



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

**CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y REACTIVIDAD CON
RADICALES DE 3,4 DIHIDROXIFENIL, 3,5 DIHIDROXIFENIL Y C-4
GALATO 1,4 DIHIDROPIRIDINAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

JUAN PABLO MORALES MONTECINOS

Profesor Patrocinante: Prof. Luis Núñez Vergara

**Directores de tesis: Prof. Juan A. Squella Serrano
Prof. Patricio Navarrete Encina
Sr. Ricardo Salazar González**

SANTIAGO-CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, quienes han sido un núcleo demasiado importante y un soporte fundamental en este proceso de vida que ha sido mi educación.... A mi padre por crear el sentido del estudio de la ciencia en mí, y por entregarme su cariño de tantas formas....

A mis hermanos, por ser tan espectaculares...

A mis Amigos por estar siempre apoyándome en todos los momentos y darme fuerzas cuando es necesario...

A Francisca por haberme enseñado que los descubrimientos más importantes son los que nos llevan a ser mejores personas...

Al profesor Luis Núñez por haberme dado esta gran oportunidad y ser un amigo desde primer año.....Al profesor Hernán Vergara por encender la llama farmacéutica en mi corazón... A Ricardo Salazar por su infinita paciencia y gran ayuda...

A Dios por haberme dado la oportunidad de existir, de conocer tantas personas en este proceso de formación y por de forma misteriosa, haberme dado tantas oportunidades...

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	9
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos.	
3.1.Objetivos generales.....	14
3.2.Objetivos específicos.....	14
4. Materiales y métodos.	
4.1. Materiales y equipos.	
4.1.1.Compuestos en estudio.....	15
4.1.2.Reactivos y solventes.....	17
4.1.3.Tampones.....	17
4.1.4.Material de vidrio.....	17
4.1.5.Equipos.....	18
4.2. Métodos.	
4.2.1.Preparación de soluciones de trabajo.....	20
4.2.2.Caracterización anódica y espectroscópica.....	21
4.2.3.Cálculo de electrones transferidos y estudio de productos finales de reacción.....	21
4.2.4.Determinación cuantitativa de la reactividad.....	23
5. Resultados y Discusión	
5.1.Caracterización del comportamiento anódico en medio acuoso.....	28
5.2.Electroquímica de los precursores de síntesis.....	39

5.3. Fundamentos para la asignación de diferentes señales de oxidación de los compuestos.....	43
5.4. Estudio por Espectrofotometría UV-Visible.....	46
5.5 Reactividad de las 1,4 DHP estudiadas con radicales libres generados a partir de ABAP.....	49
5.6. Cálculo del número de electrones transferidos.....	56
5.7. Seguimiento por cromatografía GC-MS.....	59
6. Conclusiones.....	61
7. Referencias.....	62
8. Presentaciones a congresos.....	65

RESUMEN

En la presente memoria se reporta la caracterización electroquímica y la reactividad con radicales libres, alquilo y alquilperoxilo ABAP-derivados de tres nuevas 1,4-dihidropiridinas C4-substituidas (3,4,5-trihidroxifenil-DHP, 3,4-dihidroxifenil-DHP, 3,5-dihidroxifenil-DHP).

La caracterización electroquímica fue realizada usando un electrodo de carbón vítreo en medio acuoso (Tampón 0.01 M Britton-Robinson) en todo el rango de pH (pH2-pH12). En la zona ácida (pH2-pH6) las 1,4-dihidropiridinas substituidas en la posición-4 con el grupo dihidroxifenil exhibieron dos señales anódicas bien definidas, las que corresponden a la oxidación de un grupo hidroxilo del anillo aromático y la segunda señal a la oxidación del anillo 1,4-dihidropiridina. En el caso del 3,4,5-trihidroxifenil-DHP se encontraron tres señales de oxidación, las que corresponden a la oxidación de dos grupos hidroxilo del anillo aromático y la tercera señal correspondería a la oxidación del anillo 1,4-dihidropiridina. A partir de los gráficos $\log i_p$ versus $\log v$ se puede concluir que los procesos de oxidación son controlados por difusión (pendientes gráficos > 0.5). A pH >8 , las señales de oxidación comienzan a perder resolución y la intensidad de corriente disminuye paulatinamente con el incremento de pH, en todos los compuestos.

Estudios por voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido (0,1-10 V/seg) a pH3 demostraron que tanto para el compuesto 3,4,5-trihidroxifenil-DHP como para el 3,4-dihidroxifenil-DHP, la señal anódica registrada a valores de potencial menos positivos es de carácter cuasi-reversible. Sin embargo, para el compuesto 3,5-dihidroxifenil-DHP se encontró que en todo el rango de velocidades de barrido esta señal era de carácter irreversible.

Finalmente, los tres compuestos mostraron una reactividad significativa con los radicales libres ensayados (alquilo y alquilperoxilo ABAP-derivados). 3,4,5-trihidroxifenil-DHP fue el derivado más potente, incluso exhibiendo un potencia 16.5 veces mayor que nisoldipino, una conocida 1,4-dihidropiridina comercial

ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION AND REACTIVITY WITH RADICALS OF 3,4 DIHYDROXYPHENIL, 3,5 DIHYDROXYPHENIL Y C-4 GALLATE 1,4 DIHYDROPYRIDINES

The present Thesis deals with the electrochemical characterization and their reactivity with alkyl and alkylperoxyl ABAP-derived free radicals of three new C-4 substituted 1,4-dihydropyridines (C4-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,4-dihydropyridine, C4-(3,5-dihydroxyphenyl)-1,4-dihydropyridine and C4-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-1,4-dihydropyridine).

The electrochemical characterization was performed on a glassy carbon electrode in aqueous medium (0.1 M Britton-Robinson buffer) in an extended pH range (pH2-pH12). In the acidic zone (pH2-pH6), the dihydroxyphenyl-substituted 1,4-dihydropyridines exhibited two well-defined signals in the anodic trace, which correspond to the oxidation of the hydroxyl group, - presumably due to the oxidation of the hydroxyl group on the 4 or 3/5-position of the aromatic ring- and the dihydropyridine ring, respectively. In the case of the 3,4,5-trihydroxyphenyl-DHP three anodic signals were found. Two signals corresponded to the oxidation of the hydroxyl groups of the aromatic ring and the third one would correspond to the oxidation of the dihydropyridine ring. From $\log i_p$ versus $\log \nu$ plots it can be concluded that the oxidation process is diffusion-controlled in all the compounds. At pH >8, the oxidation signals were resolved and the current intensity decreased parallel with the increase of pH for all the studied derivatives.

Cyclic voltammetric studies at different sweep rates (0,1-10 V/seg) and at pH3 revealed that for both 3,4-5-trihydroxyphenyl-DHP and 3,4-dihydroxyphenyl-DHP compounds, the anodic signal recorded at less positive potentials is of quasi-reversible character. In contrast, cyclic voltammograms corresponding to the 3,5-dihydroxyphenyl-DHP were of irreversible character at all sweep rate range.

Finally, the three new dihydropyridines exhibited a significant reactivity with both free radicals tested, i.e. alkyl and alkylperoxyl ABAP-derived radicals. 3,4-5-trihydroxyphenyl-DHP derivative was the most potent, even exhibiting 16.5 times more reactivity than nisoldipine, a commercial dihydropyridine.

1. Introducción

Las 1,4-dihidropiridinas (1,4-DHPs) son fármacos que tienen la característica de bloquear el Canal de Calcio tipo L voltaje dependiente en numerosos tipos celulares, como por ejemplo el músculo esquelético, liso y cardíaco. En consecuencia, presentan una importancia clínica significativa, lo que ha motivado su desarrollo e investigación para mejorar su aplicación en patologías cardiovasculares como la hipertensión y la angina pectoris [1].

La molécula prototipo de este grupo de fármacos es el Nifedipino (Figura 1.1). El farmacóforo de este tipo de antagonistas de canales de Ca^{+2} es el anillo dihidropiridínico y su actividad farmacológica está directamente relacionada también con los sustituyentes presentes en dicho anillo. La presencia de un grupo arilo en posición 4, potencia su actividad antagonista, la cual se ve favorecida con sustituyentes electroattractores y electrodonores, mientras que grupos éster en las posiciones 3 y 5 afectan la selectividad vascular.

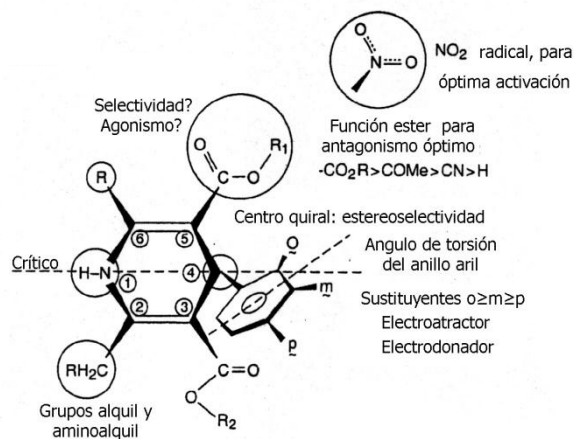


Fig. 1.1. Molécula modelo: Nifedipino. Estructura Básica de las 1,4-dihidropiridinas.

Es por esto que modificaciones estructurales pueden hacer la diferencia sobre la potencia del fármaco y la selectividad sobre los canales de calcio donde éstos actúan [2].

Por otra parte, se ha observado que en las terapias basadas en estos antagonistas del Canal de Calcio, se reducen significativamente los eventos cardiovasculares mayores y la muerte en pacientes hipertensos de avanzada edad y en diabéticos. Además, en varios estudios de tipo comparativo, el tratamiento con antagonistas de calcio es comparable en efectividad al tratamiento con diuréticos o con inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (ECA) [3].

Asimismo, las 1,4 DHPs cumplen roles activos en procesos como 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 [4].

Las 1,4 DHPs sufren una extensa y rápida biotransformación por parte de enzimas hepáticas formando el derivado piridínico como producto de la oxidación. En el caso del nifedipino también se forman metabolitos lactónicos y O-glucoronizados [5].

El estudio de la oxidación de las 1,4 dihidropiridinas constituye un desafío importante en la química orgánica moderna, y son diversos los estudios

publicados que reportan métodos de oxidación, que van desde oxidaciones químicas con nitrato férrico o cúprico, nitrato de amonio cérico, ácido nítrico entre otros. Recientemente la oxidación de derivados 1,4 dihidropiridínicos atrae el interés de investigadores debido a su reactividad con endobióticos como el óxido nítrico [6].

Es por esta razón que las técnicas electroquímicas constituyen una importante herramienta para el estudio de los procesos de oxidación de este tipo de compuestos. Estudios previos de la oxidación electroquímica de 1,4 DHPs se han realizado en medio acuoso y en diferentes solventes orgánicos como dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, N-N dimetilformamida, etc. En este medio, se ha reportado que el mecanismo de electrooxidación es de tipo ECEC, donde la primera etapa consiste en la remoción de un electrón de la molécula inicial de 1,4-DHP lo que lleva a la formación de un catión radical 1,4-DHP^{•+}. Este catión radical pierde el protón rápidamente formando de un radical neutro, Py[•], el cual se oxida a un catión dihidropiridínico -(a un potencial igual o menor que la primera etapa)-, para producir cationes Py⁺, el que pierde un hidrógeno, y luego se desprotona para formar el derivado piridínico. En medio acuoso, a pHs ácidos se observa el mismo mecanismo que en medio aprótico, en cambio en medio básico se observó un mecanismo diferente, del tipo DISP-1 [7].

En los últimos años, numerosos autores han descrito actividades antioxidantes para las 1,4 DHPs y otros bloqueadores de canales de calcio (CCBs), lo que lo

que involucraría una desactivación de los radicales libres o la preservación de la actividad de la Superóxido-dismutasa (SOD) [8].

Incluso en condiciones de hiperglicemia, se ha reportado un efecto antioxidante importante, en endotelio tratado con 1,4-dihidropiridinas, lo que sustenta que el efecto antioxidante dependería de las características moleculares de las 1,4-DHPs, debido a que el endotelio carece de Canales de Calcio del tipo L [9].

Los radicales peroxilos por su relación con numerosas reacciones en cadena, como la peroxidación lipídica o el daño sobre proteínas [10], aparecen atractivos para estudiar su reactividad con este tipo de compuestos. En esta línea se ha reportado recientemente la reactividad en medio acuoso con nuevas 1,4-DHPs C-4 fenol sustituidas frente a radicales derivados de ABAP. Se estableció una reactividad significativa hacia este tipo de radicales, estableciéndose que la reacción involucra transferencia de electrones ya que se determinó como producto final de la reacción el derivado oxidado, esto es, el derivado piridínico [11].

Por otra parte, existen diversos grupos de compuestos orgánicos con demostrada capacidad antioxidante. En todos ellos se destaca la presencia de fenoles y polifenoles. Estos grupos son electroactivos (oxidables) por lo que su caracterización electroquímica permite correlacionar sus potenciales redox con su actividad antioxidante [12,13 ,14]

La presente Memoria de Título reporta la caracterización electroquímica en medio acuoso de la 3,4 dihidroxifenil-DHP, 3,5-dihidroxifenil-DHP y 3,4,5-trihidroxifenil-

DHP. Se determina el efecto sustituyente sobre la electrooxidación de los dos centros redox presentes en la serie. También, se evalúa la reactividad de los compuestos frente a radicales alquilo y alquilperoxilos ABAP-derivados a pH 7,4, determinándose sus constantes cinéticas de reacción.

2. Hipótesis.

Electroquímicamente se ha observado que variaciones estructurales de la molécula de 1,4-DHP afectan su comportamiento redox. De esta forma cambios en el carácter secundario del nitrógeno de la posición 1 o el cambio de grupos nitroarilos en posición 4 por otros grupos, pueden afectar de forma significativa la oxidación de las 1,4-DHPs.

Por otra parte, se cuenta con numerosos antecedentes sobre la reactividad de las 1,4-DHPs frente a agentes de interés biológico como óxido nítrico (NO) o sus donores; y fisiopatológicos como especies reactivas de oxígeno (ROS), reacción directa con radicales libres que incluyen anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), catión radical ABTS, peroxilo y alquilo, ABAP derivados.

En consecuencia, se espera encontrar interesantes resultados acerca de la oxidación electroquímica de las nuevas moléculas propuestas en esta Memoria de Título, las cuales poseen grupos polifenólicos en la posición C-4 como es, el grupo 3,4 dihidroxifenil, el grupo 3,5 dihidroxifenil y el grupo 3,4,5 trihidroxifenil. Resultará muy interesante el análisis de los resultados ya que en la serie propuesta coexisten dos centros redox en la misma molécula (anillo 1,4-DHP, y grupos OHs).

Se espera además que dichos sustituyentes potencien la reactividad frente a radicales libres, ya sea participando directamente en la reacción o bien modificando la reactividad del anillo 1,4-DHP.

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

- a) Caracterizar electroquímicamente las nuevas 1,4-dihidropiridinas sintetizadas.
- b) Caracterizar su reactividad frente a radicales alquilo y alquilperoxilo ABAP derivados.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el comportamiento anódico de las DHPs en medio acuoso, sobre electrodo de carbón vítreo.
2. Implementar una metodología analítica cuantitativa para evaluar los cambios de concentración de las DHPs a fin de estudiar su interacción con los radicales alquilo y alquilperoxilos ABAP derivados.
3. Determinar las constantes cinéticas (k) para cada una de las DHP propuestas en el estudio con los radicales libres.

4. Establecer en lo posible relaciones estructura actividad.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales y equipos

4.1.1 Compuestos en estudio

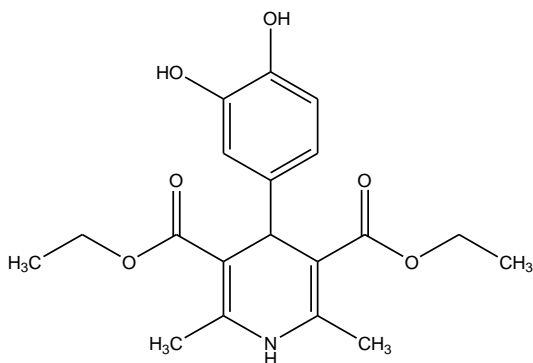
Compuesto I.

3,4-OH-DHP

2,2-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(3,4-dihidroxifenil)-1,4-dihidropiridina.

Fórmula Global: $C_{19}H_{23}NO_6$

P.M.: 361,30 g/mol



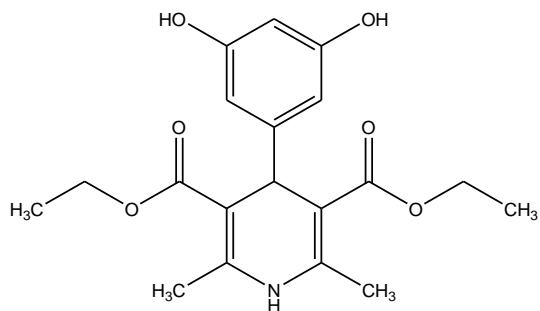
Compuesto II.

3,5-OH-DHP

2,2-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(3,5-dihidroxifenil)-1,4-dihidropiridina

Fórmula Global: $C_{19}H_{23}NO_6$

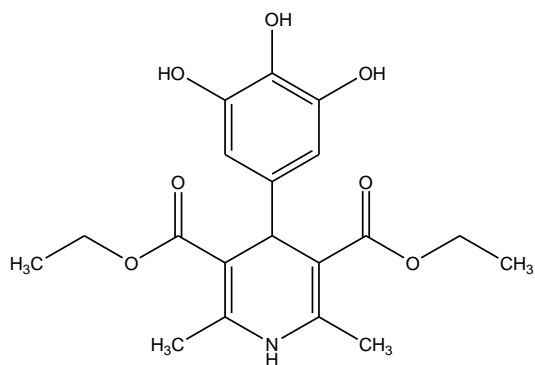
P.M.: 361,30 g/mol

**Compuesto III.****3,4,5-OH-DHP**

2,2-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(3,4,5-trihidroxifenil)-1,4-dihidropiridina

Formula global: $C_{19}H_{23}NO_7$

P.M.: 377,30 g/mol



4.1.2. Reactivos y solventes.

ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato), Aldrich.

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).

Cloruro de potasio (KCl): p.a., Merck.

Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a., Merck.

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

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

Hidróxido de sodio (pellets), Merck.

Nitrógeno extra puro, INDURA.

β -NADH, Sigma Aldrich

3,4,5 trihidroxibenceno 98%, Aldrich

3,4 dihidroxibenzaldehido 98%, Alfa Aesar

3,5 dihidroxibenzaldehido 98%, Alfa Aesar

3,4,5 trihidroxibenzaldehido 98%, Alfa Aesar

4.1.3. Tampones.

Britton Robinson 0,1M

Britton Robinson 0,04 M + KCl 0,1 M.

4.1.4. Material de vidrio.

Todo el material de vidrio utilizado fue clase A.

4.1.5. Equipos.

a) 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*.

b) Sistema voltamétrico y computacional:

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

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

Electrodo auxiliar: platino BAS MW-1032.

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

PC pentium II Gateway para adquisición de datos.

PC Intel Centrino Duo para tratamiento de datos

c) Sistema espectroscópico UV-vis:

Espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos Agilent® Technologies Chemstation.

Software Agilent® Chemstation para el control del equipo.

Pentium Intel 4 para adquisición y tratamiento de datos.

d) Cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS):

Cromatógrafo gaseoso con detector de masas Hewlett Packard 5890/5972 (Palo Alto, California, USA) y autosampler Hewlett Packard 7673.

Computador Hewlett Packard Pentium II.

Columna cromatográfica: Hewlett-Packard Ultra-1,25 m x 0,2 mm i.d. x 0,11 (Little Falls, Wilmington, Delaware, USA).

4.2 Métodos

4.2.1. Preparación de soluciones de trabajo.

a) Soluciones de 1,4-OH-DHP.

Se prepararon soluciones madre de cada 1,4-OH DHP, con una concentración constante de 0,025 M en DMSO. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución de la solución madre hasta obtener la concentración deseada. Estas soluciones se mantuvieron refrigeradas a 4 °C y protegidas de la luz para evitar su descomposición.

b) Soluciones tampón.

Solución tampón Britton Robinson 0,1 M: Preparada con 6,183 g de ácido bórico, 5,72 mL de ácido acético de densidad 1,05g/mL al 85%, 6,74 mL de ácido fosfórico de densidad 1,05 g/mL, enrasando a un volumen de 1 L con agua ultra pura.

Solución tampón Britton Robinson 0,04 M + KCl 0,1 M: Preparada con 0,248 g de ácido bórico, 2,3 mL de ácido acético de densidad 1,05g/mL al 85%, 2,70 mL de ácido fosfórico de densidad 1,05 g/ml y 7,5 g KCl, enrasando a un volumen de 1 L con agua destilada. Se obtuvo un tampón 0,04 M ajustado a una fuerza iónica de 0,1 M con KCl.

4,2,2. Caracterización anódica y espectroscópica en medio acuoso.

a) Voltametría.

En la voltametría de pulso diferencial (VPD) se utilizó como concentración 100 μM de 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. Como contraelectrodo se usó un alambre de platino y como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl.

Para las mediciones todos los compuestos fueron disueltos en DMSO para formar la solución madre, luego por dilución de ésta en tampón Britton Robinson (0,1 M) / Etanol, 70/30 se prepara la solución de trabajo. Se ajustó el pH del medio utilizando pequeñas cantidades de NaOH o HCl concentrado.

4,2,3. Cálculo del número de electrones transferidos y estudio de productos finales de reacción.

a) Cálculo del número de electrones mediante electrólisis a potencial controlado.(EPC)

Estos estudios se basaron en la electrólisis exhaustiva a potencial controlado de las tres 1,4 DHPs estudiadas. Usando una celda diseñada para tal propósito, una malla de carbón grafito como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl como

electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Para cada compuesto en estudio se realizaron varias electrólisis. Posteriormente se establecen las cargas finales sumándolas y corrigiendo la carga basal del solvente. Con la carga obtenida producto de la sumatoria y la corrección, empleando la ecuación de Faraday (ecuación nº1) se calculó el número de electrones transferidos por mol de 1,4- DHP.

$$Q_{neta} = n F e \quad (\text{ecuación.1})$$

Ecuación nº 1: Ecuación de Faraday, n = número de moles, F = constante de Faraday (96500 C / mol) y e = número de electrones.

b) Espectroscopía UV-Visible.

A partir de las soluciones madres en DMSO, se prepararon soluciones de concentración 100 µM de cada compuesto en tampón Britton Robinson 0,04 M + KCl 0,1 M 70/30 Etanol utilizando para el ajuste de pH del medio alícuotas de NaOH o HCl concentrado. Los espectros se registraron en el rango del UV vis de 220 a 750nm.

4,2,4. Determinación cuantitativa de la reactividad.

a) Cálculo de la absorbilidad molar.

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de cada DHP (entre 30 μ M y 180 μ M). Se registraron las absorbancias máximas de cada una y se calcularon las absorbilidades molares según la ecuación simplificada de la ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon b c$$

Donde,

A= absorbancia

ϵ = Absorbilidad molar

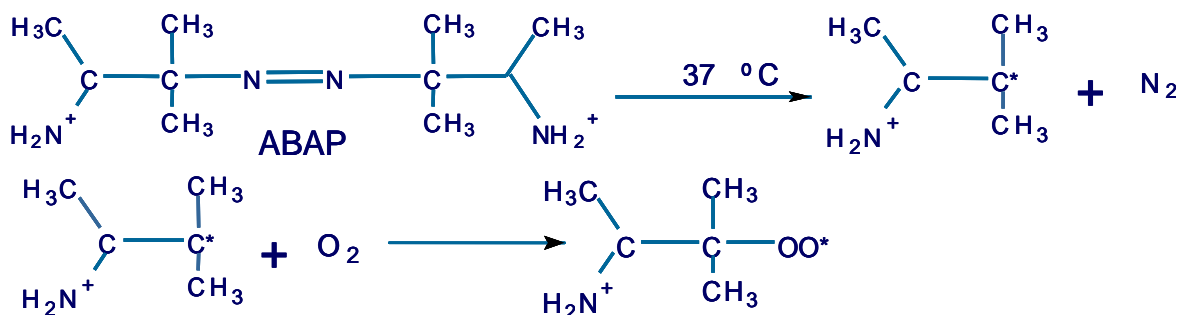
b= ancho cubeta en la cual la muestra es contenida

c= concentración del analito

b) Reactividad con radicales alquilo y alquilperoxilo

El progreso de la reacción entre los radicales alquilo y alquilperoxilo frente a las 1,4-DHPs fue seguido por espectrofotometría UV-Vis. Para generar los radicales libres se utilizó ABAP. Éste es un azocompuesto que a 37°C y pH 7,4 genera

radicales alquilo o alquilperoxilo dependiendo si se está en ausencia o presencia de oxígeno, de acuerdo a procedimiento previamente descrito. [11,15]



Esquema n°1: Formación de radicales alquilo, alquilperoxilo derivados de ABAP por burbujeo con Nitrógeno y saturación con Oxígeno respectivamente.

Se preparan soluciones 0,02 M de ABAP en tampón Britton Robinson 0,04M + KCl 0,1 M con un 30% de DMF (alquilperoxilos) o Etanol (alquilos) y luego burbujeados con N₂ y O₂ respectivamente. Finalmente se agregan las 1,4 DHPs para lograr una concentración final de la solución de trabajo de 100μM y se lleva a 37°C, registrándose los cambios en el espectro inicial.

Con el fin de comparar la reactividad de las 1,4-DHP estudiadas, se utilizó la constante cinética del NADH como referencia para establecer las relaciones que nos permitan relacionar la actividad de nuestros compuestos.

De esta forma entonces se utilizó la ley de velocidades iniciales, que establece que:

$$V = K \times [A] \times [B]$$

y en condición de pseudo-primer orden donde $[A] \lll [B]$ queda:

$$V = K' \times [B]$$

Por lo tanto:

$$V_{\text{NADH}} / V_{1,4\text{-DHP}} = (K'_{\text{NADH}} \times [\text{NADH}]) / (K'_{1,4\text{-DHP}} \times [1,4\text{-DHP}])$$

de esta forma:

$$K'_{1,4\text{-DHP}} = (K'_{\text{NADH}} \times [\text{NADH}] \times V_{1,4\text{-DHP}}) / [1,4\text{-DHP}] \times V_{\text{NADH}}$$

donde

V_{NADH} = velocidad de reacción de NADH frente a los radicales alquilperoxilo ABAP derivados

$V_{1,4\text{-DHP}}$ = velocidad de reacción de 1,4-DHP frente a los radicales alquilperoxilo ABAP derivados

K'_{NADH} = constante de pseudo primer orden del NADH frente a los radicales alquilperoxilo ABAP derivados

$K'_{1,4\text{-DHP}}$ = constante de pseudo primer orden de 1,4-DHP frente a los radicales alquilperoxilo ABAP derivados

[NADH] = concentración de NADH utilizada: 100 μM

[1,4-DHP] = concentración de 1,4-DHP utilizada: 100 μM

De esta forma, usando las constantes y concentraciones determinadas para el NADH frente a radicales alquilos y alquilperoxilos, donde $[\text{NADH}] = 105,16 \times 10^{-6} \text{M}$, $V_{\text{NADH}} = 0,04471 \mu\text{M s}^{-1}$, $K_{\text{NADH}} = 3,8 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ y $[\text{NADH}] = 105,16 \times 10^{-6}$, $V_{\text{NADH}} = 0,0314 \times 10^{-6} \text{M}$, $K_{\text{NADH}} = 1,53 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$

4,2,5. Estudio de los productos de electrólisis y reacción

Seguimiento por cromatografía gaseosa con detector de masas, GC-MS.

Condiciones cromatográficas:

Temperatura de detector: 300 °C.

Temperatura de inyector: 250°C.

Razón split: 1/10.

Presión: 13 psi

Flujo de purga: 40 mL min⁻¹.

Tiempo de purga: 0,5 mL min⁻¹.

Programa de temperatura:

La rampa de temperatura fue programada desde 130 hasta 305°C a 15°C min⁻¹. La temperatura fue mantenida a 305°C por 5 minutos.

Tiempo de corrida: 16,7 minutos.

Como carrier se utilizó Helio, inyectado con una presión de 35 kPa. El rango de masa monitoreado fue entre 45 y 550 u.m.a. con una velocidad de barrido de 1scan/s. La energía de ionización fue de 70 eV.

Después de cada experimento, las soluciones finales fueron evaporadas hasta sequedad mediante un flujo continuo de Helio y luego derivatizadas con 100 µM de N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoacetamida por calentamiento a 75°C por 30 min. Posteriormente las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo.

5. Resultados y Discusión

5.1 Caracterización del comportamiento anódico en medio acuoso.

a) Voltametría de pulso diferencial

Mediante VPD todos los compuestos presentaron señales de oxidación pH-dependientes. Como se muestra en la figura 5.1, los compuestos 3,4- y 3,5- OH-DHP presentan 2 picos bien definidos. En contraste, el compuesto 3,4,5- OH-DHP presentó 3 señales anódicas en las mismas condiciones experimentales.

En el caso del compuesto 3,4-OH-DHP, la primera señal a + 524 mV correspondería a la oxidación de uno de los OH presentes en el fenilo de la posición-4. La segunda señal se debería a la oxidación del anillo 1,4-DHP a la piridina respectiva, la cual ocurre a +1014 mV.

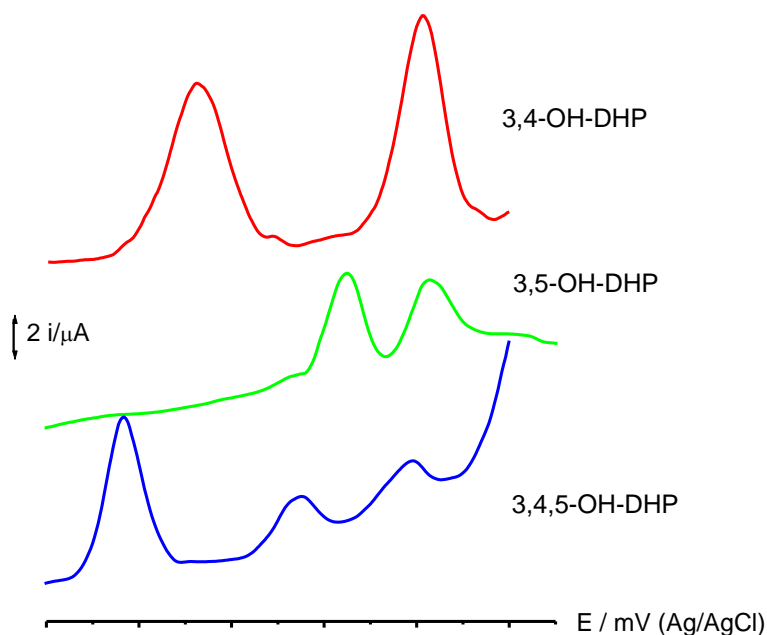


Fig 5.1. Voltamperogramas de pulso diferencial a pH3 para las DHPs estudiadas. Concentración: 100 μM , Medio: Tampón Britton Robinson/ EtOH, 70/30.

Para el compuesto 3,5-OH-DHP la respuesta es similar, observándose un pico a + 848 mV y un segundo a +1028 mV, los que corresponderían, a la oxidación de un grupo OH del anillo aromático y al anillo 1,4-dihidropiridina, respectivamente.

Por otra parte, el compuesto 3,4,5-OH-DHP mostró 3 picos anódicos, de los cuales dos corresponderían a oxidación de dos grupos OH presentes en el anillo aromático y el tercero correspondería a la oxidación de la 1,4-DHP.

A continuación se analizan independientemente los resultados obtenidos en todo el rango de pH para la oxidación de los compuestos.

3,4-OH-DHP

Este compuesto presenta dos picos anódicos bien definidos entre pH 2 y pH 7, (figura 5.2). Sin embargo, a pH 7 se observa la aparición de una nueva señal a +543 mV (*). Como se observa en la figura 5.3, a pH 8 la primera señal de + 107 mV disminuyó su intensidad de corriente, desapareciendo por completo a pH 9. Paralelamente, se observó la aparición de una nueva señal a +678 mV. Luego, a pH 10 las señales pierden definición, llegando a superponerse a pH 11. Finalmente a pH 12 las señales mejoran su definición, y el pico I aparece nuevamente a valores de potenciales menos positivos, esto es, a un potencial de + 648 mV.

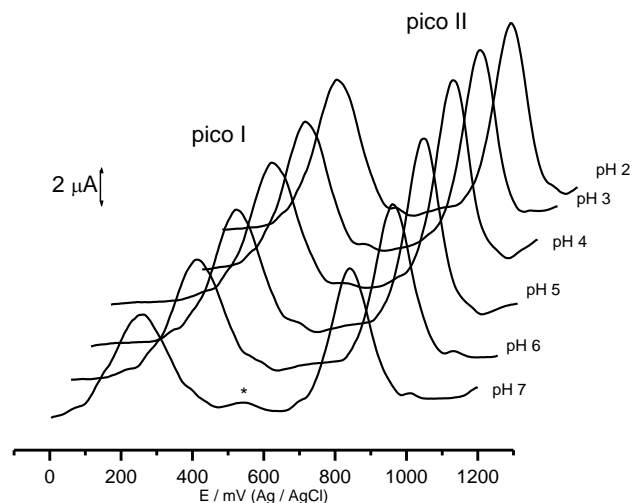


Figura 5.2. Voltamperogramas de pulso diferencial para 3,4-OH-DHP para el rango pH 2-pH 7. Concentración: 100 μM. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30 .

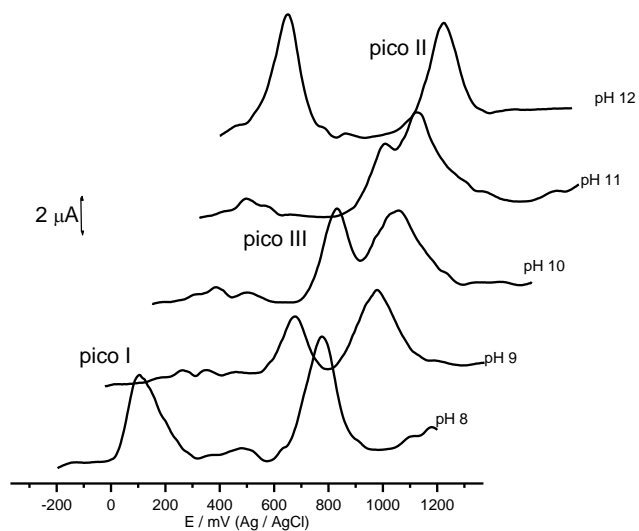


Figura 5.3 Voltamperogramas de pulso diferencial para el 3,4-OH-DHP para el rango pH8-pH12. Concentración: 100 μM. Medio: Tampón Britton Robinson/ EtOH, 70/30.

Al graficar los potenciales de pico de ambas señales *versus* el pH, podemos observar que: (a) una dependencia lineal para el pico I para el rango de pH2-pH6 (figura 5.4). A pH6 se produce un quiebre y se observa un cambio de pendiente

que se mantiene hasta pH 8. A partir del pH 9 se observa la aparición de un tercer pico cercano a los +678 mV el cual no presentó dependencia con el pH y se funde con el pico II a pH 12. (Figura 5.3). (b) El pico II presentó una dependencia lineal para el rango entre pH2-pH8.

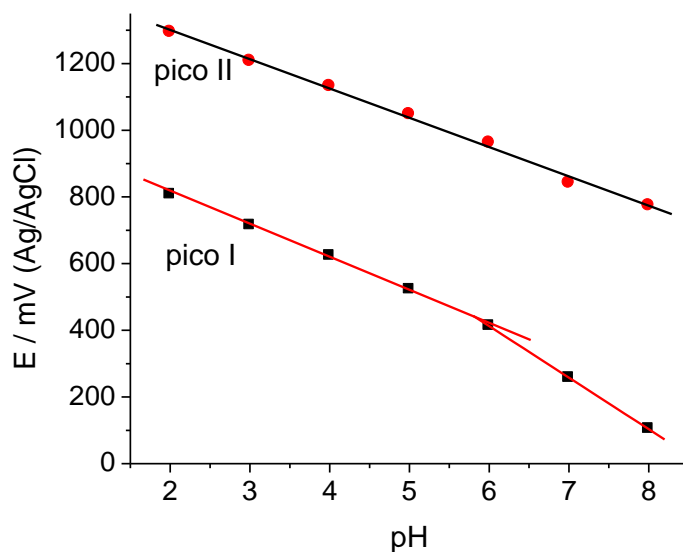


Figura 5.4. Dependencia del potencial con el pH para el pico I y II del compuesto 3,4-OH-DHP. Concentración: 100 μ M. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30

3,5-OH-DHP

Para esta DHP también se observaron 2 picos anódicos pH-dependientes, que presentaron buena definición entre pH 2-pH 5 (figura 5.5). Sin embargo, a pH > 5 el pico II pierde definición (*) y se va perdiendo paulatinamente. A partir del pH 10 la primera señal a +319 mV disminuyó en intensidad de corriente en forma progresiva entre el pH 11 y pH 12.

En todo el rango de pH estudiado, a medida que aumenta la basicidad del medio, los potenciales de oxidación de la señal correspondiente al pico I se desplazan hacia potenciales menos positivos. En consecuencia, a partir de los gráficos de E_p vs pH para el compuesto II, se concluye que el proceso de oxidación es pH-dependiente para el pico I. Al representar los potenciales de pico *versus* pH para el pico I, se observa una dependencia con dos tramos relativamente lineales (Figura 5.7).

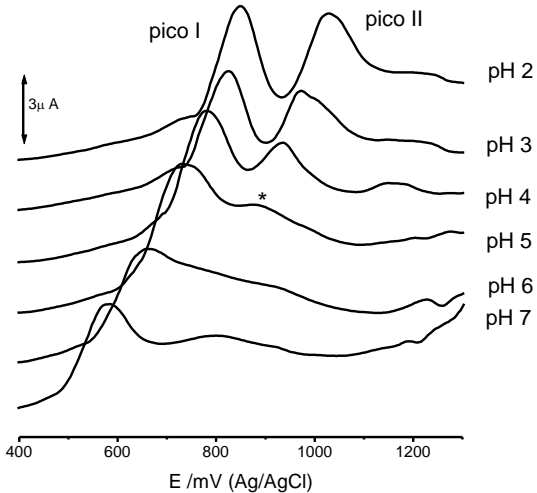


Figura 5.5. Voltamperogramas de pulso diferencial para el compuesto 3,5-OH-DHP para el rango pH2-pH 7. Concentración: 100 μM. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

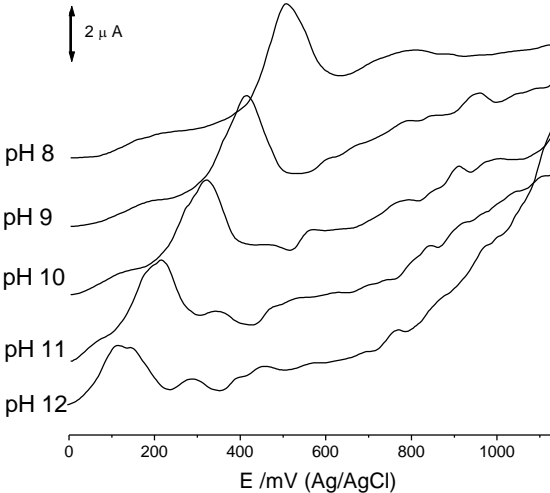


Figura 5.6. Voltamperogramas de pulso diferencial para el 3,5-OH-DHP para el rango de pH8-pH12. Concentración: 100 μM. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

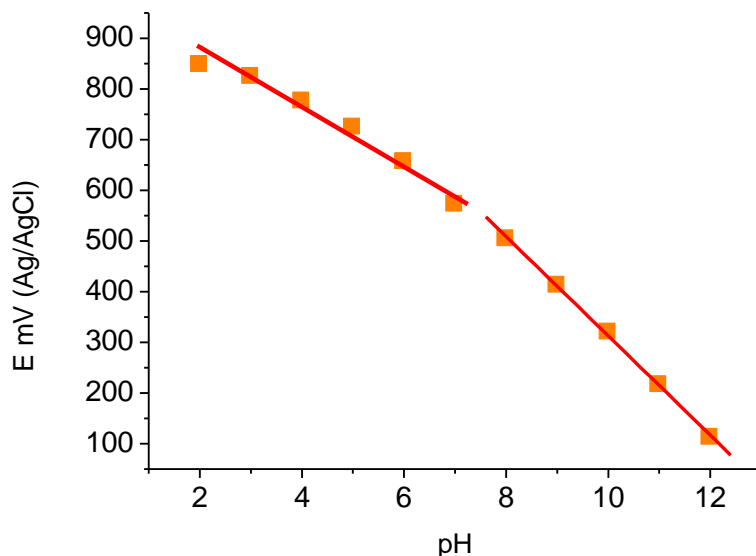


Figura 5.7. Dependencia del potencial de pico I con el pH para el compuesto 3,5-OH-DHP. Concentración: 100 μ M. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

3,4,5-OH-DHP

En medio ácido esta 1,4-DHP presentó 3 picos anódicos bien definidos. Esta respuesta podría atribuirse a la oxidación de dos de los grupos hidroxilos (pico I y II) y al anillo dihidropiridínico (pico III). Sin embargo, a medida que aumenta la basicidad del medio se va perdiendo resolución en la respuesta electroquímica de los picos II y III. Por su parte, el pico I presentó una considerable disminución en su intensidad de corriente a $\text{pH} > 8$, incluso perdiendo su definición a $\text{pH} 12$ (figura 5.9). Todos los potenciales fueron pH- dependientes (Fig 5.10)

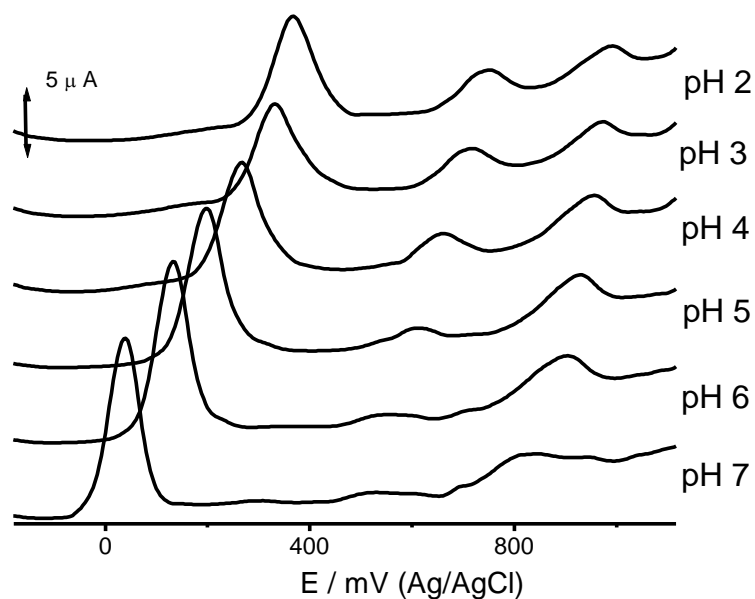


Figura 5.8. Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto III para el rango de pH2-pH7. Concentración: $100 \mu\text{M}$. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

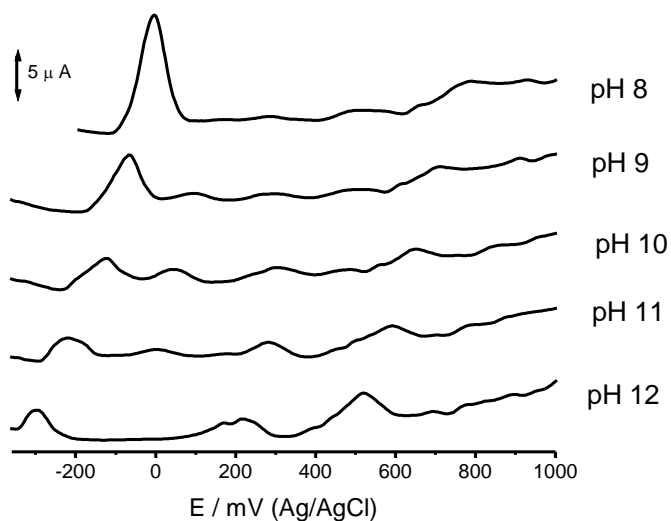


Figura 5.9. Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto III para el rango de pH8-pH12. Concentración: $100 \mu\text{M}$. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

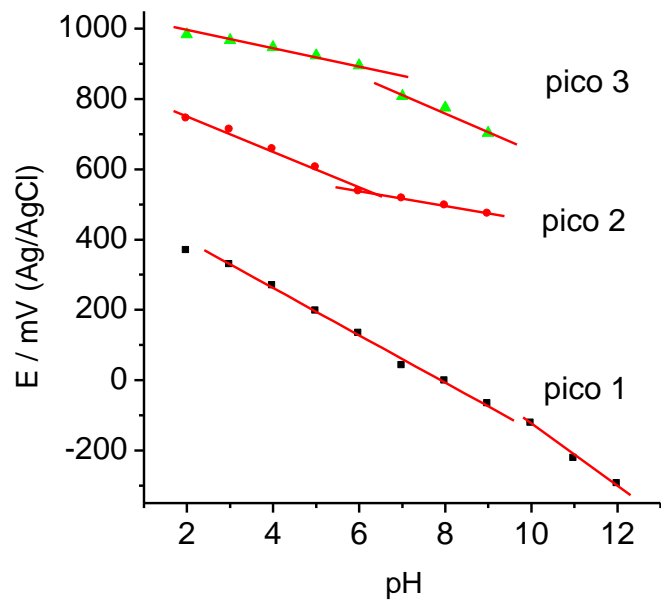


Figura 5.10. Dependencia del potencial con el pH para pico I, II y III del compuesto III. Concentración: 100 μ M. Medio: Tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30.

b) Voltametría cíclica

También se realizó un estudio por voltametría cíclica (VC) a distintas velocidades de barrido, entre 100 y 1500 mV/s (figura 5.11). Se pudo establecer que algunos de los procesos de oxidación presentan cierto grado de reversibilidad a los pH 3 y 7 para los tres compuestos. En el caso de la 3,4-OH-DHP y la 3,4,5-OH-DHP se observa la aparición de nuevas señales en la traza catódica a +186 mV y +346 mV para el primer compuesto (a) y +200 mV y +338 mV para el tercer compuesto (c).

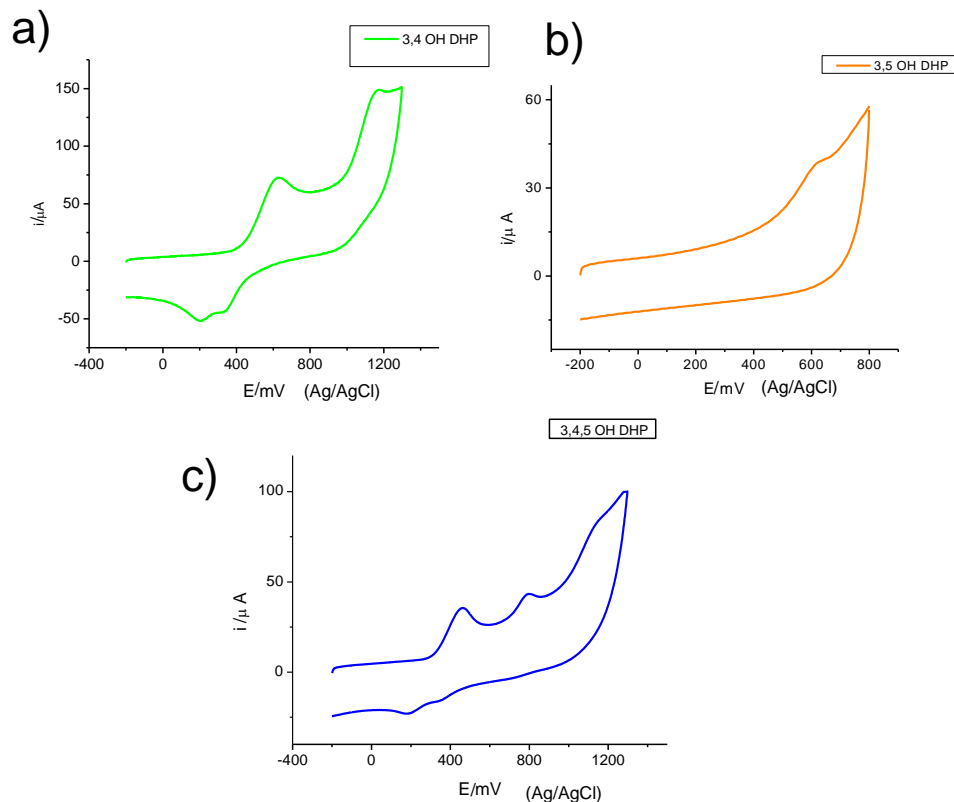


Figura 5.11 Voltamperogramas cíclicos para (a)3,4-OH-DHP, (b) 3,5-OH-DHP y (c) 3,4,5-OH-DHP a pH 3. Medio: tampón Britton Robinson 0,1M, Velocidad de Barrido: 100 mV/s

Como se observa en la figura 5.11, los compuestos 3,4 y 3,4,5 OH DHP mostraron ondas en la traza catódica, lo que significa que los productos de la oxidación están

siendo reducidos. Los valores de ΔE_p entre el pico I y las nuevas señales catódicas (*) se encuentran entre 115 y 273 mV para 3,4,5-OH-DHP y superiores a 300 mV para la 3,4-OH-DHP. Estos valores indicarían un proceso quasirreversible entre el producto de la oxidación de uno de los OHs y el compuesto inicial (Figura 5.12 A, B). Además el potencial de pico anódico depende de la velocidad de barrido lo que confirma que el proceso oxidativo es de carácter irreversible y que éste está controlado por difusión (Figura 5.13).

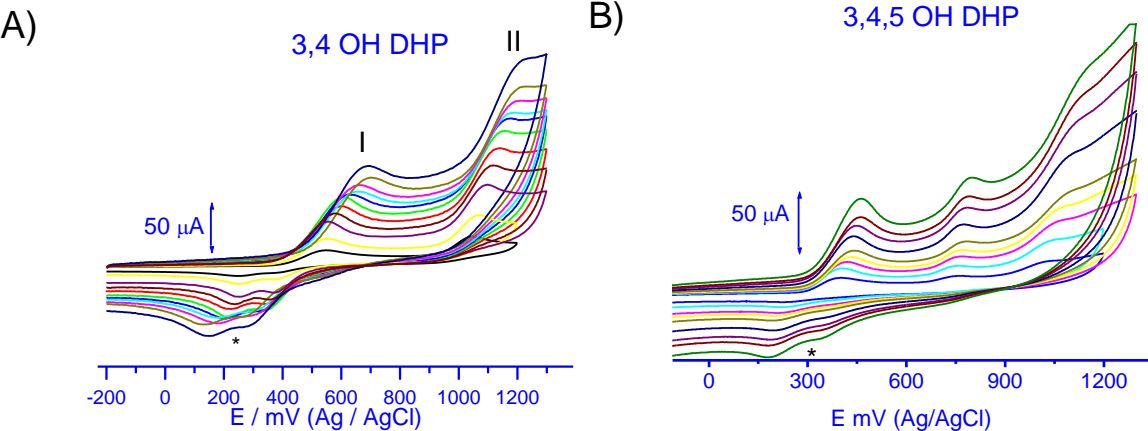


Figura 5.12. Voltamograma cíclico 100μM de 3,4 OH DHP (A) y de 3,4,5 OH DHP (B) a distintas velocidades de barrido en Buffer Britton Robinson 0,1 M EtOH 70/30 a pH3. *: Señales catódicas. Velocidad de Barrido: entre 100 y 1500 mV/s.

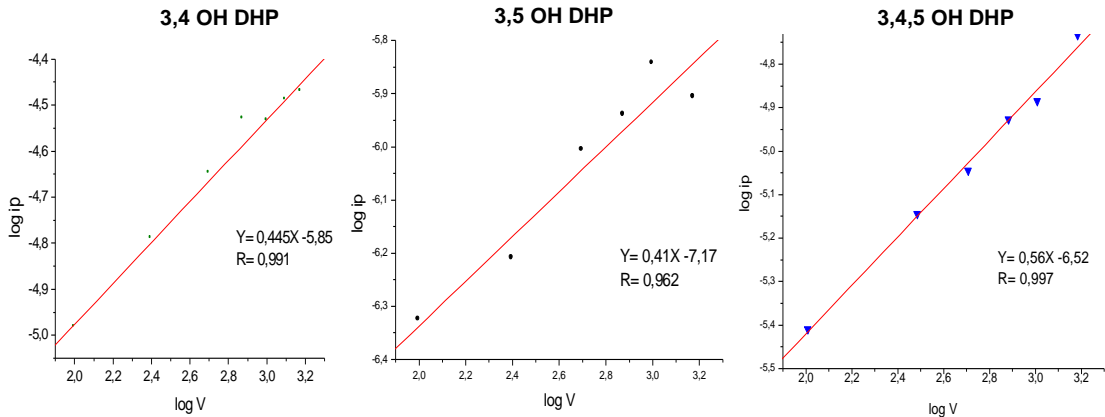
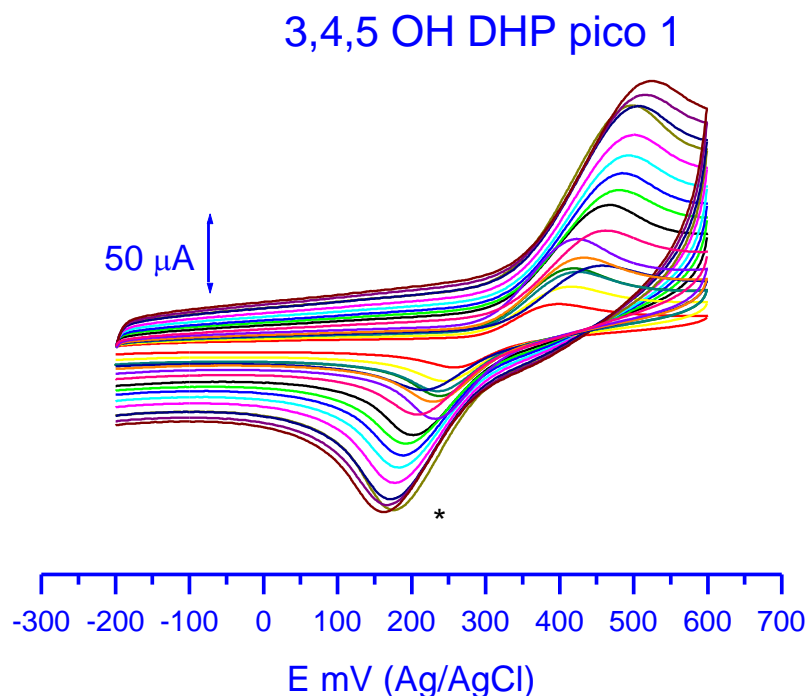


Figura 5.13. Dependencia de $\log i$ versus $\log v$ para el pico I de cada uno de los compuestos 1,4-DHP.



5.14. Voltamograma cíclico 100 μ M del pico I de 3,4,5 OH DHP a distintas velocidades de barrido en Buffer Britton Robinson 0,1 M EtOH 70/30 a pH3. *: Señal catódica. Velocidad de Barrido: entre 100 y 3000 mV/s.

En la figura 5.14 se presenta el estudio mediante VC del pico I del compuesto 3,4,5 OH DHP a diferentes velocidades de barrido. Se puede observar que a medida que aumenta la velocidad de barrido se desplaza el potencial de pico anódico y que aumenta la intensidad de corriente de la onda catódica. Los valores de ΔE_p entre las señales anódicas y catódicas es cercano a los 300 mV lo que nos corrobora lo anteriormente planteado, sobre la quasirreversibilidad del proceso entre el producto de la oxidación del primer OH y el compuesto inicial.

5.2 Electroquímica de los precursores de síntesis.

Con el propósito de realizar una mejor asignación de los grupos que se están oxidando en cada una de las moléculas, se estudió la oxidación por voltamperometría de pulso diferencial de los precursores de tipo aldehído que intervinieron en la síntesis de las 1,4 DHPs, esto es, los respectivos polifenoles los cuales carecen del anillo dihidropiridínico.

En la figura 5.15A se muestra la oxidación del 3,4-dihydroxibenzaldehído (3,4-CHO). Tal como se observa, A pH 3 éste exhibe un solo pico de oxidación próximo a los +530 mV. En consecuencia, es posible concluir que la presencia del anillo dihidropiridínico no influye de forma importante sobre la oxidación de este OH ya que la 3,4-OH-DHP también presenta su pico I de oxidación a 530 mV aproximadamente.

Como se muestra en la 5.15B el compuesto 3,5-dihydroxibenzaldehído (3,5-CHO) presentó un pico único a +450 mV correspondiente a la oxidación de uno de los grupos OH presentes en el anillo aromático. En el caso del compuesto 3,5-OH DHP, el pico asignado a la oxidación del grupo OH aparece a +848 mV. Por lo tanto, la presencia del anillo 1,4-dihidropiridínico en la molécula desplaza el potencial hacia valores más positivos en aproximadamente +370 mV. Es necesario mencionar que los compuestos mostrados en la figura 5.15 poseen un grupo aldehído el que también ejercería un efecto sobre el potencial de oxidación del OH, por lo que la comparación corresponde al efecto causado por el anillo DHP respecto al efecto provocado por el aldehído. Dichos resultados confirman lo

propuesto anteriormente para la asignación de señales. Así, el pico I corresponde efectivamente a la oxidación de uno de los grupos hidroxilo presentes en la molécula y el pico II a la oxidación del anillo dihidropiridínico. Para reforzar lo anterior, se estudió también la oxidación electroquímica de 2,2-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(3,4,5-trihidroxifenil)-1,4-dihidropiridina (Ph-DHP), en medio acuoso en las mismas condiciones experimentales que los precursores antes mencionados, obteniendo un pico de oxidación a los +814 mV.

En el caso del 3,4,5 trihidroxibenzaldehído (figura 5.15C) se encontraron dos picos anódicos, el primero de ellos a +428 mV y el segundo a +780 mV. Al comparar los valores de potencial de pico con los potenciales de oxidación correspondientes a la 1,4 DHP sustituida con este grupo, los valores disminuyen lo que quiere decir, que el grupo 1,4 dihidropiridínico favorece la oxidación respecto a un grupo aldehído en la misma posición. Los valores de potencial a pH3 de todos los compuestos descritos están resumidos en la tabla 1.

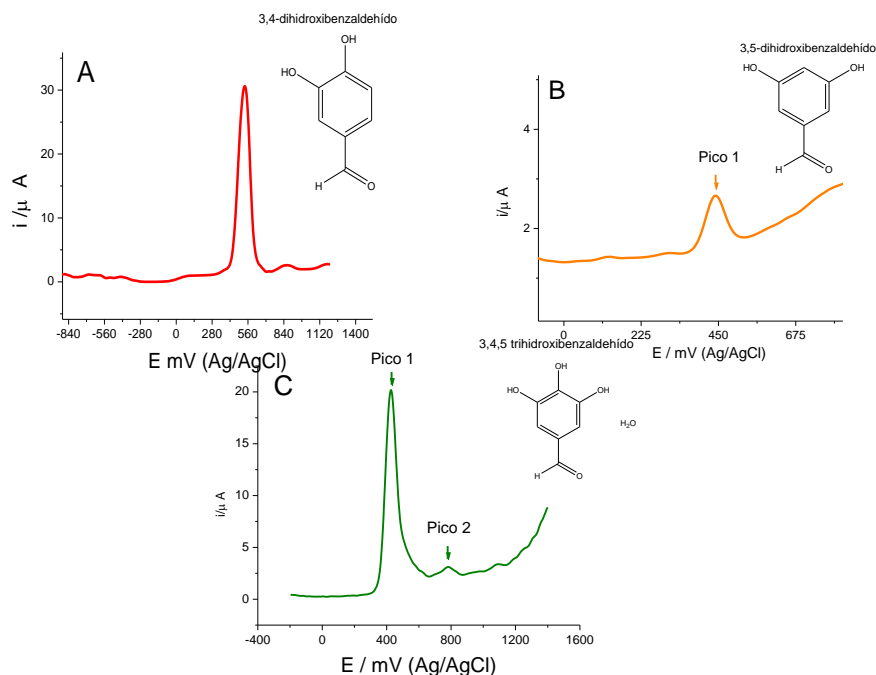


Fig. 5.15 Voltamperogramas de pulso diferencial para 3,4-dihidroxi-benzaldehído (A), 3,5-dihidroxi-benzaldehído (B) y Pirogalol (C), a pH3 en Tampón Britton-Robinson/EtOH, 70/30. Concentración: 100 μM .

En general de los tres compuestos dihidropiridínicos estudiados la 3,4,5-OH-DHP presenta menores potenciales de oxidación.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la oxidación del anillo dihidropiridínico (pico II para 3,4 y 3,5-OH-DHP y pico III para 3,4,5-OH-DHP) en comparación con la Ph-DHP (pico I), dan cuenta que la presencia de los sustituyentes electroattractores en la posición 4 dificultan la oxidación del anillo dihidropiridínico. Lo anterior concuerda con los datos de estudios anteriores [7] en donde también se observa lo anteriormente expuesto para la oxidación del anillo dihidropiridínico.

E /mV (Ag/AgCl) pH3			
	Pico I	Pico II	Pico III
3,4 OH DHP	+524	+1014**	-
3,5 OH DHP	+848	+1028**	-
3,4,5 OH DHP	+376	+740	+990**
3,4 CHO	+530	-	-
3,5 CHO	+450	-	-
3,4,5 CHO	+428	+780	-
Ph-DHP	+814**		

Tabla 1. Potenciales de oxidación de las 1,4 DHPs y los precursores del sustituyente en posición-4 a pH3 en 0,1 M tampón Britton Robinson/EtOH, 70/30. Concentración: 100 μ M. **: Pico atribuido a la oxidación del anillo 1,4 DHP.

5.3 Fundamentos para la asignación de las diferentes señales de oxidación de los compuestos.

Para fundamentar la asignación de las señales de oxidación en los compuestos estudiados, se seleccionó pH3. En esta condición se comparan primero las señales correspondientes a los aldehídos (3,4-dihidroxibenzaldehído y 3,5-dihidroxibenzaldehído) y de pirogalol (3,4,5-trihidroxifenilo), precursores del radical de la posición-4 del anillo DHP y las correspondientes a las 1,4-dihidropiridinas C-4 sustituidas. Debe considerarse que para el compuesto 3,5-dihidroxibenzaldehído, el carbonilo favorece la oxidación del grupo hidroxilo en la posición 3 y/o 5, lo cual se ve reflejado en el valor de potencial de oxidación de la Tabla 1. Tal como se observa en ésta, los potenciales de oxidación del grupo OH tuvieron los siguientes valores: +530 mV para el 3,4-dihidroxibenzaldehído y +450 mV para el 3,5-dihidroxibenzaldehído. Cuando se cambia el grupo carbonilo por un grupo dihidropiridilo sustituido, la contribución de éste sobre la oxidación de los grupos hidroxilo cambia significativamente. Así, para la 3,4-OH-DHP se favorece la oxidación del grupo OH de la posición-4, ya que el efecto dador de electrones del grupo dihidropiridilo afecta las posiciones *orto* y *para* del catecol. En el caso de la 3,5-OH-DHP la contribución es la misma, pero considerando que no hay grupo OH ocupando la posición-4 del anillo aromático, la oxidación de este compuesto resultará más difícil. Experimentalmente se encontró un desplazamiento del potencial de oxidación en aproximadamente +400 mV para el grupo OH de la posición 3 del anillo aromático tomando en cuenta que estas posiciones son equivalentes.

El compuesto 3,4,5-trihidroxi-1,4-DHP presenta tres grupos OH susceptibles de ser oxidados. Si tomamos en cuenta las consideraciones contempladas para la oxidación de las 1,4-DHP sustituidas por grupos catecólicos, podríamos entonces afirmar que el pico que aparece a +376 mV correspondería a la oxidación del grupo OH de la posición-4 del anillo aromático. En cambio, la señal de +740 mV correspondería a la oxidación del grupo OH de las posiciones 3 ó 5 del anillo aromático. Ahora bien, si analizamos el efecto del grupo catecol (3,4 ó 3,5) sobre la oxidación del anillo 1,4-DHP se podría señalar que la oxidación del anillo DHP es significativamente afectada por la presencia de estos grupos sustituyentes. Así, el compuesto con la sustitución 3,5-dihidroxifenilo presentó la mayor dificultad para oxidar el anillo DHP, desplazándose el potencial en +220 mV con respecto al compuesto fenil-DHP (Tabla 1). Este desplazamiento se debería a que en el grupo 3,5-dihidroxifenilo, ambos grupos OH actuarían en forma aditiva, esto es, disminuyendo la densidad electrónica del anillo fenilo, lo que dificultaría a su vez la oxidación del anillo DHP como resultado del efecto inductivo -I. En la caso del compuesto 3,4-dihidroxifenilo-DHP y 3,4,5-trihidroxifenilo-DHP que exhiben un grupo OH en la posición-4 del fenilo, se observa un desplazamiento de sólo +50 mV respecto del compuesto fenilo-DHP debido al efecto mesomérico (-M) de estos sustituyentes.

Otra explicación probable se relaciona con las entalpías de disociación de los puentes (BDE) de los polifenoles. La capacidad de donación de hidrógenos por partes de los polifenoles se establece como la responsable de su capacidad atrapadora de radicales libres, y esta habilidad para donar los hidrógenos de su

estructura, está principalmente gobernada por la entalpía de disociación del puente entre el oxígeno e hidrógeno del grupo hidroxilo [16].

Se ha establecido, a través de mediciones teóricas [17] que la BDE para que diversos polifenoles formen su radical (figura 5.16) correspondiente, tiene el orden de magnitud siguiente: Pirogalol (289,4 kJ/mol)< Catecol (312,8 kJ/mol)< Resorcinol (346,5 kJ/mol). Por consiguiente, a menor BDE más facilidad de formar radicales y por ende de donar su hidrógeno para ejercer su efecto antioxidante. Esto podemos correlacionarlo con los potenciales de oxidación obtenidos ya que también observamos la misma relación para los sustituyentes de las 1,4 DHP estudiadas, ya que el que presenta el menor potencial de oxidación corresponde al compuesto 3,4,5-OH-DHP y el mayor potencial la 3,5-OH-DHP.

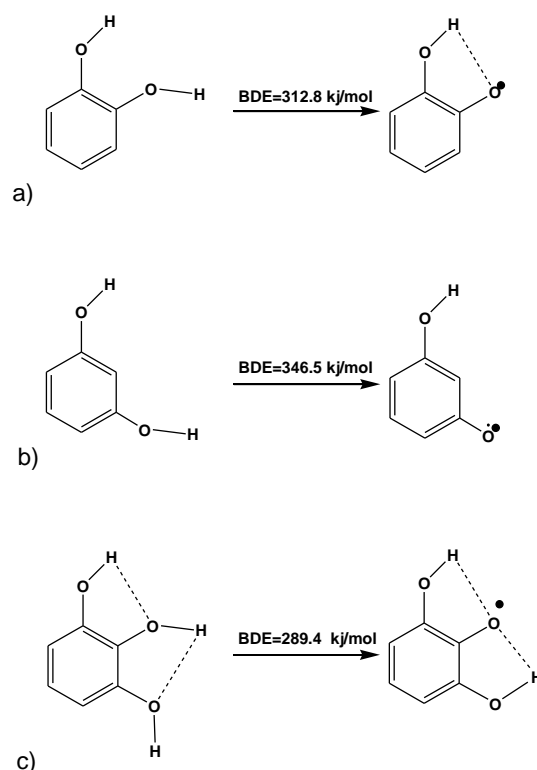


Figura 5.16. BDEs calculadas [18] para a) catecol, b) resorcinol y c) pirogalol.

5.4 Estudio por Espectroscopía UV visible.

Los espectros de los compuestos estudiados se registraron en el rango del UV visible entre $\lambda = 220$ y $\lambda = 1200$ nm. Todos los compuestos presentaron una banda de absorción máxima cercana a los 360 nm. Además, exhibieron una banda de menor absorción cercana a los 290 nm. Se estudió la dependencia de estas bandas con los cambios de pH para los tres compuestos y éstos se muestran en las Figuras 5.17, 5.18 y 5.19 respectivamente. Sólo el compuesto 3,4,5 OH DHP (Fig. 5.18) presentó cambios significativos en su espectro UV vis conforme aumentaba la basicidad del medio, encontrándose nuevos máximos a valores de pH superiores a 10 lo que implicó un cambio de color en la solución.

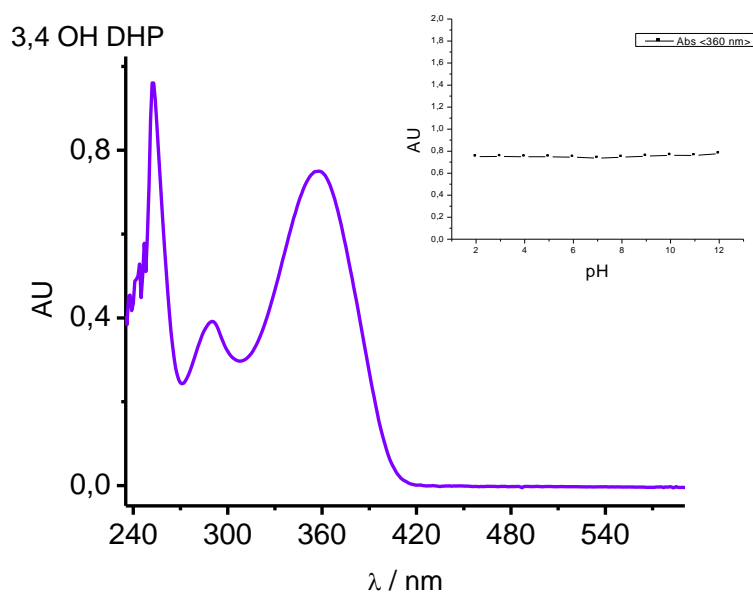


Figura 5.17. Espectrograma UV-Visible para 3,4-OH-DHP. Concentración: 100 μ M. Medio: tampón Britton Robinson/DMF, 70/30 pH 7,4.

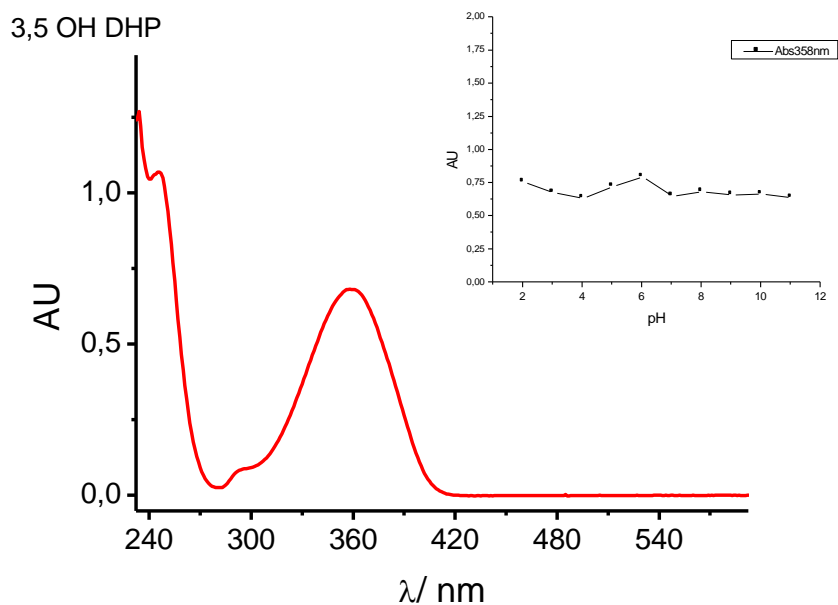


Figura 5.18. Espectrograma UV-Visible para 3,5-OH-DHP. Concentración: 100 μ M. Medio: Tampón Britton Robinson/DMF, 70/30 pH 7,4.

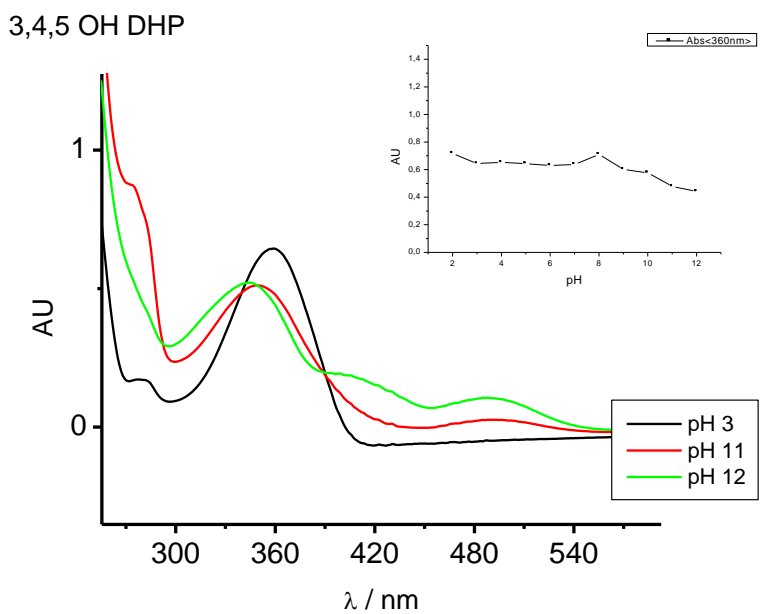


Figura 5.19. Espectrograma UV-Visible para 3,4,5-OH-DHP. Concentración: 100 μ M. Medio: Tampón Britton Robinson/DMF, 70/30 pH 7,4.

a) Cálculo de la absorbilidad molar.

Después de realizar mediciones a diversas concentraciones de los compuestos en estudio como se explicó anteriormente (4.2.4 a) y calcular usando la Ley de Beer-Lambert obtenemos las absorbilidades molares correspondiente para los compuestos en estudio que se muestran a continuación en la tabla 2.

Compuesto	λ máx./ nm	ϵ nm/ cm M
3,4-OH-DHP	360	7134,2 \pm 9,4
3,5-OH-DHP	358	6494,7 \pm 3,7
3,4,5-OH-DHP	360	6566,1 \pm 12,2

Tabla 2. Absorbilidades molares de las 1,4-DHP estudiadas a pH 7,4.

5.5 Reactividad de las 1,4 DHP estudiadas con radicales libres generados a partir de ABAP.

Se decide probar estas 1,4-DHP en medio acuoso a pH 7,4 debido al importante rol que juegan los radicales peroxilo y alquilo en los sistemas biológicos y a su participación en numerosas reacciones en cadenas como el daño a proteínas y lípidos componentes de membrana. Considerando los resultados electroquímicos obtenidos, que establecen que los compuestos estudiados son oxidables, se realizó un estudio sobre la reactividad de los compuestos con radicales libres alquilperoxilos y alquilos generados a partir del ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato). La evolución temporal de la reacción fue realizada a través de espectroscopía UV-visible utilizando las bandas de absorción UV-Vis a $\lambda = 358$ y 360 nm.

La adición de las 1,4 DHP a la mezcla acuosa que contiene los radicales provocó una disminución significativa de las bandas de absorción de los tres compuestos en estudio (figura 5.20-22 A,D). Paralelamente, se observa la aparición de un nuevo producto con un máximo de absorción a 270 nm (figura 5.19-21 B,E). Esta última señal correspondería a la generación del derivado oxidado, en este caso la piridina respectiva.

Para los tres compuestos, la cinética de la reacción exhibe un comportamiento lineal en el rango de 20 y 120 μM (Figura 5.20-22 C,F). Con el fin de comparar la reactividad de las 1,4-DHP estudiadas, se utilizó la constante cinética del NADH y del Nisoldipino como referencia para establecer las relaciones (R) que nos

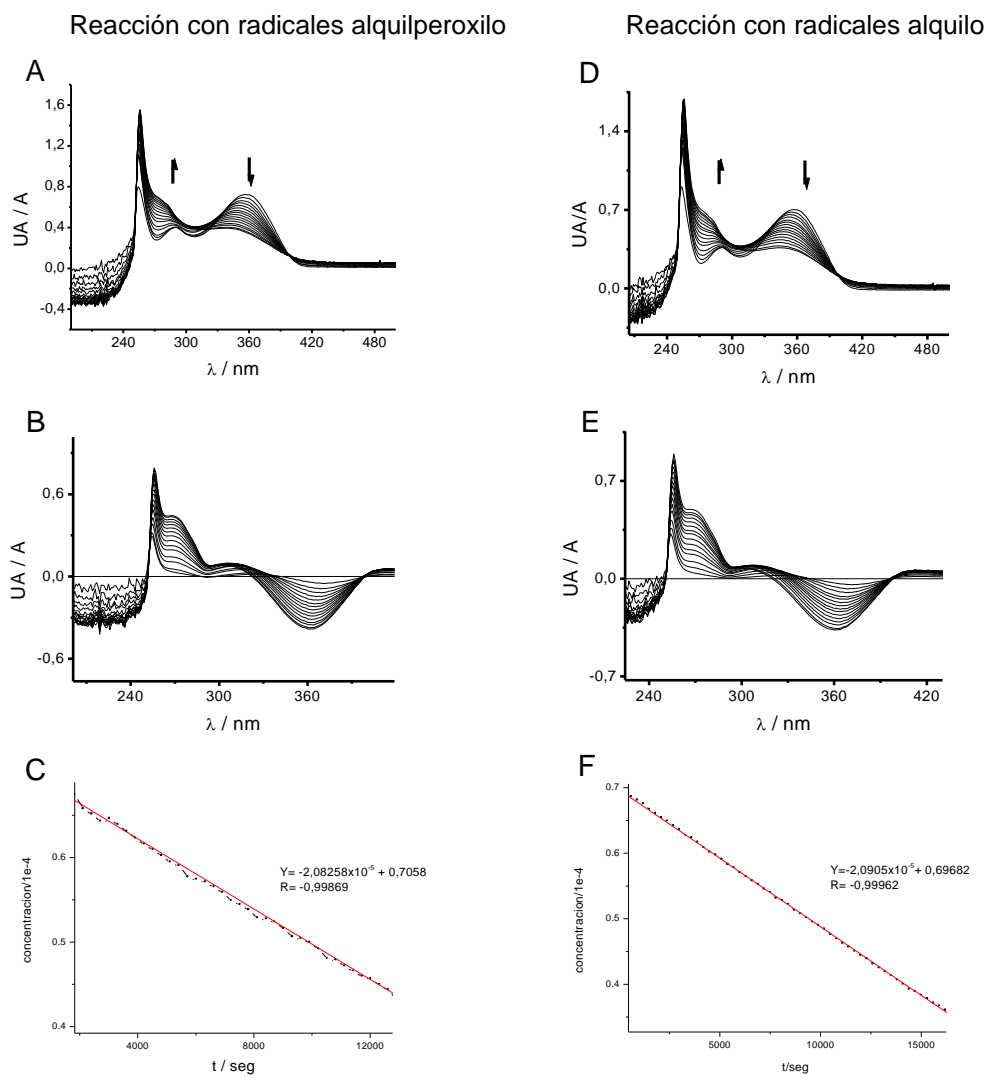
permitan comparar la actividad de nuestros compuestos. De esta forma obtenemos los siguientes valores para las constantes cinéticas de las 1,4-OH-DHP estudiadas (K), y relaciones (R) con NADH y Nisoldipino que se muestran en la tabla 3 y 4.

	$K^a \cdot 10^{-6}/M s^{-1}$	$K^b \cdot 10^{-5}/M s^{-1}$	R/NADH ^c	R/NADH ^d
3,4 OH DHP	2,61±0,05	1,50±0,12	0,07	0,098
3,5 OH DHP	3,26±0,06	1,72±0,08	0,09	0,11
3,4,5-OH DHP	34,55±0,04	9,65±0,10	0,91	0,63

Tabla 3. ^a Constantes cinéticas en presencia de radicales alquilperoxilos. ^b Constantes cinéticas en presencia de radicales alquilos. ^c Relación entre las constantes de la 1,4 DHP y NADH para la reacción con alquilperoxilos. ^d Relación entre las constantes de la 1,4 DHP y NADH para la reacción con alquilos.

	¹ ROO·	² R·	Ep oxidación (mV)			$\Delta E p'_{ox DHP}$
			pico I	pico II	pico III	
3,4 OH DHP	2,61	1,50	524	1014**		$\Delta 134$
3,5 OH DHP	3,26	1,72	848	1028**		$\Delta 148$
3,4,5 OH DHP	34,6	9,65	376	740	990**	$\Delta 110$
Ph-DHP	5,10		814**			
Nisoldipino	2,10					

Tabla 4. Relaciones entre las constantes cinéticas frente a radicales alquilperoxilos (ROO·) y alquilos (R·) ABAP-derivados con los potenciales de pico de oxidación de los compuestos estudiados en comparación con Fenil-DHP y Nisoldipino. $\Delta E p'_{ox}$: diferencia entre los potenciales de oxidación del compuesto estudiado frente a la Fenil-DHP. ¹ $K_a \cdot 10^{-6}/M s^{-1}$. ² $K_b \cdot 10^{-5}/M s^{-1}$. **: Pico atribuido a la oxidación del anillo dihidropiridínico.



3,4 OH DHP

Figura 5.20. Evolución temporal de los espectros (A, D) de de 3,4-OH DHP a $\lambda = 360$ en presencia de los radicales alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Espectros diferenciales (B,E) de las reacciones con alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Concentración: 100 μM . Medio: Tampón Britton Robinson/DMF, 70/30 a pH 7,4 y 37°C. Evolución de la concentración inicial de 3,4-OH DHP en presencia de los radicales (C, F).

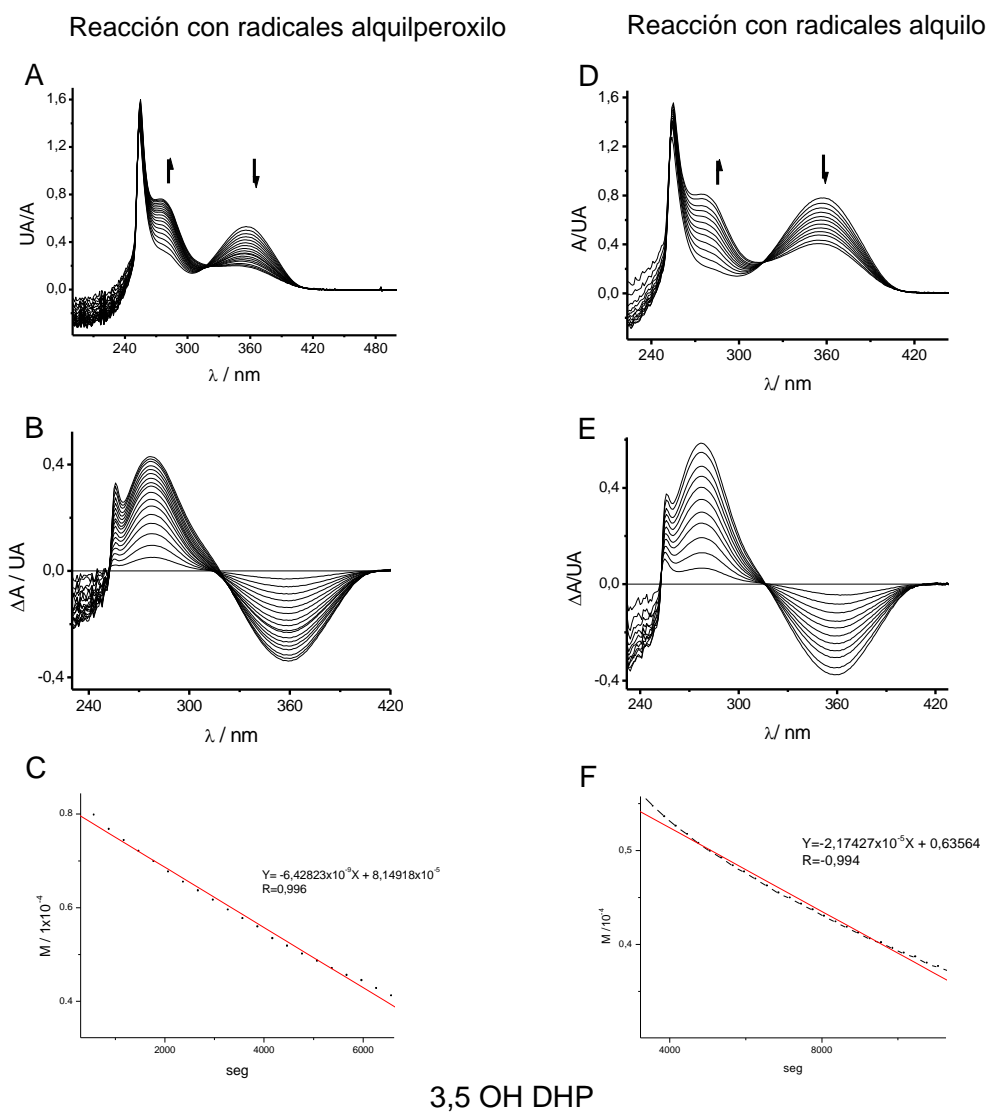


Figura 5.21. Evolución temporal de los espectros (A, D) de de 3,5-OH DHP a $\lambda = 358$ en presencia de los radicales alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Espectros diferenciales (B,E) de las reacciones con alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Concentración: 100 μM . Medio: Tampón Britton Robinson/DMF 70/30 a pH 7,4 y 37°C. Evolución de la concentración inicial de 3,5-OH DHP en presencia de los radicales (C, F).

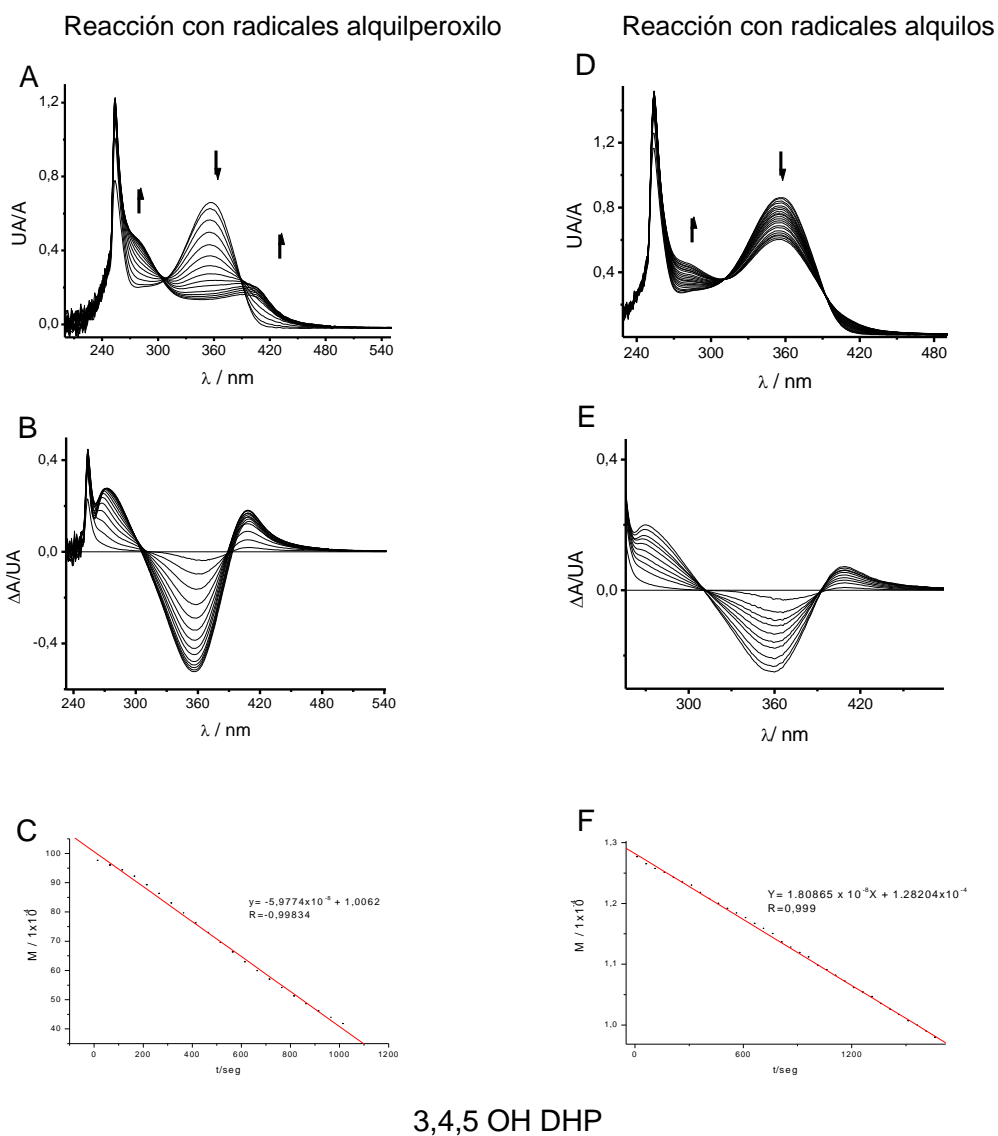


Figura 5.22. Evolución temporal de los espectros (A, D) de 3,4,5-OH-DHP a $\lambda = 360$ en presencia de los radicales alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Espectros diferenciales (B,E) de las reacciones con alquilperoxilos y alquilos ABAP-derivados, respectivamente. Concentración: 100 μM . Medio: Tampón Britton Robinson/DMF, 70/30 DMF a pH 7,4 y 37°C. Evolución de la concentración inicial de 3,4,5-OH-DHP en presencia de los radicales (C,E).

Con propósitos comparativos se utilizó Nisoldipino, una 1,4-DHP comercial. La relación entre los valores de constantes obtenidas para la serie en estudio

respecto a Nisoldipino se muestra en la tabla 5. Se utilizó las relaciones entre las constantes cinéticas con los dos radicales estudiados.

Tabla 5	R/Nisoldipino
3,4- OH-DHP	1,24
3,5-OH- DHP	1,55
3,4,5- OH- DHP	16,45

Tabla 5. A. Relación de reactividades frente a radicales alquilperoxilos ABAP-derivados para las 1,4-DHP estudiadas en comparación con Nisoldipino. Concentración: 100 μ M, pH 7,4 en 0,04 M Tampón Britton-Robinson + 0,1 M KCl.

Figura 5.23

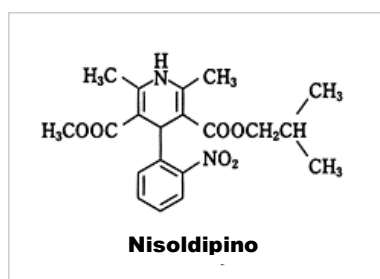


Figura 5.23. Estructura química del Nisoldipino.

Con el fin de comparar las diversas actividades de cada compuesto en estudio frente a los radicales alquilo y alquilperoxilos ABAP-derivados calculamos una relación dada por el cociente entre las constantes cinéticas para cada compuesto.

Siendo a y b las constantes cinéticas (K) de cada compuesto, la relación es la siguiente:

B-DHP	
A-DHP	KA/KB

Esquema 2. Relación comparativa de las actividades de cada compuesto en estudio frente a radicales alquilo y alquilperoxilos ABAP-derivados.

Los resultados comparativos obtenidos se muestran en la tabla 6:

R·	3,4 OH DHP	3,5 OH DHP	3,4,5 OH DHP
3,4 OH DHP	-	0,80	0,075
3,5 OH DHP	1,24	-	0,094
3,4,5 OH DHP	13,24	10,61	-
ROO·	3,4 OH DHP	3,5 OH DHP	3,4,5 OH DHP
3,4 OH DHP	-	0,87	0,16
3,5 OH DHP	1,14	-	0,18
3,4,5 OH DHP	6,43	5,63	-

Tabla 6. A. Relaciones entre las constantes de reactividad frente radicales alquilo y alquilperoxilos ABAP- derivados, para las 1,4-DHP estudiadas entre sí.

5.6 Cálculo del número de electrones transferidos.

Cálculo del número de electrones mediante electrolisis a potencial controlado.

Con el propósito de obtener mayor información sobre los mecanismos de oxidación involucrados para las distintas 1,4-DHP en relación a los diversos procesos redox de cada compuesto, se realizaron electrolisis a potencial controlado (EPC) con un electrodo de malla de carbón grafito a pH3, en tampón 0,1 M Britton-Robinson/Etanol (70/30).

Se aplicaron potenciales ajustados para cada pico de oxidación de la 1,4 DHP en estudio obteniendo el número de electrones en forma separada para cada proceso de oxidación y se calcularon los electrones totales transferidos correspondientes al proceso global (Tabla 7). A las cargas obtenidas en cada proceso se le restó la aportada por el tampón Britton Robinson/ EtOH.

	Potencial aplicado (mV)		
	Pico I	Pico II	Pico III
3,4 OH DHP	700	1200	-
3,5 OH DHP	900	1110	-
3,4,5 OH DHP	500	809	1100
N° de electrones			
3,4 OH DHP	0,88±0,1	3,22±0,2	-
3,5 OH DHP	0,75±0,7	3,45±0,1	-
3,4,5 OH DHP	1,52±0,2	0,96±0,1	2,1±0,3

Tabla 7. Potenciales aplicados para cada pico de las 1,4 DHP en estudio y los números de electrones transferidos correspondientes a la oxidación de ellas.

Cabe señalar que estos estudios han sido más bien dificultosos y extensos, debido a que los productos finales se adhieren fuertemente al electrodo de trabajo, formando una película coloreada sobre la malla de carbón y por otro lado, los tiempos para lograr la oxidación completa de las DHP estudiadas han sido particularmente extensos, en algunos casos superiores a 90 minutos.

Numero de electrones transferidos proceso total	
Compuesto	Medio acuoso pH3
3,4,OH DHP	4,1 ± 0,2
3,5 OH DHP	4,2 ± 0,1
3,4,5 OH DHP	4,5 ± 0,3

Tabla.8. Número de electrones transferidos en Electrolisis a Potencial controlado de + 1200 mV.

Para todos los compuestos se realizaron las electrolisis para potenciales de oxidación estimados para cada pico, posteriormente se realizó el mismo proceso experimental, pero en ausencia del depolarizador (1,4 DHP). De esa forma se restan las cargas aportadas por las soluciones de trabajo. En el caso de la 3,4,5-OH-DHP se estudió la evolución de la electrolisis por voltamperometría de pulso diferencial a pH 3 en tampón 0,1 M Britton Robinson / (70/30) EtOH . Lo anterior se muestra en la Figura 5.23 donde se puede apreciar como disminuye en intensidad de corriente cada pico a medida que progresa la electrólisis, lo que es registrado por sucesivas VPDs. En la misma figura también se señalan los potenciales aplicados en cada etapa de la electrólisis.

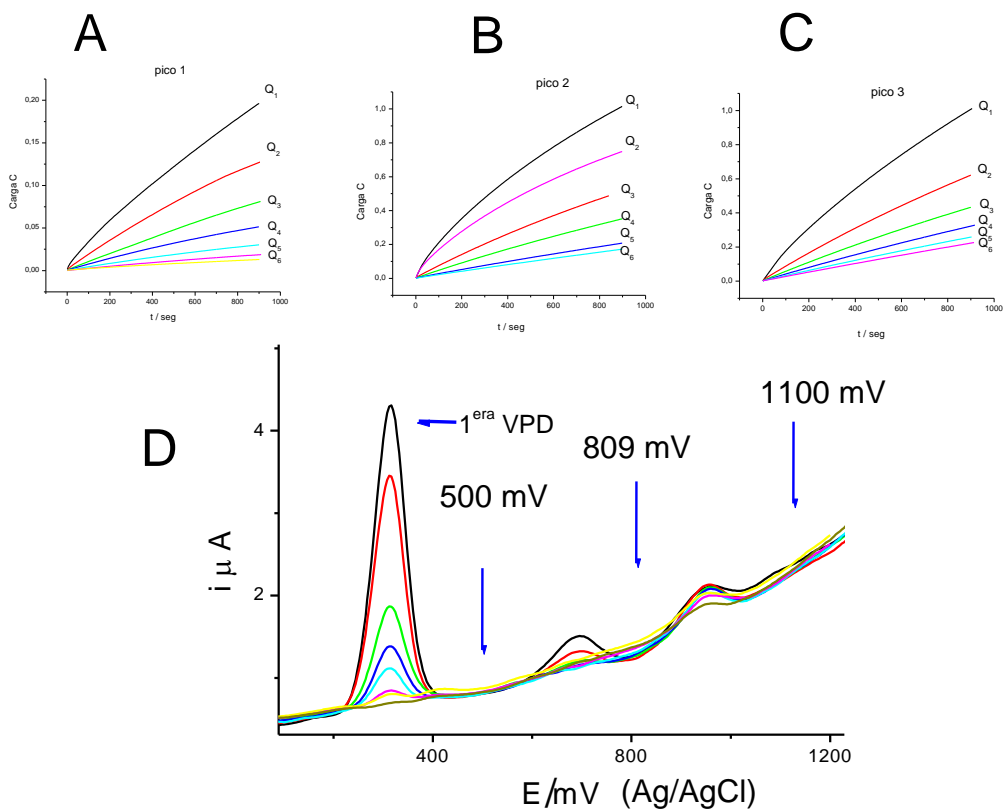


Fig 5.23. Electrolisis a potencial controlado de una solución 4×10^{-6} M de 3,4,5 OH DHP en Tampón Britton Robinson 70/30 EtOH a pH3, las figuras A,B y C muestran la evolución temporal de la carga para los diversos potenciales aplicados 500 mV, 809 mV y 1100 mV, respectivamente. D. Electrolisis de 3,4,5 OH DHP seguida por voltamperometría de pulso diferencial en las mismas condiciones antes mencionadas.

5.7 Evaluación de la Electrolisis a Potencial Controlado (EPC).

Los compuestos en estudio fueron sometidos a EPC y las soluciones electrolizadas se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de gases. Los compuestos 3,4; 3,5 y 3,4,5 OH DHP presentaron un patrón de fragmentación similar a moléculas de este tipo, encontrándose el ión molecular y el fragmento correspondiente a la pérdida del sustituyente de la posición-4 presenta una masa m/z de 252. La serie completa presentó el mismo patrón de fragmentación, esto es, la pérdida del sustituyente de la posición 4. También se observó la pérdida del fragmento de m/z igual a OCH_2CH_3 [18].

Se identificó el derivado piridínico ($m/z=503$) como producto de la oxidación electroquímica de los compuestos 3,4 OH DHP y 3,5 OH DHP. En el caso de la 3,4,5 OH DHP no se pudo detectar el derivado piridínico con la técnica usada. Los tiempos de retención obtenidos fueron de 8,91 min para la 3,4 OH DHP y de 9,73 min para 3,5 OH DHP. En la figura 5.24 se muestra la fragmentación del producto de la electrólisis de la 3,4 OH DHP. Entre los fragmentos más abundantes se encuentran el derivado piridínico con m/z de 503 y un segundo fragmento de m/z de 324 que corresponde a la pérdida de ambos grupos $-OCH_2CH_3$ y uno de los hidroxilos del sustituyente en posición 4. El compuesto 3,5 OH DHP presentó un patrón similar de fragmentación. Para 3,4 y 3,5 OH-DHP se verifica la oxidación del anillo dihidropiridínico a un derivado piridínico.

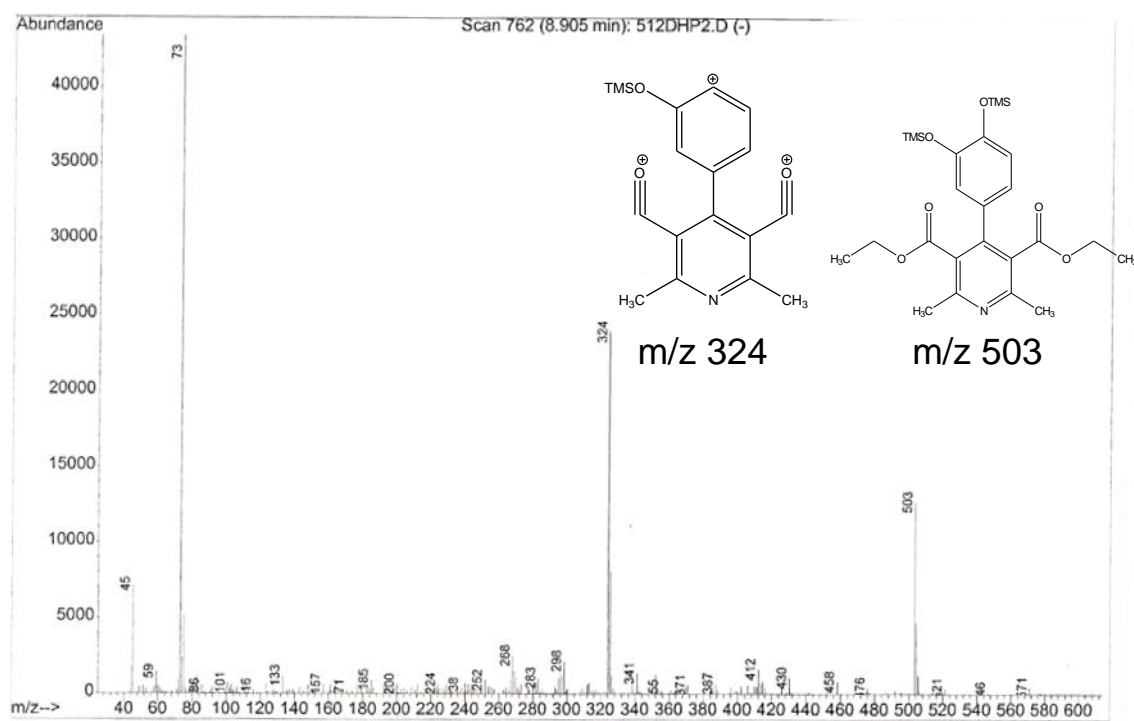


Fig. 5.24. Espectro de masa de fragmentación correspondiente a 3,4 OH DHP oxidada después de 90 min de EPC.

6. Conclusiones

- Los compuestos 3,4-OH DHP y 3,5-OH DHP presentan 2 señales de oxidación en medio acuoso. La primera correspondería a la oxidación de uno de los grupos OH presentes en el anillo aromático y la segunda, a valores más positivos, correspondería a la oxidación del anillo DHP. Sin embargo, el compuesto 3,4,5-OH DHP exhibió tres señales de oxidación. Dos de ellas corresponderían a la oxidación de los grupos OH y la tercera a la oxidación del anillo DHP.
- La coexistencia de dos centros redox en las 1,4-DHPs estudiadas afecta significativamente los valores de potenciales de oxidación de dichos compuestos. Así, los potenciales de oxidación del anillo dihidropiridínico se desplazan hacia valores más positivos en comparación a 1,4-DHPs que carecen de sustituyentes hidroxifenilos en la posición 4.
- Los tres compuestos reaccionaron significativamente con radicales alquilo y peroxilo ABAP-derivados. El 3,4,5-OH DHP resultó ser el más potente de los tres compuestos estudiados, incluso más reactivo que Nisoldipino y NADH.

5. Referencias

1. Darrell R., Abernethy and Nikolai M. (2002) *Structure-Functional Diversity of Human L-Type Ca²⁺⁺ Channel: Perspectives for New Pharmacological Targets. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 300:724–728.*
2. Nayler W., (1988) *Calcium antagonist, Academia Press, 56-57*
3. Grossman E., Messerli F.(2004) *Long-term safety of antihypertensive therapy .Progress in cardiovascular diseases, 47: 34-57*
4. Godfraind T. (1987). *Classification of calcium antagonist. America. Journal of Cardiology, 59:11B-23B.*
5. Bohlooli, S., Mahmoudian, M., Skellern, G.G., Grant, M.H., Tettey, J.N.A.(2004). *Metabolism of the dihydropyridine calcium channel blockers mebudipine and dibudipine by isolated rat hepatocytes. Journal of Pharmacy and Pharmacology ,56:1469-1475.*
6. López-Alarcón, C., Núñez-Vergara, L.J., Squella, J.A., (2003) *Voltammetric oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines in protic and aprotic media: relevante of the substitution on N position, Electrochimica Acta 2505-2516.*
7. Arguello, J., Núñez-Vergara, L.J., Sturm, J.C., Squella, J.A., (2004)*Voltammetric oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines in protic media: substituent effect on positions 3,4,5 of the heterocyclic ring, Electrochimica Acta 49 : 4849-4856*
8. Godfraind T. (2005). *Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hipertension and atherosclerosis.*

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 360:2259-2272.

9. Berkels R., Breitenbach T., Bartels H., Taubert D., Rosenkranz A., Klaus W., (2005). *Different antioxidative potencies of dihydropyridine calcium channel modulators in various models*. *Vascular Pharmacology*, 42: 145-152.
10. Spitelle G. (2006). *Peroxy radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases*. *Free Radical Biology & Medicine*, 41:362–387.
11. Núñez-Vergara, L.J., Salazar, R., Camargo, C., Carbajo, J., Conde, B., Navarrete-Encina, P.A., Squella, J.A. (2007) *Oxidation of C4-hydroxyphenyl 1,4-dihydropyridines in dimethylsulfoxide and its reactivity towards alkylperoxy radicals in aqueous medium*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4318–4326.
12. Kim, H.-Y., Kim, O.-H., Sung, M.-K. (2003) *Effects of Phenol-Depleted and Phenol-Rich Diets on Blood Markers of Oxidative Stress*. *Journal of the American College of Nutrition*, 22: 217–223.
13. Gunckel, S., Santander, P., Cordano, G., Ferreira, J., Munoz, S., Nunez-Vergara, L.J., Squella, J.A. (1998). *Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media*. *Chemico-Biological Interactions*, 114: 45 - 59.
14. Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J., Osakai, T. (2002). *Higher Radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 123-132.

15. Núñez-Vergara, L.J., López-Alarcón, C., Navarrete-Encina, P.A., Atria, A.M., Camargo, C., Squella, J.A. (2003). *Reactivity of 1,4-dihydropyridines towards alkyl, alkylperoxyl radicals and ABTS radical cation. Chemical Research in Toxicology*, 16: 208-215.
16. Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A., (2001). *Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. Journal of the American Chemical Society*, 123: 1173-1183.
17. Thavasi, V., Leong, L.P., Bettens, R.P.A. (2006). *Investigation of the Influence of Hydroxy Groups on the Radical Scavenging Ability of Polyphenols, Journal of Physical Chemistry*, 110:4918-4923.
18. Núñez-Vergara, L.J., Navarrete-Encina, P.A., Salas, S., Conde, B., Carbajo, J., Squella, J.A., Camargo, C. (2007) *Analysis by GC–MS and GC–MS–MS of the hantzsch synthesis products using hydroxy- and methoxy-aromatic aldehydes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 236–242.

8. Presentaciones a congresos

Los resultados de la presente memoria de título, fueron presentados en la XXVII Jornadas Chilenas de Química, realizadas del 20 al 23 de Noviembre en la Ciudad de Chillan, VIII Región del Bío-bío Chile.

En dicha ocasión se presentaron dos trabajos:

a) Caracterización Electroquímica y Reactividad de nuevas 1,4 Dihidropiridinas C-4 dihidroxifenil sustituidas. J.P. Morales., R. Salazar, J. A. Squella, P. Navarrete., L.J. Núñez-Vergara.

b) Caracterización Electroquímica y reactividad de 3,4,5 OH DHP. L.J. Núñez-Vergara., J.P. Morales., R. Salazar., P. Navarrete., J. A. Squella.

Agradecimientos a FONDECYT proyecto 1050761.