta Part A.* 2005; 63: 36-42
- ³³ Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann Chim* 1928; 9: 113-203
- ³⁴ Higuchi T, Connors K A, Phase-solubility techniques. *Adva. Anal. Chem. Instr.* 1965; 4: 212-217