



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL Y  
ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON  
CICLODEXTRINAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

FERNANDA ROXANA PÉREZ CRUZ

PATROCINANTE  
DIRECTOR DE TESIS

DR. CLAUDIO OLEA AZAR

Departamento de Química Inorgánica y  
Analítica  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas

UNIVERSIDAD DE CHILE

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CAROLINA JULLIAN MATTHAEI

Departamento de Química Orgánica y  
Fisicoquímica  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas

UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, CHILE, 2008

A mí querida abuela

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Al terminar esta etapa, se vienen a mi mente muchos recuerdos, ha sido una etapa muy linda en mi vida, llena de desafíos y logros.

Quisiera agradecer enormemente a mis directores de tesis, Dra. Carolina Jullian y Dr. Claudio Olea, por su apoyo académico y personal, las largas conversaciones y enseñanzas, por creer en mí, por la oportunidad de participar en su grupo de investigación y poder desarrollarme profesionalmente.

Todo este proceso ha sido más fácil por la presencia de mi familia, que siempre me ha apoyado y escuchado, le quiero dar las gracias a mi papá Juan, mi mamá Ximena, mis hermanas Paola y Carola, Camilo, Sebita y Gino.

A una persona muy especial para mí, Macarena, que ha vivido todo este proceso acompañándome y que muchas veces fue testigo de llantos y risas, le quiero dar las gracias por estar ahí y apoyarme.

Le quiero agradecer a Giancarlo, Muriel, Cristi, Carola y Pauli, personas que he conocido durante mis años de Universidad y que en muchas ocasiones compartimos opiniones, sueños, penas y alegrías.

Gran parte del crecimiento que he logrado durante estos años fue gracias a Ximena Mateluna. Todas las conversaciones fueron sumamente importantes para mí.

Por último, quiero agradecer a todos los que desde lejos me apoyaron, sin olvidar a mi abuela Peta, a quien le dedico esta tesis y que pese a no estar físicamente, sé que me acompaña todos los días.

---

## TABLA DE CONTENIDO

---

	Página
Indice de Tablas	V
Indice de figuras	VI-VIII
Resumen	IX
Summary	X
Introducción	1-8
Hipótesis	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	10
Materiales y métodos	11-21
Resultados y Discusión	22-52
Conclusión	53-55
Bibliografía	56-60

---

## INDICE DE TABLAS

---

		Página
Tabla 1	Parámetros electroquímicos obtenidos para los derivados de 5-nitroindazol a diferentes velocidades de barrido.	26
Tabla 2	Detalle del efecto de la adición de glutatión sobre la razón de corriente $I_{pa}/I_{pc}$ .	27
Tabla 3	Constantes de asociación obtenidas mediante metodología de solubilidad de fase para las moléculas en estudio con $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina y 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina.	32
Tabla 4	Desplazamientos, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento para las señales de JNI-6 en $CDCl_3$ los espectros $^1H$ -RMN y $^{13}C$ -RMN de acuerdo a la numeración establecida en la figura 16.	38
Tabla 5	Asignaciones para las moléculas JNI-5, JNI-6 y JNI-10 en $D_2O$ , basándose en la numeración propuesta en la figura 16 y 20.	40
Tabla 6	Detalle de los $\Delta\delta$ (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-6 y $DM\beta CD$ y para los $\Delta\delta$ la ciclodextrina.	45
Tabla 7	Detalle de los $\Delta\delta$ (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-10 y $DM\beta CD$ y se muestran además los $\Delta\delta$ de la ciclodextrina.	48
Tabla 8	Detalle de los $\Delta\delta$ (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-5 y $DM\beta CD$ y se muestran además los $\Delta\delta$ de la ciclodextrina	51

---

## INDICE DE FIGURAS

---

		Página
Figura 1	En (a) Estructura del Nifurtimox y (b) Estructura del Benzonidazol.	2
Figura 2	Diagrama de mecanismos de reducción y acción de los nitrocompuestos aromáticos en sistema anaeróbicos y aeróbicos.	4
Figura 3	Estructura megazol	6
Figura 4	a) Ciclodextrinas nativas, b) diámetro interno y externo cavidad ciclodextrinas.	8
Figura 5	Tipos de comportamiento identificados para la formación de complejos con ciclodextrinas.	16
Figura 6	En a) voltamograma cíclico para el compuesto JNI-5, b) voltamograma obtenido para JNI-10, c) voltamograma obtenido para JNI-6 d) voltamograma obtenido para JNI-9 todos estos estudios fueron realizados variando las velocidades de barrido.	22
Figura 7	Voltamograma para JNI-10 tratado con NaOH comprobándose la existencia del protón lábil	23
Figura 8	Mecanismo electroquímico para los derivados de 5-nitroindazol sintetizados como clorhidratos JNI-6, JNI-9 y JNI-10.	24

Figura 9	Mecanismo de reducción propuesto para el compuesto JNI-5.	25
Figura 10	Efecto de la adición de glutatión sobre la reactividad del anión radical nitro formado electroquímicamente, ▲ corresponde a compuesto JNI-10 puro, ■ 0.03mM de GSH en el sistema.	26
Figura 11	Espectro experimental REE del anión radical nitro de JNI-6 en DMSO generado electroquímicamente.	28
Figura 12	Estructura base responsable del patrón hiperfino determinado mediante REE.	29
Figura 13	Espectro UV/Vis obtenido para el experimento solubilidad de fase de JNI-9 con 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina.	30
Figura 14	Gráficos obtenidos según metodología de solubilidad de fase para JNI-5, JNI-6, JNI-9 y JNI-10 con β-ciclodextrina, 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina y 2,6-dimetil-β-ciclodextrina.	31
Figura 15	Gráfico de variación continua para complejos de JNI-6 con β-CD, DM-β-CD y HP-β-CD.	34
Figura 16	Compuesto JNI-6 numerado, R1 corresponde a morfolina, R2 corresponde a bencilo.	34
Figura 17	Espectro <sup>1</sup> H-RMN para JNI-6 en CDCl <sub>3</sub> .	35
Figura 18	Espectro bidimensional ROESY para JNI-6 en D <sub>2</sub> O	37
Figura 19	Geometría propuesta para JNI-6 en solución acuosa.	39

Figura 20	a) JN1-5 y b) JN1-10 numerados, donde R2 en JN1-5 corresponde a metilo, y en JN1-10 corresponde a bencilo, R1 en JN1-5 corresponde a morfolina y en JN1-10 son grupos isopropilo.	39
Figura 21	Espectro $^1\text{H}$ -RMN para 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina.	41
Figura 22	Espectros 2D-HSQC obtenidos para DM $\beta$ CD en (a) y en (b) para el Complejo JN16-DM $\beta$ CD.	43
Figura 23	Espectro bidimensional ROESY obtenido para el complejo JN16-DM $\beta$ CD.	44
Figura 24	Espectro HSQC complejo JN110-DM $\beta$ CD	47
Figura 25	Espectro ROESY para zona aromática del complejo JN110-DM $\beta$ CD	47
Figura 26	Espectros $^1\text{H}$ -RMN a) Zona aromática del complejo JN1-5DM $\beta$ CD y b) Zona alifática del complejo JN1-5DM $\beta$ CD en las dos figuras el espectro inferior corresponde a JN1-5 libre.	50



## **Estudio electroquímico de derivados de 5-nitroindazol y análisis espectroscópico de sus complejos de inclusión con ciclodextrinas**

En este trabajo se presenta un estudio electroquímico y análisis espectroscópico de derivados de 5-nitroindazol (JNI-5, JNI-6, JNI-9, JNI-10), compuestos en los que se ha comprobado su actividad antitripanosida. La formación del anión radical nitro, se estudió por Voltametría Cíclica y Resonancia de Espín Electrónico. Se propusieron dos tipos de mecanismos de reducción i) Una reducción monoelectrónica I para JNI-6, JNI-9 y JNI-10 seguido por un equilibrio acido-base y finalmente una reducción monoelectrónica II, y ii) Reducción monoelectrónica para JNI-5. La diferencia en el mecanismo de reducción se basa en el hecho de que JNI-6, JNI-9 and JNI-10 poseen un protón lábil en su estructura. La reactividad del anión radical nitro con glutatión se estudió, donde JNI-9 fue más sensible que los otros compuestos a este antioxidante.

Se estudió la inclusión de estas moléculas en ciclodextrinas, obteniéndose valores de constantes de asociación (Método Solubilidad de Fase) para todos los complejos formados con  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) y 2,6-dimetil-  $\beta$ -ciclodextrina (DM $\beta$ CD), destacándose para los complejos formados entre JNI-6 y JNI-10 con DM $\beta$ CD valores de  $K_a$  de  $8955 \text{ M}^{-1}$  y  $2149 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. Por otra parte JNI-9 presentó baja asociación con las tres ciclodextrinas. Todos los complejos presentaron estequiometría 1:1, de acuerdo a gráficos de Job. Se determinaron las geometrías de inclusión para los complejos entre JNI-5, JNI-6 y JNI-10 con DM $\beta$ CD, determinándose, mediante estudios 2D-RMN y/o variación de desplazamientos químicos ( $\Delta\delta$ ), que todas las moléculas se incluyen por la parte ancha de la ciclodextrina.

## **Electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives and spectroscopic analysis of their inclusion complexes with cyclodextrins.**

In this work, we present an electrochemical study and spectroscopic analysis of four 5-nitroindazole derivatives (JNI-5, JNI-6, JNI-9 and JNI-10), which have antitrypanosida activity. The formation of the radical's species, for example, nitro anion radical, was studied by cyclic voltametric and by ESR studies. We proposed two types of reduction mechanism, i) a monoelectronic reduction for JNI-6, JNI-9 and JNI-10 followed by an acid-base equilibrium and finally a monoelectronic reduction II, and ii) only a monoelectronic reduction for JNI-5. The difference in the reduction mechanism lies in the fact that JNI-6, JNI-9 and JNI-10 have labile hydrogen in their structure. A reactivity study for the nitro anion radical with glutathione was done, where JNI-9 was more sensible than the other compounds by the addition of this antioxidant.

The inclusion study of this molecules in cyclodextrins was done, obtaining the association constant ( $K_a$ ) by the phase solubility methods for all the complexed formed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD), 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) and 2,6-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM $\beta$ CD). The  $K_a$  values obtained for JNI-6-DM $\beta$ CD and JNI-10-DM $\beta$ CD were  $8955 \text{ M}^{-1}$  and  $2149 \text{ M}^{-1}$ , respectively. On the other hand, JNI-9 showed low association with all cyclodextrins studied. All the complexed show a 1:1 stoichiometric, in agreement with Job's Plot. The inclusion geometry for JNI-5-DM $\beta$ CD, JNI-6-DM $\beta$ CD and JNI-10-DM $\beta$ CD was determined with 2D-RMN and/or chemical shift variations ( $\Delta\delta$ ) studies. We found that for all complexed formed, the substrate is included for the wide side of the 2, 6-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin.

---

## INTRODUCCIÓN

---

### **ENFERMEDAD DEL CHAGAS**

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es una endemia que afecta cerca de un cuarto de la población latinoamericana, lo que causa importantes problemas sanitarios, económicos y sociales para los países afectados. De acuerdo a la Organización mundial de la salud cerca de 120 millones de personas en Latinoamérica, viven en riesgo de contraer ésta parasitosis y entre 16-18 millones de personas están infectadas con el parásito.<sup>1</sup>

Se han propuesto dos alternativas para erradicar esta enfermedad. La primera consiste en la prevención de la transmisión por eliminación del insecto vector (la vinchuca) y por esterilización de la sangre portadora utilizada para transfusión. La segunda, consiste en la quimioterapia de los pacientes infectados, con fármacos eficaces, eliminando así al reservorio humano del *T. cruzi* y al mismo tiempo, curando al paciente. Los procedimientos propuestos se complementan. Campañas de erradicación del vector se realizan desde hace varios años, con éxitos importantes en Uruguay, Chile y Brasil, donde la transmisión se ha reducido substancialmente. Por el contrario, la cura parasitológica de los pacientes con esta enfermedad, no ha tenido el mismo éxito. A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de Chagas (1909), todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad. Se

puede decir que el *Trypanosoma cruzi*, el agente causal, ha desafiado todos los intentos para su eliminación pues los medicamentos utilizados actualmente, el Nifurtimox (Lampit) y el Benzonidazol (Radanil), son de baja eficacia<sup>2-13</sup>. Por otra parte, tampoco existen fármacos o vacunas para prevenir la enfermedad. En general, se acepta que el Nifurtimox y el Benzonidazol son eficaces en la fase aguda de la infección pero lo son menos en la fase crónica pues a menudo, no producen cura parasitológica<sup>2-3</sup>. Los efectos terapéuticos del Nifurtimox y del Benzonidazol en la infección, presentan diferencias notables. Tanto el Nifurtimox como el Benzonidazol producen efectos adversos (“no deseados”) en pacientes tratados con esos fármacos, más con el primero que con el segundo<sup>14-15</sup>. Las manifestaciones tóxicas pueden incluir temblores, náuseas, vómitos, pérdida de peso, polineuropatías, eritema, etc., según el fármaco utilizado.

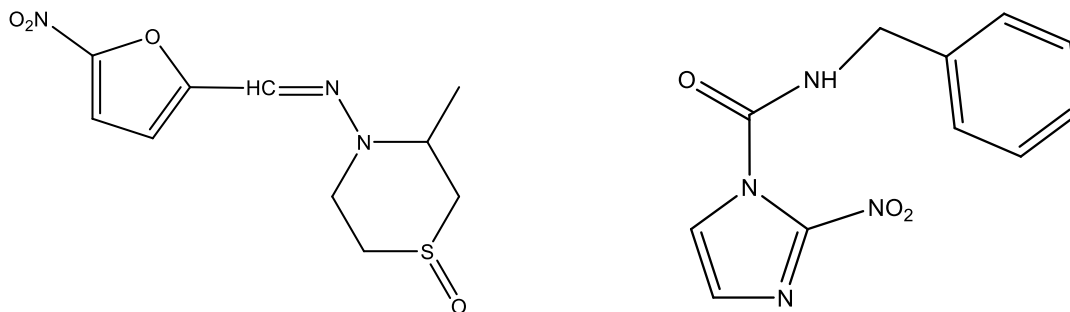


Figura 1 En (a) se muestra la estructura del Nifurtimox y (b) corresponde la estructura del Benzonidazol.

El Nifurtimox y el Benzonidazol pueden ejercer su toxicidad por varios mecanismos:

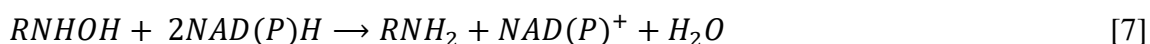
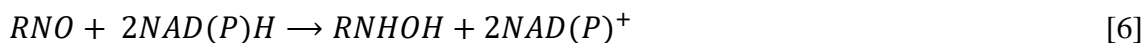
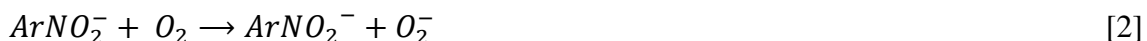
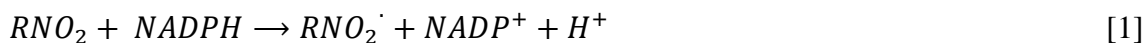
(a) Acción directa del anión radical nitro, sobre moléculas susceptibles, entre ellas el ADN.<sup>16,17,18</sup>

(b) Generación de radicales libres del oxígeno, que para el Nifurtimox sería el agente citotóxico principal.<sup>7,18,19,20</sup>

(c) Producción, por reducción de moléculas reactivas (derivados nitroso e hidroxilamina) cuya citotoxicidad es conocida;

d) Inhibición directa de la enzima tripanotión reductasa.<sup>21</sup>

La reducción univalente de los nitrocompuestos implica las siguientes reacciones:



(1) Captura del electrón por el grupo nitro, que se convierte en anión radical nitro (Reacción 1); en esta reacción el NADPH es el dador de electrones.

(2) Producción del anión radical superóxido por oxidación del anión radical nitro (Reacción 2).

(3) El anión radical superóxido dismuta, generando peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por la superóxido dismutasa (Reacción 3).

(4) El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en presencia de Fe (II), reaccionan formando radical hidroxilo (OH●), muy tóxico (Reacción 4).

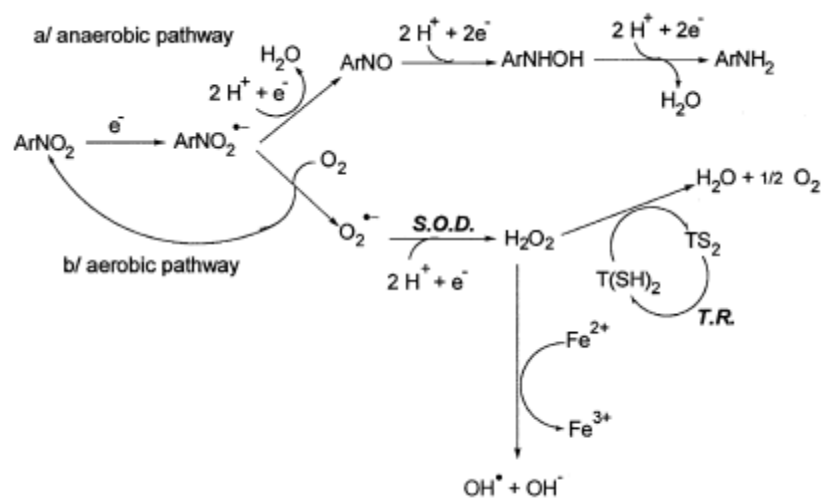


Figura 2 Diagrama de mecanismos de reducción y acción de los nitrocompuestos aromáticos en sistema anaeróbicos y aeróbicos.

Se debe notar que la velocidad de la reacción 2 está limitada por la concentración de oxígeno en el medio. Si esta es alta, como ocurre con sistemas operando en condiciones aeróbicas, la producción de “especies reactivas” de oxígeno transcurre según las reacciones 2-4. En cambio, si la concentración de oxígeno es baja, como ocurre en la profundidad de los tejidos en condiciones fisiológicas, la reacción 2 es relativamente lenta lo que favorece la dismutación del anión radical nitro (reacción 5) generando así al nitroso-derivado. El nitrosofurano, en presencia de un sistema reductor forma la hidroxilamina correspondiente (R-NHOH; reacción 6). Por último, una reducción similar lleva a la producción del amino derivado (R-NH<sub>2</sub>; reacción 7). Reacciones similares ocurren con los nitroimidazoles, representados por el Benzonidazol<sup>22,23</sup>. Los nitroso e hidroxilamina derivados de los nitrofuranos o nitroimidazoles son conocidos por su toxicidad. Las reacciones 1-7 pueden ocurrir tanto en el *T. cruzi* como en el organismo huésped, lo que explicaría la toxicidad de los nitroderivados para ambos. Sin embargo,

el *T. cruzi* es un organismo deficiente en enzimas antioxidantes, por ejemplo, catalasa y superóxido dismutasa<sup>24,25</sup>, lo que no ocurre con el huésped<sup>18,21</sup>. Esta diferencia determina un mayor efecto de los fármacos en el parásito. Los productos de la reducción de los nitroimidazoles, tanto el anión radical nitro como los derivados nitroso e hidroxilamina, pueden reaccionar con el ADN formando aductos<sup>26</sup> que facilitan el quiebre de las cadenas de nucleótidos. Esos efectos se sumarían a los del superóxido y del radical hidroxilo. Tanto los derivados del nitrofurano como los de nitroimidazol presentan una limitada solubilidad acuosa, restringiendo la biodisponibilidad de estos fármacos.

## **NITROCOMPUESTOS**

Megazol [1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol)-5-nitroimidazol] es un derivado nitroheterocíclico con actividad antibacterial y antiparasitaria particularmente contra tripanosomas, bajo condiciones experimentales Megazol puede generar especies oxígeno reactivas (ROS) en un alta concentración inhibiendo la síntesis de proteínas, esto correspondería al modo de acción en contra de *T. cruzi*; sin embargo se ha demostrado que este compuesto produce mutagénesis en el ADN, es por esta razón que no es utilizado en quimioterapia antitripanosida, no obstante la estructura base de Megazol, es decir, 5-nitroimidazol, se ha modificado para desarrollar nuevos agentes antitripanosomas con similar actividad, junto con esto se han modificado derivados de 2-

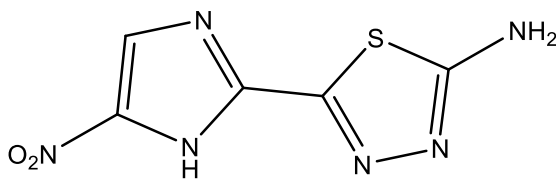


Figura 3 Estructura megazol

nitroimidazol (utilizando como prototipo benzonidazol) y nitrofuranos como modelo de nifurtimox, la diferencia encontrada del estudio comparativo de estos tres derivados mostró que en los dos primeros casos su mecanismo de acción es sobre el metabolismo de oxígeno e inhibición de la enzima tripanotion reductasa y en el caso de nitrofuranos por inducción de stress oxidativo<sup>27</sup>.

Recientemente fue identificado un nuevo y potente compuesto denominado Brazilizon el cual presentó un  $IC_{50}=5.3 \mu M$  dos veces más potente que el megazol  $IC_{50}=9.9 \mu M$ . Este resultado condujo a la exploración de nuevas estructuras derivadas de 1,3,4-tiodiazol-2-arylhidrazona las que mostraron altas actividades antitripanosidal<sup>28</sup>.

Por otra parte nuevas drogas derivadas de ácido furoico conocidas como Nitrofurazonas (NF, 5-nitro-2-furaldehido-semicarbazona), han sido sintetizadas y propuestas como quimioterapia de la enfermedad de Chagas y se han testado demostrándose su alta actividad tripanocidal debido a que inhiben tripanotion reductasa, enzima presente en el parásito pero no en el huésped<sup>29</sup>. Otros autores utilizaron la función tiosemicarbazonas recientemente descrita como inhibidor del crecimiento del parásito *Trypanosoma cruzi* y la sustituyeron con el grupo 5-nitrofuril reconocido promotor de stress oxidativo, se encontró que algunos de estos derivados fueron muy activos contra cultivos epimastigote del parásito más que el compuesto de referencia Nifurtimox<sup>30</sup> y la generación de especies radicalarias fue determinada mediante estudios de voltametría cíclica y REE<sup>31</sup>.



## **DERIVADOS DE 5- NITROINDAZOL**

Desde el año 2005 se inició el estudio de una familia de 5-nitroindazoles en orden a comprobar su capacidad antitripanosida reportándose por primera vez su actividad tripanocidal<sup>32</sup>. En otra publicación se reportó el estudio electroquímico y la generación del anión radical nitro mediante Resonancia de espín electrónico (REE) de derivados de 5-nitroindazol<sup>33</sup>. Jullian y colaboradores<sup>34</sup> comprobaron que la inclusión en ciclodextrinas de derivados de 5-nitroindazol mejoró la solubilidad de estos. Estos antecedentes son el punto de partida para iniciar modificaciones estructurales para mejorar la actividad antitripanosidal.

## **CICLODEXTRINAS**

Las ciclodextrinas son oligosacáridos producidos por acción enzimática sobre el almidón. Las ciclodextrinas tienen una forma toroidal con una cavidad hidrofóbica y grupos hidroxilos libres en los dos bordes los cuales le proveen capacidad para formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos en medios acuosos. Las ciclodextrinas comúnmente utilizadas contienen 6,7 ó 8 unidades de glucosa conectadas por un enlace  $\alpha$ -1,4 y son llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -ciclodextrina respectivamente.<sup>35</sup>

Las ciclodextrinas nativas como la  $\beta$ -ciclodextrina tienen limitada solubilidad, pero se ha obtenido un aumento significativo en su solubilidad en agua por alquilación de los grupos hidroxilos libres, resultando hidroxialquil, metil y sulfobutil derivados.<sup>36</sup>

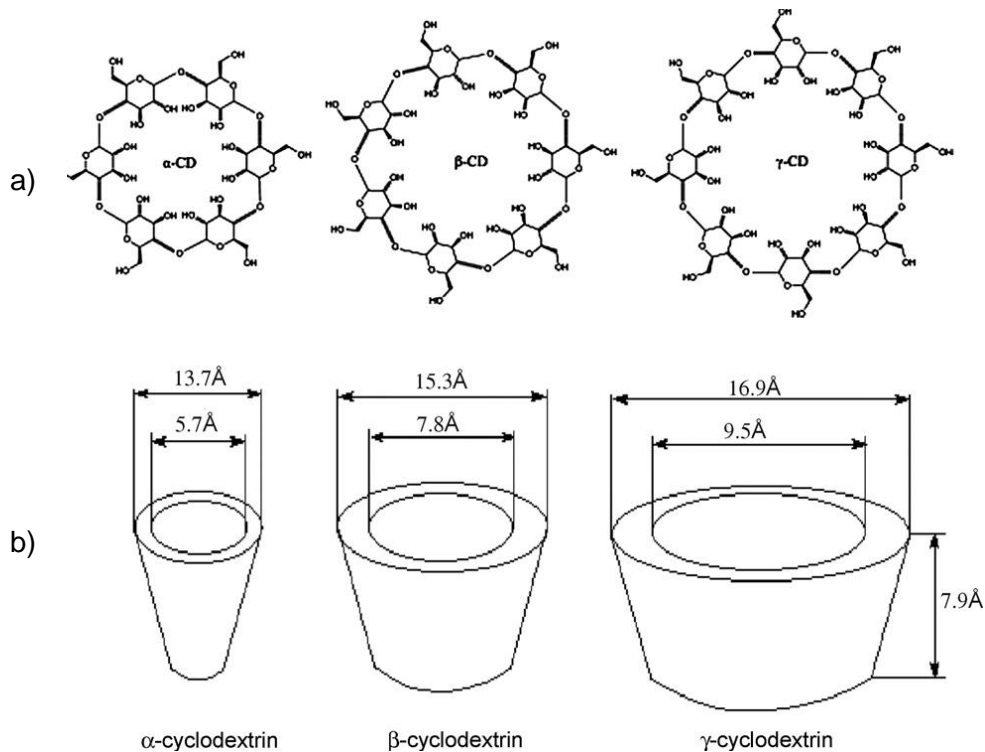


Figura 4 a) Ciclodextrinas nativas, b) diámetro interno y externo cavidad ciclodextrinas.

La formación de complejos de inclusión es una aplicación básica de las ciclodextrinas en variados campos incluyendo análisis espectroscópico, en separaciones cromatográficas y también en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. La complejación está determinada por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, interacciones Van der Waals, energía conformacional, interacciones dipolo-dipolo y ión-dipolo y el reordenamiento de moléculas de agua que originalmente circundan la ciclodextrina y la molécula huésped.<sup>37</sup>

---

## HIPOTESIS

---

Se espera que la presencia del grupo nitro en los derivados de 5-nitroindazol en estudio, provoque similares resultados que los compuestos utilizados clínicamente en el Mal de Chagas, en relación a la generación de radicales libres, como la especie radicalaria nitro derivada.

Debido al carácter apolar de la estructura de los derivados de 5-nitroindazol estos constituirían un buen sustrato para la encapsulación en ciclodextrinas, lo cual permitiría mejorar la solubilidad de estas especies en sistemas acuosos.

---

## OBJETIVO GENERAL

---

Conocer el comportamiento electroquímico y espectroscópico de cuatro derivados de 5-nitroindazol JNI-5, JNI-6, JNI-9 y JNI-10 (Esquema 1) y evaluar la formación de complejos con  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina y 2,6 dimetil-  $\beta$ -ciclodextrina.

---

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Determinación del comportamiento electroquímico de los derivados de 5-nitroindazol, utilizando la técnica de Voltametría cíclica con electrodo gota colgante de mercurio.
- Evaluación de la formación del anión radical nitro mediante Resonancia de Espín Electrónico.
- Determinación de la constante de asociación de los complejos CD-NI mediante la metodología solubilidad de fase.
- Determinación de la estequiometría de los complejos Ciclodextrina-5-Nitroindazol mediante metodología de variación continua (Job Plot).
- Determinación de la geometría de inclusión de los complejos Ciclodextrina-5-nitroindazol mediante métodos bidimensionales en RMN.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### **REACTIVOS**

Los compuestos en estudio fueron sintetizados por Jorge Rodríguez, alumno del programa de doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

La  $\beta$ -ciclodextrina, heptakis (2,6-dimetil)  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, agua deuterada y dimetilsulfoxido fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, perclorato de tetrabutilamonio fue adquirido a Fluka.

### **EQUIPOS**

#### **Voltametría cíclica (VC)**

Para las mediciones electroquímicas se empleó un equipo Metrohm 693 VA provisto de un convertor 694 VA Stand, un procesador 693 VA Processor y una celda de tres electrodos. Utilizando dimetilsulfoxido (DMSO) como solvente aprótico, bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente.

Como electrolito soporte se utilizó perclorato de tetrabutilamonio (PTBA), de concentración  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Se dispuso un electrodo de gota colgante de mercurio como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de calomelano saturado como electrodo de referencia.

Las concentraciones de los compuestos a estudiar fueron de 1 mM.

### **Resonancia de Espín Electrónico (REE)**

Los espectros REE fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9.8 GHz) con cavidad rectangular y 50 GHz de modulación de campo.

### **Espectroscopia de absorción molecular (UV-VIS)**

Para la obtención de los espectros de absorción se utilizó un espectrómetro de absorción UV<sub>2</sub> UNICAM, usando celdas de cuarzo de 1 cm. Los barridos fueron realizados entre longitudes de onda de 200 y 600 nm.

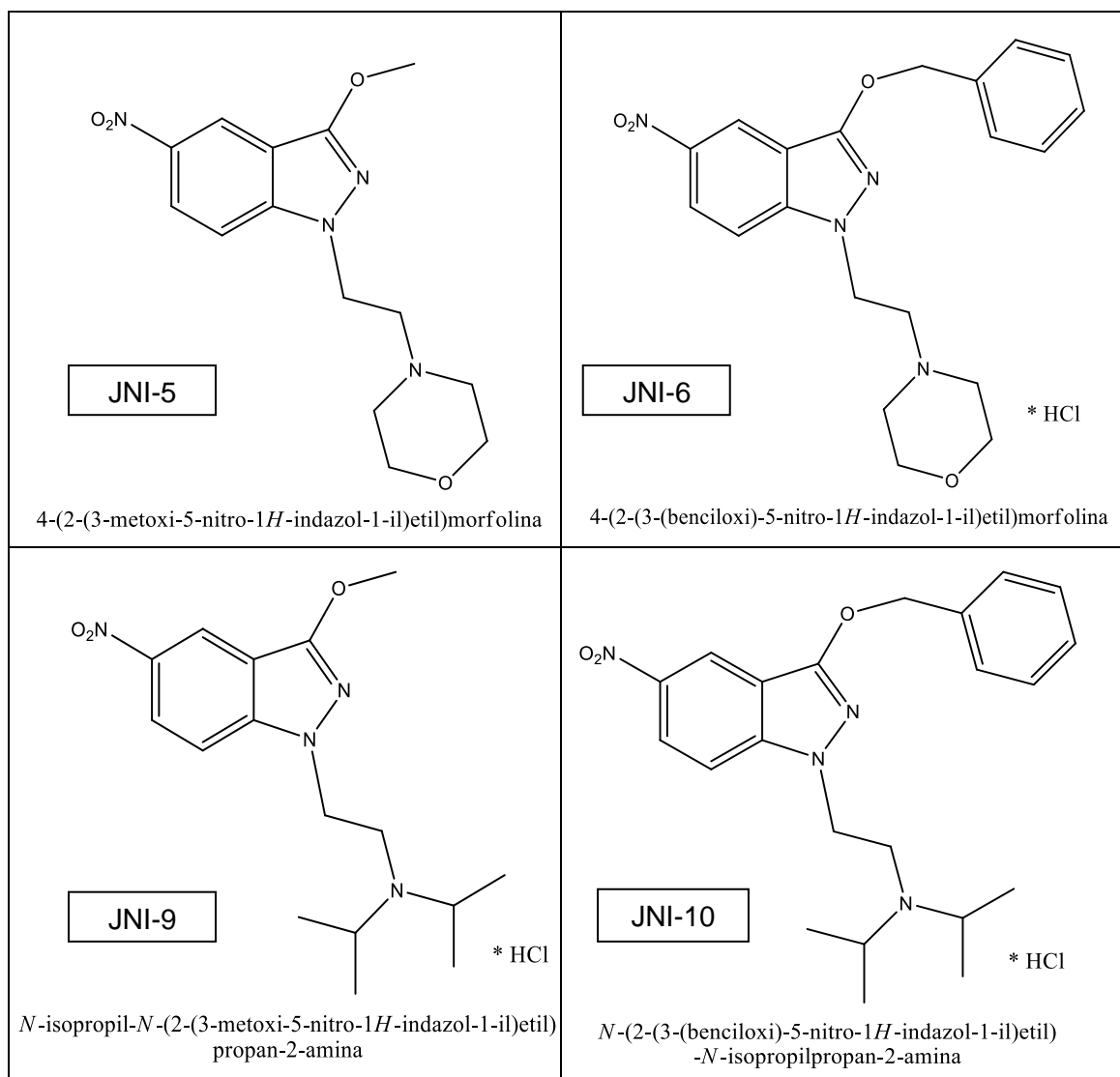
Los complejos fueron preparados en buffer fosfato a pH 7.4, las soluciones se agitaron a 120 rpm en un baño de agua JULABO termoregulado durante 24 horas a 30° C.

### **Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear**

Los estudios de Resonancia magnética nuclear 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 y CDCl<sub>3</sub> a 7.26 ppm. Las mediciones fueron obtenidas con secuencias de pulso estándar BRUKER.

Los complejos fueron preparados de forma similar a la metodología solubilidad de fase, cambiando solamente el solvente por agua deuterada.

## Moléculas en Estudio



**Esquema 1**

## **METODOLOGÍA**

### **Voltametría Cíclica**

La Voltametría cíclica consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección hasta alcanzar un potencial fijado (Potencial de switching), seguido por el posterior barrido en dirección opuesta. Durante el barrido, el potenciostato del equipo mide la corriente resultante en función del potencial aplicado.

Los parámetros importantes en un voltamograma cíclico son el potencial de pico catódico  $E_{pc}$ , el potencial de pico anódico  $E_{pa}$ , la corriente de pico catódica  $I_{pc}$  y la corriente de pico anódica  $I_{pa}$ ; para una reacción reversible las corrientes de pico anódica y catódica son prácticamente iguales, pero de signo opuesto y la diferencia entre los potenciales de pico es de  $0.0592/n$ , donde  $n$  es el número de electrones implicados en la semirreacción.

Esta técnica representa una herramienta en el estudio de mecanismos electroquímicos, y puede discriminar, mediante criterios de diagnóstico, si la reacción de transferencia de electrones es o no reversible así como también se puede conocer la existencia de reacciones químicas acopladas.

En los mecanismos que incluyen reacciones químicas acopladas, estas pueden acontecer antes o después de la transferencia de electrones y, como resultado, los voltamogramas cíclicos se diferenciarán característicamente según cada caso, dependiendo de las condiciones de trabajo.



## **Caracterización de los 5-nitroindazoles mediante Resonancia de Espín Electrónico.**

La espectroscopia de resonancia de espín electrónico es empleada para detectar e identificar especies paramagnéticas, esta técnica es especialmente poderosa cuando es utilizada junto a otras técnicas, por ejemplo, las técnicas electroquímicas<sup>38</sup>.

Los radicales libres formados en las moléculas en estudio fueron caracterizados mediante REE, se realizaron reducciones electroquímicas in-situ en medio aprótico aplicando el potencial correspondiente al pico Ic o Iic obtenidos en los experimentos de voltametría cíclica.

## **Determinación de la constante de asociación mediante método solubilidad de Fase**

### **Consideraciones teóricas**

En todo proceso de complejación, la medida y el conocimiento de la estabilidad ó constante de equilibrio ó su inversa, la constante de disociación es crucial, ya que, estos valores proveen un índice del cambio producido en las propiedades fisicoquímicas como resultado de este proceso, por ejemplo la solubilidad.

El método de solubilidad de fase es una metodología muy utilizada, ya que no sólo permite determinar el valor de la constante de estabilidad, sino también discernir la estequiometría del complejo en el equilibrio. Las implicancias prácticas y teóricas del análisis de solubilidad de fase fueron desarrolladas por Higuchi and Connors<sup>39</sup> en 1965.

Basados en la forma del diagrama de solubilidad de fase se pueden identificar varios tipos de comportamiento. (Figura 5)

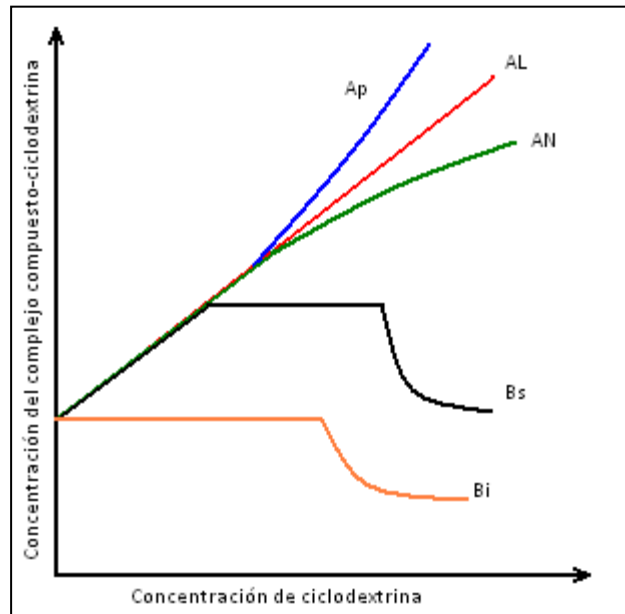


Figura 5. Tipos de comportamiento identificados para la formación de complejos con ciclodextrinas.

### Perfil tipo A

En este caso, la solubilidad aparente del sustrato aumenta como función de la concentración de ciclodextrina, se distinguen tres subtipos dentro de este perfil:

$A_L$ : Corresponde a un aumento lineal de la solubilidad en función de la concentración de ciclodextrina.

$A_P$ : Corresponde a una isoterma en donde la curva se desvía en una dirección positiva de la linealidad, es decir, la ciclodextrina es más efectiva a altas concentraciones.

$A_N$ : Corresponde a una isoterma en donde la curva se desvía en una dirección negativa de la linealidad, es decir, la ciclodextrina es menos efectiva a altas concentraciones.

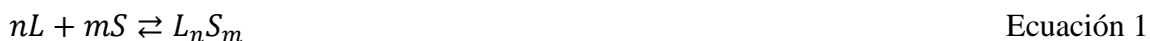
## Perfil tipo B

Estos diagramas indican la formación de complejos con solubilidad en agua limitada y se observan comúnmente en ciclodextrinas nativas como por ejemplo  $\beta$ -ciclodextrinas, este tipo de perfil se subdivide en dos clases:

$B_s$ : En este caso como la concentración de la CD aumenta, se forma un complejo soluble, esto aumenta la solubilidad total del sustrato; en este proceso de solubilización, se alcanza la solubilidad máxima de la droga.

$B_i$ : Los perfiles de este caso son similares a los de tipo  $B_s$  excepto que, no tienen el aumento inicial como en el caso de  $B_s$  y los complejos formados son insolubles.

Se puede definir la ecuación de formación del complejo de la siguiente forma:



Donde:

L: Ligante, es decir, ciclodextrina.

S: Sustrato, es decir, 5-nitroindazol

La constante de equilibrio para la formación de  $L_nS_m$  puede ser representada por:

$$K = \frac{[L_nS_m]}{[S]^m[L]^n} \quad \text{Ecuación 2}$$

Los valores  $[S]$ ,  $[L]$ ,  $[S_mL_n]$  pueden obtenerse:

$$[S] = S_o = \text{solubilidad en equilibrio de S (en ausencia de ciclodextrina)} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$[S_mL_n] = \frac{[S]_t - S_o}{m} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$[L] = [L]_t - n[S_mL_n] \quad \text{Ecuación 5}$$

$[S]_t$  = Concentración total de S (complejado y no complejado)

$[L]_t$  = Concentración total de L

$$[S]_t = S_o + m [S_m L_n] \quad \text{Ecuación 6}$$

$$[L]_t = [L] + n [S_m L_n] \quad \text{Ecuación 7}$$

Para un sistema de solubilidad de fase de primer orden con respecto a la ciclodextrina (n=1) puede derivarse la siguiente ecuación.

$$[S]_t = \frac{mKS_o^m[L]_t}{1+KS_o^m} + S_o \quad \text{Ecuación 8}$$

El gráfico de  $[S]_t$  versus  $[L]_t$  para la formación de  $S_mL$  daría una línea recta con un intercepto en el eje Y, que representa  $S_o$  y la pendiente sería:

$$\text{pendiente} = \frac{mKS_o^m}{1+KS_o^m} \quad \text{Ecuación 9}$$

Por lo tanto, si  $m=1$  (complejo sustrato-ciclodextrina 1:1) puede aplicarse la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{S_o (1-\text{pendiente})} \quad \text{Ecuación 10}^{40}$$

Consecuentemente, un exceso de derivado de 5-nitroindazol (3 mg) fue adicionado a una serie de viales que contienen 4 ml de solución de buffer fosfato a pH 7.4 a la que se le ha agregado una concentración creciente de  $\beta$ -CD, DM-  $\beta$ -CD y HP-  $\beta$ -CD (rango entre 0 y 0.014 M). Los viales fueron agitados por 24 horas a 30° C.

Las suspensiones fueron filtradas a través de un filtro membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro 0.45  $\mu$ m con la finalidad de remover el sólido no disuelto, en seguida todas las soluciones fueron analizadas espectroscópicamente a 362 nm, longitud de onda

en la cual presentan un máximo.  $K_a$  se obtiene del gráfico de  $[S]_t$  versus  $[L]_t$  para la formación de  $S_mL$  utilizando la ecuación 10.

### **Determinación estequiometria de los complejos ciclodextrina-5-nitroindazol**

De acuerdo al método de variación continua, si un parámetro físico está directamente relacionado con la concentración del complejo, por ejemplo la absorbancia, este puede ser medido por medio de un set de muestras en donde se varía la fracción molar de sus componentes<sup>41</sup>. La concentración máxima del complejo se presentará en la razón molar  $R$  correspondiente a la estequiometria de complejación.

La siguiente ecuación describe la formación del complejo de inclusión entre 5-nitroindazol y ciclodextrina, donde la estequiometria se desconoce:



De acuerdo a la metodología se calcularan valores de  $\Delta A$ , definida por la diferencia entre la absorbancia  $A$  (en presencia de ciclodextrina) y  $A_0$  (absorbancia en ausencia de ciclodextrina), luego se graficará  $\Delta A[5-NI]_T$  donde el subíndice  $T$  indica concentración total, contra fracción molar,  $R$ , que se obtiene mediante la ecuación 12, manteniendo la concentración total constante.

$$R = \frac{[5-NI]_T}{[5-NI]_T + [CD]_T} \quad \text{Ecuación 12}$$

Gráficamente la estequiometria del complejo ( $n$ ) está dada por el máximo absoluto, quedando definido por la ecuación 13:

$$R = [n + 1]^{-1} \quad \text{Ecuación 13}^{42}$$

Por consiguiente, en orden a determinar la estequiometría de los complejos formados se prepararon dos soluciones stock, una de 5-NI y una de CD, basándose en la solubilidad en agua del derivado de 5-nitroindazol para la preparación de las soluciones. Las soluciones para el método, se prepararon con razones molares entre 0.1 y 0.9, manteniendo una concentración total  $[5 - NI]_T + [CD]_T = \text{concentración solución stock}$ . A cada solución preparada se les registró su espectro de absorción y el análisis se realizó a la longitud de onda de máxima absorción, que corresponde a 362 nm, donde las absorptividades molares  $[\epsilon_1^{1\text{ cm}}]_M$  de los compuestos son 9283, 5621, 5897 y 5928 para JNI-5, JNI-6, JNI-9 y JNI-10 respectivamente.

#### **Asignación de los espectros RMN para JNI-5, JNI-6 y JNI-10 y DM- $\beta$ -CD**

La asignación inequívoca del JNI-6, se realiza analizando las señales obtenidas en espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, y espectros de 2D COSY ( Correlation Spectroscopy ), ROESY( Rotating-frame Overhauser Spectroscopy ), HMBC y HSQC. Para los otros compuestos, JNI-5 y JNI-10, se registraron los espectros  $^1\text{H}$ -RMN, HSQC, los que fueron analizados basándose en la información obtenida para JNI-6. Para la asignación inequívoca de las CDs se registraron los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y HSQC. Los experimentos en 2D HSQC ( Heteronuclear Single Quantum Correlation ) y HMBC ( Heteronuclear Multiple Bond Correlation ) que correlacionan  $^1\text{H}$  con  $^{13}\text{C}$ , indican los enlaces C-H directamente unidos y las correlaciones entre C y H distantes<sup>43</sup>, respectivamente, se utilizó como solvente  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{D}_2\text{O}$ .

### **Determinación geometría de inclusión de JN1-5-DM- $\beta$ -CD, JN1-6-DM- $\beta$ -CD y JN1-10-DM- $\beta$ -CD**

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. Otro antecedente para inferir por que lado de la ciclodextrina se produce la inclusión, es determinar las diferencias de desplazamiento químico libre e incluido ( $\Delta\delta$ ) con la finalidad de establecer cuales protones se ven alterados por efecto de la inclusión. 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 400 ms.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio electroquímico

Con el fin de determinar el comportamiento electroquímico de los derivados de 5-nitroindazol en estudio, es decir, JNI-5, JNI-6, JNI-9 y JNI-10 se obtuvieron los siguientes resultados mediante voltametría cíclica:

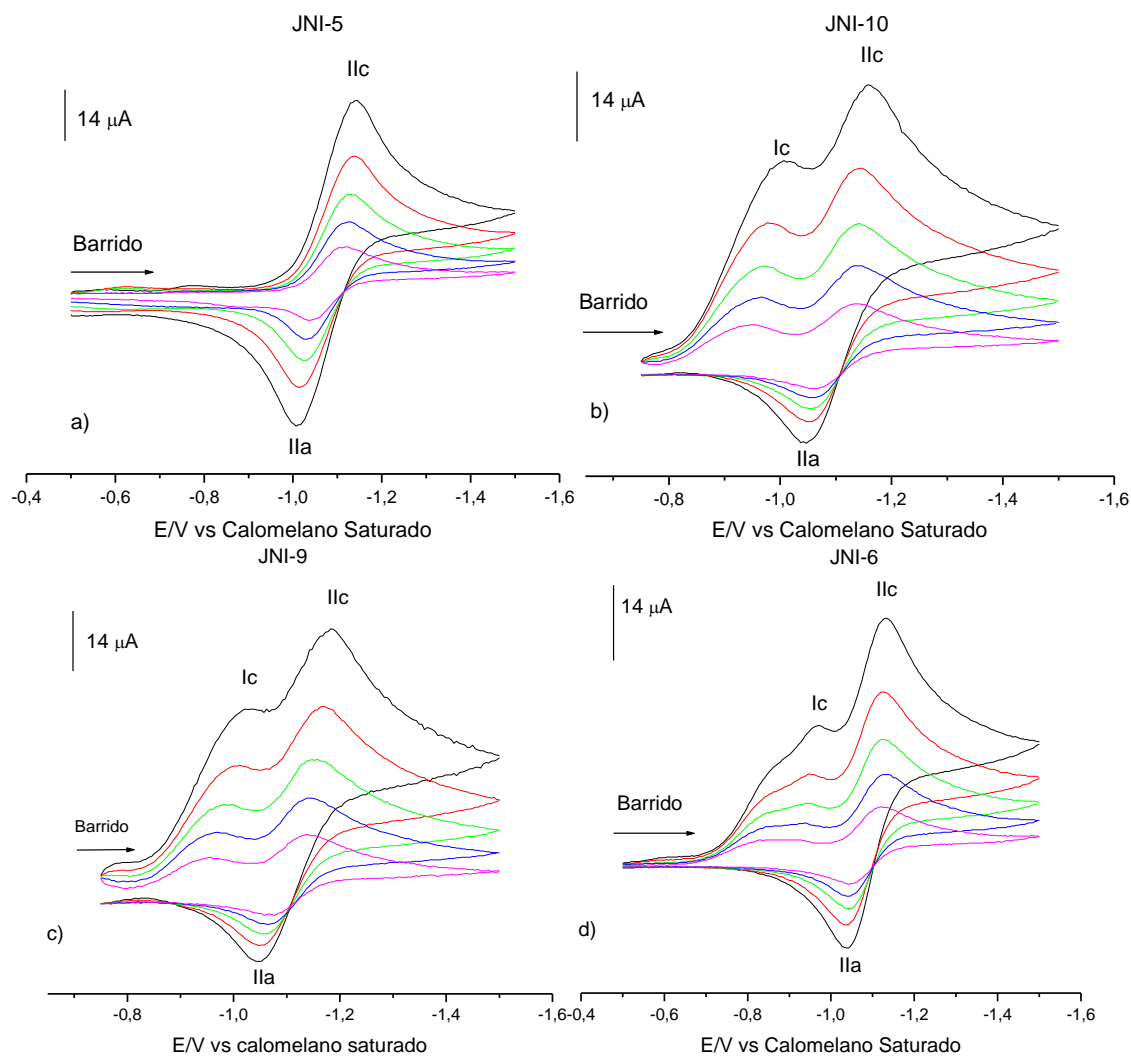


Figura 6: En a) voltamograma cíclico para el compuesto JNI-5, b) voltamograma obtenido para JNI-10, c) voltamograma obtenido para JNI-9 d) voltamograma obtenido para JNI-6 todos estos estudios fueron realizados variando las velocidades de barrido. Negro: Vel. Barrido 2 V/s, Rojo: Vel. Barrido 1V/s, Verde: Vel. Barrido 0.5 V/s, Azul: Vel. Barrido 0.25 V/s y Magenta: Vel. Barrido 0.1 V/s



Los compuestos JNI-6, JNI-9 y JNI-10 reportaron un voltamograma de tipo cuasireversible ( figura 6) y la existencia de una cupla con un  $E_{1/2}$  alrededor de -1.09 V correspondiente a la generación del anión radical nitro  $R - NO_2^-$  y un peak a un potencial catódico menor cercano a -0.97 V, este nuevo peak,  $I_c$ , corresponde a la reducción del grupo nitro en presencia de un protón interno donador, debido al hecho de que estos compuestos fueron sintetizados como clorhidratos, es decir, el primer peak corresponde a un equilibrio acido-base en medio aprótico, este es un comportamiento típico de nitrocompuestos con protones lábiles en su estructura<sup>44</sup>; esto fue demostrado adicionando una base fuerte, NaOH (0.1 M), con la finalidad de eliminar la primera señal, figura 7. En base a este estudio, se propusieron los mecanismos de reducción de las moléculas JNI-6, JNI-9 y JNI-10, ya que, las tres moléculas muestran similar comportamiento al poseer en su estructura un protón lábil.

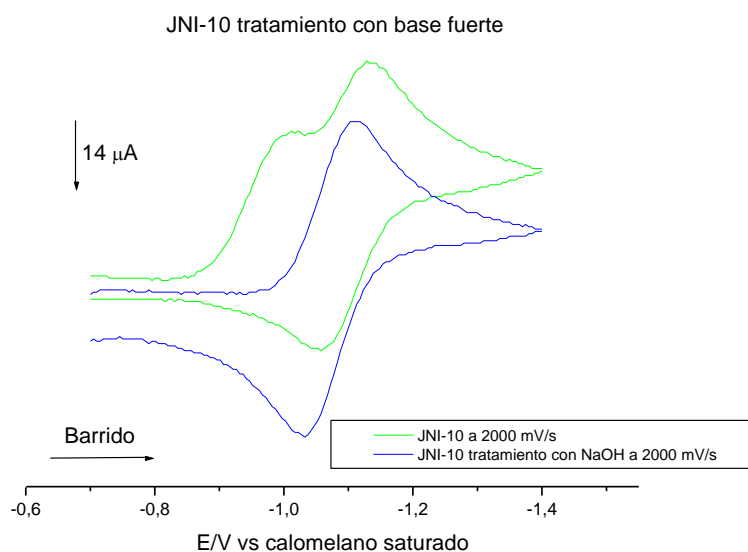


Figura 7: Tratamiento del compuesto JNI-10 con NaOH comprobándose la existencia del protón lábil.

En la primera etapa E1 ocurre una reducción electroquímica, generando el anión radical nitro respectivo, en la siguiente etapa Q1 de equilibrio ácido-base en medio aprótico, típico comportamiento de autoprotonación fenómeno observado en nitrocompuestos con grupos funcionales ácidos presentes en su estructura. El anión radical nitro generado previamente, capta un hidrógeno lábil formando dos especies: un radical protonado y la molécula inicial no reducida, sin hidrógeno lábil en su estructura ; luego la molécula neutra es reducida directamente formando un anión radical etapa E2 todos estos pasos se describen a continuación.

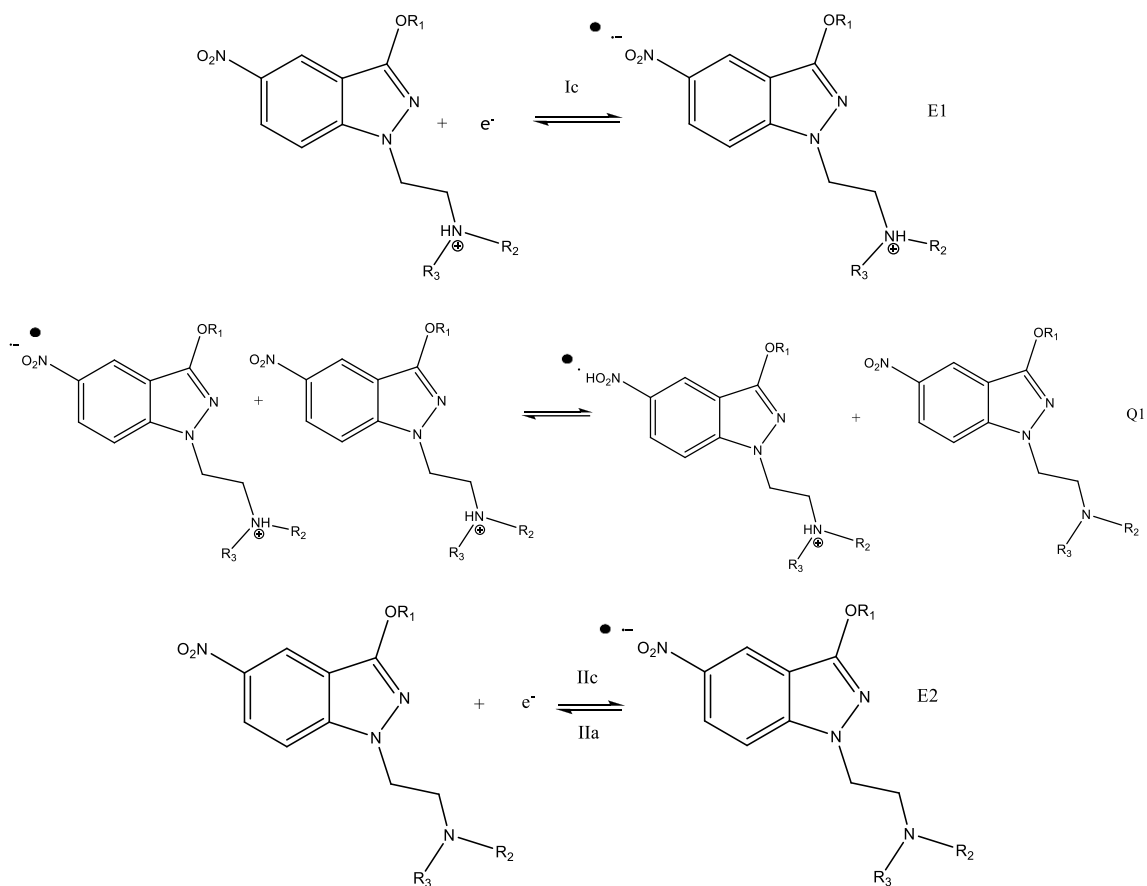
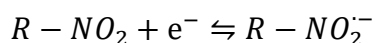


Figura 8: Mecanismo electroquímico para los derivados de 5-nitroindazol sintetizados como clorhidratos JN1-6, JN1-9 y JN1-10.

El compuesto JN1-5 se comporta de forma diferente, debido al hecho que no fue sintetizado como clorhidrato, por lo que no presenta un protón lábil, su comportamiento se puede observar en la figura 6, en donde el voltamograma obtenido es de tipo cuasireversible, con una sola cupla, es decir, una reducción monoelectrónica con un  $E_{1/2}$  alrededor de -1.13 V, sin equilibrio ácido-base acoplado, correspondiente a la formación del anión radical nitro, según la siguiente reacción:



El mecanismo de formación del anión radical nitro para el compuesto JN1-5 es el siguiente:

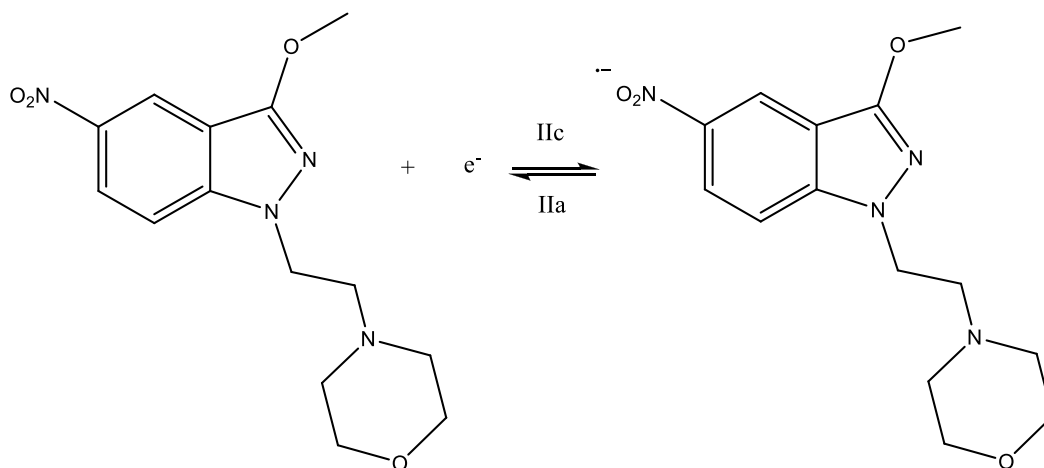


Figura 9: Mecanismo de reducción propuesto para el compuesto JN1-5.

Los estudios electroquímicos permitieron obtener los parámetros  $E_{pa}$  II y  $E_{pc}$  I y/o II,  $E_{1/2}$  y  $\Delta E$  a 2 V/s, los que se resumen a continuación en la tabla 1.

5-NI	Epc I /V	Epc II /V	Epa II /V	E <sub>1/2</sub> /V	ΔE/V
JNI-5		-1.14	-1.01	-1.08	0.13
JNI-6	-0.97	-1.13	-1.04	-1.09	0.09
JNI-9	-1.02	-1.19	-1.05	-1.12	0.14
JNI-10	-1.01	-1.16	-1.05	-1.11	0.11

Tabla 1: Parámetros electroquímicos obtenidos para los derivados de 5-nitroindazol a 2 V/s..

Todos los derivados exhibieron potenciales más negativos que nifurtimox (-0.91 V), fármaco utilizado para efectos de comparación, indicando menor capacidad para ser reducido y los potenciales se desplazaron hacia potenciales anódicos a medida que aumentaba la velocidad de barrido.

### Reactividad del anión radical nitro generado electroquímicamente con GSH

Reactividad del anión radical nitro frente a GSH

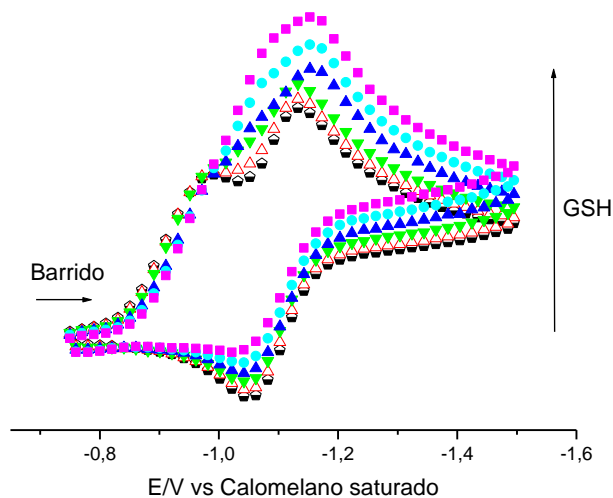


Figura 10 Efecto de la adición de glutatión sobre la reactividad del anión radical nitro formado electroquímicamente, ▲ corresponde a compuesto JNI-10 puro, ■ 0.03mM de GSH.

La reactividad del anión radical nitro generado electroquímicamente frente a glutatión fue determinada en todas las moléculas en estudio. En la figura 10 vemos la influencia de la adición de cantidades crecientes de GSH (1 mM) al sistema. Esta adición provocó una disminución del peak anódico junto con un aumento en el peak catódico esto debido al hecho de que el anión radical nitro se re-oxida inmediatamente al compuesto original por efecto del GSH, se detectaron e identificaron en base a la referencia, las especies formadas en este ciclo redox, un peak catódico alrededor de -0.62 V que corresponde a la especie reducida de glutatión GSH y un peak anódico a 0.78 V que corresponde a la especie oxidada GSSG (no mostrado) , esto de acuerdo con el trabajo realizado por Jan Vitecek y colaboradores.<sup>45</sup>

Para comprobar el efecto que produce la adición de glutatión al sistema se calcula la razón de corrientes  $I_{pa}/I_{pc}$  a una velocidad de barrido constante de 2 V/s el que fue determinado de acuerdo a la ecuación de Nicholson- Shain<sup>46</sup>.

<b>I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub></b> <b>5-NI</b>	<b>concentración GSH en el sistema mM</b>						
	0	0.005	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03
<b>JNI-5</b>	1.07	0.93	0.71	0.56	0.48	0.42	0.36
<b>JNI-6</b>	1.16	0.80	0.65	0.57	0.46	0.42	0.36
<b>JNI-9</b>	1.55	0.64	0.58	0.51	0.41	0.39	0.36
<b>JNI-10</b>	1.39	0.66	0.61	0.55	0.49	0.42	0.35

Tabla 2 Efecto de la adición de glutatión sobre la razón de corriente  $I_{pa}/I_{pc}$ .

La tabla 2 permite establecer cual sistema es el más sensible a la adición de glutatión. Se observa, que a concentración 0.005 mM de GSH en el sistema, la razón de corrientes para JNI-9 varía entre 1.55 (compuesto puro) a 0.64, constituyendo este derivado de 5-nitroindazol el que presenta una mayor perturbación en presencia de GSH. Luego en orden decreciente le sigue JNI-10, JNI-6 y finalmente JNI-5. Para todos los compuestos, a medida que aumenta la concentración de GSH en el sistema, disminuye aún más la razón  $I_{pa}/I_{pc}$  hasta llegar a un valor similar para todos los compuestos a una concentración 0.03 mM de GSH.

### **Resonancia de espín electrónico (REE)**

El anión radical nitro, detectado mediante voltametría cíclica, fue caracterizado mediante estudios de REE, siguiendo una reducción in-situ en iguales condiciones de trabajo que para los estudios electroquímicos.

Las cuatro moléculas presentaron igual patrón hiperfino (figura 11 ), es decir, un triplete asignado al núcleo del N del grupo nitro y tres dobletes asignados a los núcleos H ubicados en posición 4, 6 y 7 del benceno en el 5-nitroindazol (figura 12 ).

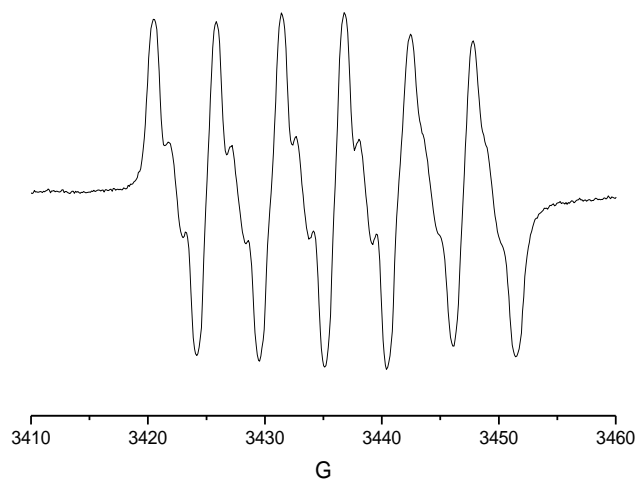


Figura 11: Espectro experimental REE del anión radical nitro de JNI-6 en DMSO generado electroquímicamente.

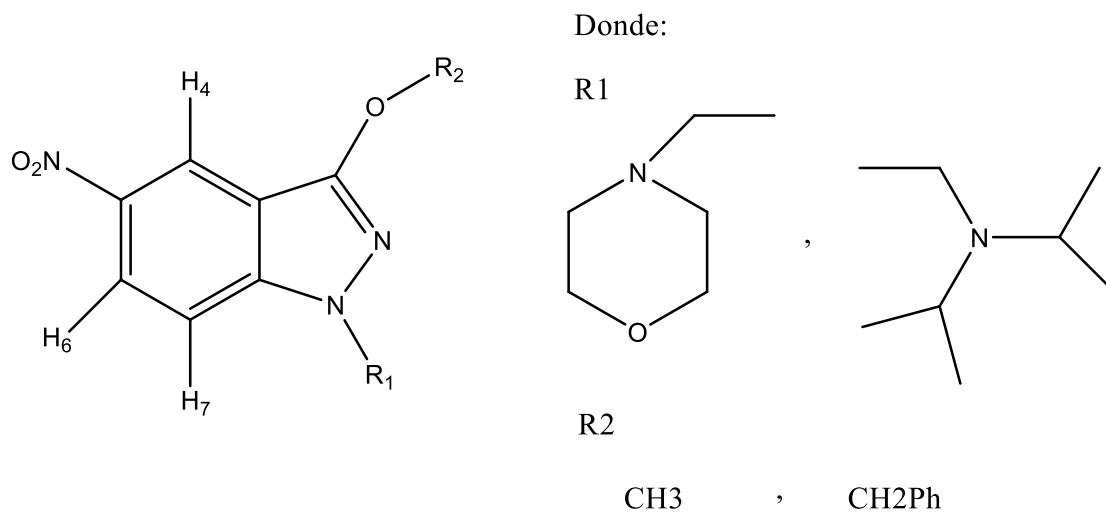


Figura 12: Estructura base responsable del patrón hiperfino determinado mediante REE.

### **Determinación de la constante de asociación mediante método solubilidad de Fase**

Mediante la metodología de solubilidad de fase fueron determinadas las constantes de asociación para los complejos formados, entre las cuatro moléculas en estudio con tres ciclodextrinas,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) (nativa), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) y 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina (DM $\beta$ CD) (estas dos últimas reciben el nombre de derivatizadas). Se obtuvieron los espectros de absorción (figura 13), en donde se observa el aumento de la absorbancia al incrementar la concentración de ciclodextrina. A medida que aumentamos la concentración de ciclodextrina en el sistema se produce una mayor solubilización del compuesto debido a la formación del complejo.

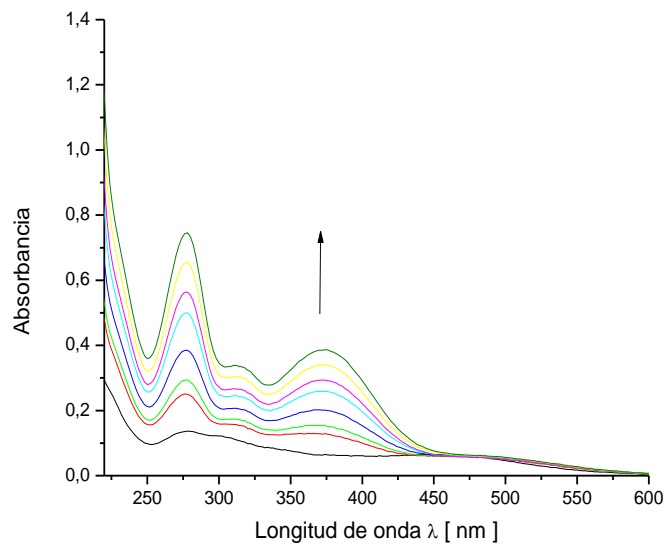


Figura 13 Espectro UV/Vis obtenido para el experimento Solubilidad de fase de JN1-9 con 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina.

La figura 14 muestra los gráficos de los experimentos de solubilidad de fase para los derivados de 5-nitroindazol con las tres ciclodextrinas. Se observa para todos los complejos una recta; lo que indica, según Higuchi-Connors<sup>39</sup>, la formación de un complejo tipo  $A_L$  lo que nos permite inferir una estequiometría 1:1. Estos resultados pueden ser corroborados utilizando la metodología de variación continua en la cual se determina la estequiometría del complejo por intermedio de los gráficos de Job.



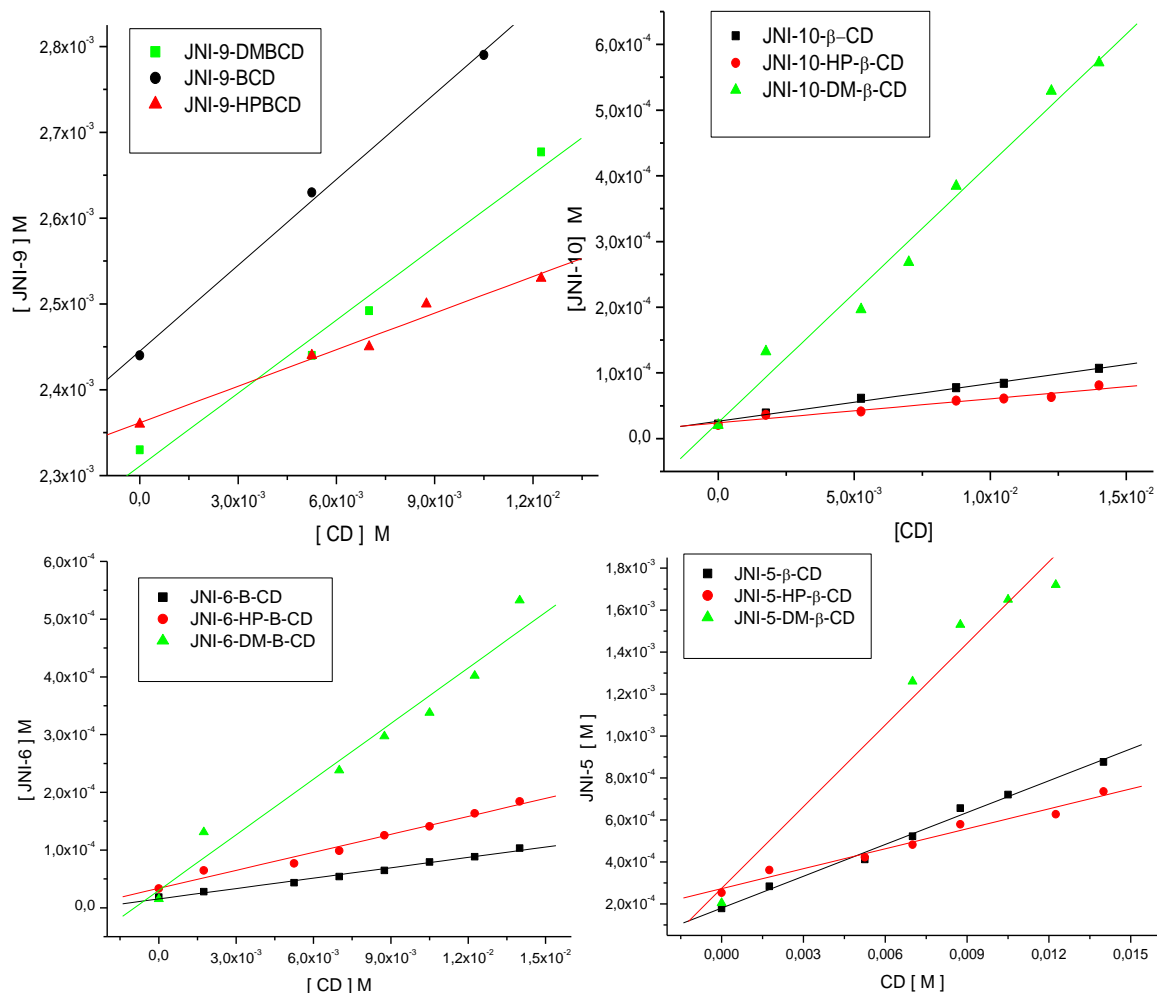


Figura 14 Gráficos obtenidos según metodología de solubilidad de fase para JN-5, JN-6, JN-9 y JN-10 con β-ciclodextrina, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina y 2,6-dimetil-β-ciclodextrina.

Los datos obtenidos por la metodología de solubilidad de fase, se ajustaron a una línea recta. Por medio de la ecuación 10, se calcularon las constantes de asociación de los complejos formados. En la tabla 3, se resumen los valores de las constantes de asociación obtenidos para los complejos formados entre JN-5, JN-6, JN-9 y JN-10 y βCD, HPβCD y DMβCD.

<b>Molécula</b>	<b>R</b>	<b><math>\beta</math>-CD [ M<sup>-1</sup>]</b>	<b>2-HP-<math>\beta</math>-CD [ M<sup>-1</sup>]</b>	<b>2,6-Dimetil-<math>\beta</math>- CD [ M<sup>-1</sup>]</b>
<b>JNI-5</b>	0.9737	296	138	542
<b>JNI-6</b>	0.9929	392	395	8955
<b>JNI-9</b>	0.9819	16	6	14
<b>JNI-10</b>	0.9950	219	200	2149

Tabla 3: Constantes de asociación obtenidas mediante metodología de solubilidad de fase para las moléculas en estudio con  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil-  $\beta$ -ciclodextrina y 2,6-dimetil-  $\beta$ -ciclodextrina.

Al observar la tabla, vemos que los compuestos JNI-5 JNI-6 y JNI-10 presentaron valores similares para sus constantes de asociación de los complejos formados con la ciclodextrina nativa e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina. En el caso de los complejos formados con 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina se presenta, un notable aumento en los valores de  $K_a$ , en donde los compuestos JNI-6 y JNI-10 obtienen valores máximos de 8955 M<sup>-1</sup> y 2149 M<sup>-1</sup> respectivamente.

Para los complejos formados entre JNI-9 y las tres ciclodextrinas los valores obtenidos para  $K_a$  son muy pequeños, lo que nos indicaría que prácticamente no se observa asociación o ésta es muy leve.

Podemos relacionar las estructuras de las moléculas en estudio con el valor de su constante de asociación. Al observar el esquema 1, JNI-6 y JNI-10 presentan en sus estructuras el grupo bencilo como sustituyente en común a diferencia de JNI-5 y JNI-9 que presentan el grupo metilo en común, por lo que podría atribuirse a esta diferencia estructural, el mayor valor de  $K_a$  para JNI-6 y JNI-10, es decir, el grupo bencilo influye positivamente en la inclusión. Por otra parte, si observamos las estructuras de JNI-5 y

JNI-9 y vemos los valores para  $K_a$ , podemos atribuir a la presencia del grupo morfolina en JNI-5 el mayor valor de  $K_a$  obtenido para esta molécula. Por consiguiente, la presencia de los sustituyentes metilo e isopropilo serían los causantes de la baja asociación de JNI-9 con las ciclodextrinas y ya que JNI-10 presenta grupos isopropilo en su estructura, esto representaría la causa de la diferencia entre el  $K_a$  de éste con  $K_a$  de JNI-6.

### **Determinación estequiometría de los complejos ciclodextrina-5-nitroindazol**

El método de variación continua permitió comprobar la estequiometría de los complejos formados para los cuatro derivados de 5-nitroindazol con las tres ciclodextrinas. Para ello se registraron los espectros UV/Vis de los complejos a diferentes fracciones molares del complejo (entre 0.1 y 1); por medio de la obtención de los gráficos de Job, que relacionan  $\Delta A$  [derivado] con la fracción molar del sistema, en donde la determinación de los  $\Delta A$  fue realizada en el máximo de absorción de menor energía, que corresponde a la longitud de onda de 362 nm, resultando todos los complejos ser de estequiometría 1:1 de acuerdo a la ecuación 13, es decir el máximo del gráfico se obtuvo a una fracción molar de 0.5, esto se observa en la figura 15, donde se muestra los resultados obtenidos para JNI-6 con las tres ciclodextrinas.

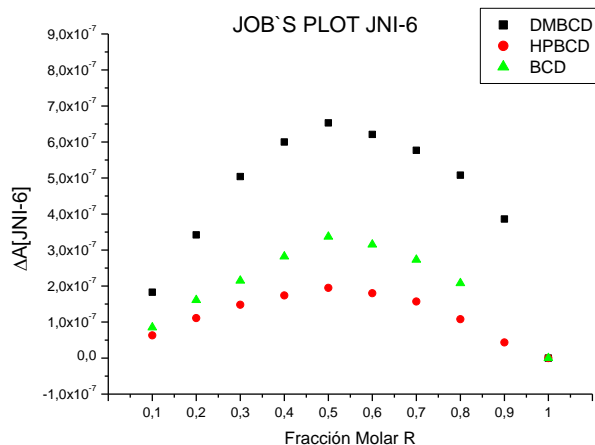
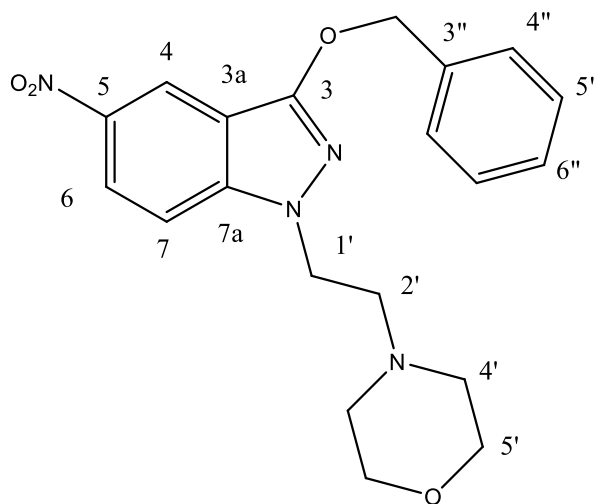


Figura 15 Gráfico de variación continua para complejos de JNI-6 con  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD y HP-  $\beta$ -CD.

### Asignación completa de los espectros RMN para JNI-6



4-(2-(3-(benziloxi)-5-nitro-1*H*-indazol-1-il)etil)morfolina

Figura 16 Numeración compuesto JNI-6, R1 corresponde a morfolina, R2 corresponde a bencilo.

Por medio del análisis de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, y posterior estudio de los espectros bidimensionales COSY, HSQC, HMBC y ROESY se hizo la asignación inequívoca del compuesto JNI-6.

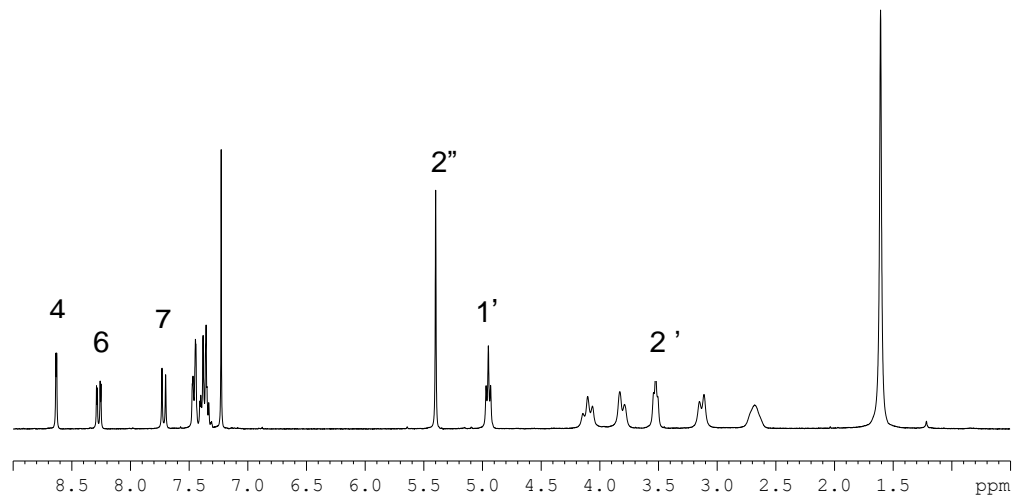


Figura 17 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN para JNI-6 en  $\text{CDCl}_3$ .

La figura 17 corresponde al espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del JNI-6 en cloroformo deuterado, donde se observa a campo bajo los protones correspondientes al anillo 5-nitroindazólico correspondientes a H4, H6 y H7, donde H4 es un doblete a 8,6 ppm que acopla en meta con H6 ( $J$  2 Hz) y que representa el protón más desapantallado debido al grupo nitro vecino. H6 se presenta a 8,3 ppm como un doblete, ya que acopla con H4 y H7 ( $J$  2 y 9.3 Hz). Este aparece también desapantallado producto del grupo electroceptor vecino. H7 aparece a 7,6 ppm como un doblete debido a su acoplamiento con H6 ( $J$  9.3 Hz). Cercana a estas señales, se observan las provenientes del bencilo, un doblete correspondiente a los protones H4'' a 7,48 ppm, a 7,36 ppm un doblete debido H5'' y a 7,36 ppm un triplete que corresponde a H6''. A campo alto a 5,4 ppm se observa un singulete con integración 2 debido al protón oximetilénico el cual se encuentra desapantallado por efecto de la presencia de oxígeno. Esta asignación es confirmada mediante la correlación a largo alcance que se establece en el espectro HMBC. De acuerdo a este espectro, C2'' correlaciona con H4'' como se observa en la tabla 4. A

campo más alto, se encuentran las señales tripletes correspondientes a los protones de la cadena alquílica H1' muy desapantallado producto del anillo aromático vecino a 4,9 ppm y H2' a 3,55 ppm por efecto del nitrógeno unido a este último, ambos integrando para 2 y los protones metilénicos del grupo morfolina H4a' a 4,1 ppm, H4b' a 3,8 ppm, H5a' a 3,1 ppm y H5b' a 2,7 ppm.

La asignación de los carbonos se realizó por medio del espectro bidimensional HMQC, que permite establecer cuáles son aquellos carbonos enlazados a su protón correspondiente, de esta forma se determinan los desplazamientos indicados en la tabla 4.

Los carbonos cuaternarios fueron determinados basándose en las correlaciones entre protones con carbonos a larga distancia visibles en el espectro HMBC, de este modo de acuerdo a la tabla 4: C3a acopla a larga distancia con H7, C7a acopla a larga distancia con H6 y H4, por otra parte C3'' acopla con H2'' a larga distancia, C3 acopla con H2'' y H4 de acuerdo al espectro HMBC y finalmente C5 acopla a larga distancia con H7 y H4. El espectro 2D-HSQC permitió confirmar las asignaciones propuestas para los desplazamientos de  $^{13}\text{C}$ -RMN, ya que este espectro muestra las correlaciones entre protones y carbonos unidos y nos permite diferenciar entre carbonos metilénicos y metinos, ya que este experimento es sensible a la fase.

Basándonos en este análisis preliminar y junto con los espectros  $^1\text{H}$ -RMN, COSY, HSQC Y ROESY en  $\text{D}_2\text{O}$  pudo establecerse la geometría de JNI-6 en solución acuosa. De acuerdo a la figura 18, el espectro ROESY nos indica las interacciones dipolares entre protones cercanos espacialmente. El H4 del indazol interacciona con el protón

oximetileno que está unido al oxígeno y a su vez al benceno, indicando que el grupo bencilo se encontraría plegado hacia el nitroindazol. Además, se observa que H7 interacciona con el metileno H1' con H4'' y con H2', y se observa la interacción entre el protón oximetileno con H5''.

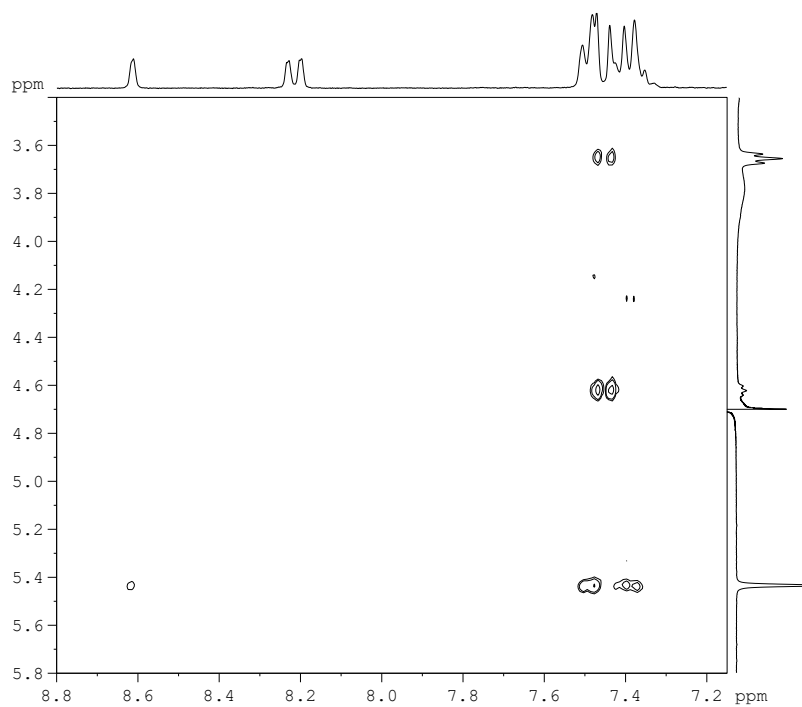


Figura 18 Espectro bidimensional ROESY para JN1-6 en D<sub>2</sub>O

<sup>13</sup> C-RMN		<sup>1</sup> H-RMN			HMBC
Carbono	δ / ppm	Protón	δ / ppm	J/Hz	C-H largo alcance
3	158.1				oximetileno H4
3 <sup>a</sup>	112.7				H7
4	118.4	H4	d 8.6 ppm	J 2 Hz	
5	141.9				H7, H4
6	123.8	H6	dd 8.3 ppm	J 2; 9.3 Hz	H4
7	109.8	H7	d 7.6 ppm	J 9.3 Hz	
7 <sup>a</sup>	143.3				H6,H4
1'	43.5	H1'	t 4.9 ppm	J 5.6 Hz	H2'
2'	55.6	H2'	t 3.55 ppm	J 5.6 Hz	
4a'	63.6	H4a'	4.1 ppm		
4b'	63.6	H4b'	3.8 ppm		
5a'	52.6	H5a'	3.1 ppm		
5b'	52.6	H5b'	2,7 ppm		
oximetileno	71.3	oximetileno	s 5.4 ppm		H4''
3''	136.6				oximetileno
4''	128.6	H8'', H4''	7.48 ppm		oximetileno
5''	127.9	H5'', H7''	7.36 ppm		
6''	128.5	H6''	7.36 ppm		

Tabla 4 Desplazamientos, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento para las señales de JN1-6 en CDCl<sub>3</sub> los espectros <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de acuerdo a la numeración establecida en la figura 16.

De acuerdo entonces a las interacciones observadas, el compuesto JN1-6 en solución acuosa tendría la siguiente conformación tipo “sandwich”, en donde el grupo bencilo se



encuentra sobre el anillo 5-nitroindazólico y el grupo morfolina por debajo del anillo base, lo que estaría descrito en la figura 19.

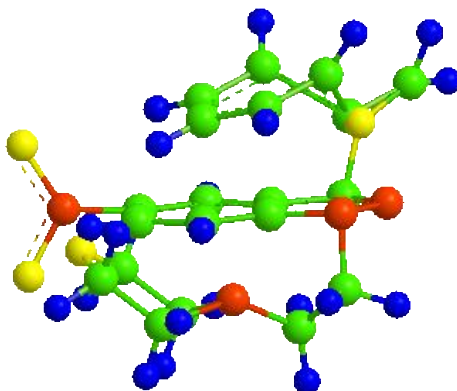


Figura 19 Geometría propuesta para JNI-6 en solución acuosa. En ROJO átomos de nitrógeno, AZUL átomos de hidrógeno, VERDE átomos de carbono, AMARILLO átomos de Oxígeno.

### ANÁLISIS DE ESPECTROS PARA JNI-5 Y JNI-10.

La asignación de los protones de los otros compuestos, se hizo en base a la asignación del JNI-6, básicamente debido a que la diferencia se encuentra sólo en los sustituyentes (esquema 1). En la tabla 5, se observan los desplazamientos asignados para JNI-5, JNI-6 y JNI-10 en D<sub>2</sub>O, de acuerdo a la numeración establecida en la figura 16 para JNI-6 y figura 20 para JNI-5 y JNI-10.

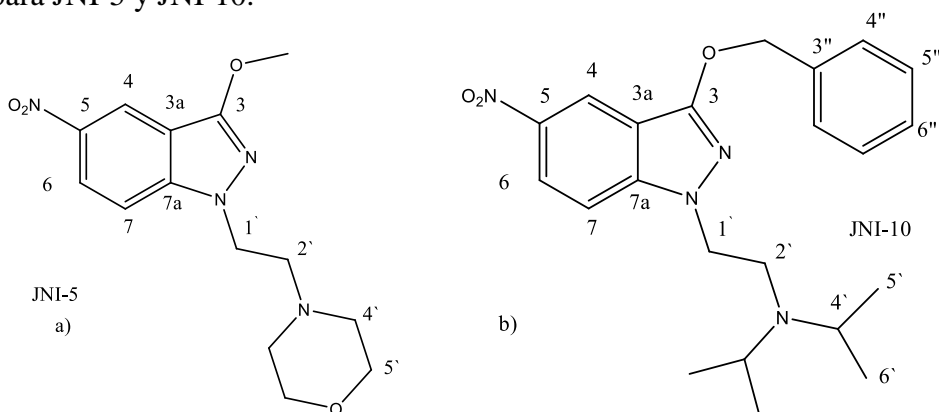


Figura 20 a) JNI-5 y b) JNI-10 numerados, donde R2 en JNI-5 corresponde a metilo, y en JNI-10 corresponde a bencilo, R1 en JNI-5 corresponde a morfolina y en JNI-10 son grupos isopropilo.

	<b>JNI-5</b>		<b>JNI-6</b>		<b>JNI-10</b>	
<b>Protón</b>	<sup>1</sup> H-RMN δ/ppm	J /Hz	<sup>1</sup> H- RMN δ/ppm	J /Hz	<sup>1</sup> H-RMN δ/ppm	J /Hz
<b>H4</b>	d 8.64	2	d 8.64	2	8.53	2
<b>H6</b>	dd 8.21	2 ; 9.3	dd 8.23	2 ; 9.3	8.18	9.3
<b>H7</b>	d 7.46	9.3	d 7.45	9.3	d 7.43	9.3
<b>H1'</b>	t 4.39		t 4.62		t 4.62	
<b>H2'</b>	t 3.62		t 3.62		t 3.62	
<b>H4'</b>	t 2.82		3,26		m 3.76	
<b>H5'</b>	t 2.46		3.83		d 1.26	
<b>H6'</b>	-	-	-		d 1.21	
<b>metoxi</b>	s 4.05					
<b>oximetileno</b>			d 5.49		d 5.40	

Tabla 5: Asignaciones para las moléculas JNI-5, JNI-6 y JNI-10 en D<sub>2</sub>O, basándose en la numeración propuesta en la figura 16 y 20.

La diferencia existente en las moléculas JNI-5 y JNI-6 en términos estructurales y que se ven evidenciadas en los espectros <sup>1</sup>H-RMN, son la existencia del grupo metilo en JNI-5 presentando un singlete a 4.05 ppm que integra para 3, mientras que en esa misma posición R<sub>2</sub> (Figura 12) JNI-6 presenta al grupo bencilo; por otra parte, JNI-10 presenta dos grupos isopropilo en la posición R<sub>1</sub>, cuyos desplazamientos químicos para ambos

grupos metilos se encuentran a 1.21 ppm y 1.26 ppm integrando para 6 respectivamente y el multiplete que corresponde al metino de los isopropilos se encuentra a 3.76 ppm integrando para 2. A diferencia del JNI-6 que presenta en su posición R<sub>1</sub> a la morfolina.

## DETERMINACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE INCLUSIÓN

En base a la diferencia en los valores de las constantes de asociación obtenidos para JNI-5, JNI-6 y JNI-10 con 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina frente a los valores de K<sub>a</sub> para los otros complejos formados, se decidió determinar la geometría de inclusión para los primeros complejos.

En la figura 21 se presenta el espectro <sup>1</sup>H-RMN para la DM $\beta$ CD en D<sub>2</sub>O, que muestra los protones internos H3, H5, H6, y externos H4, H2 y las señales de los grupos metoxilos en posición 6 y posición 2.

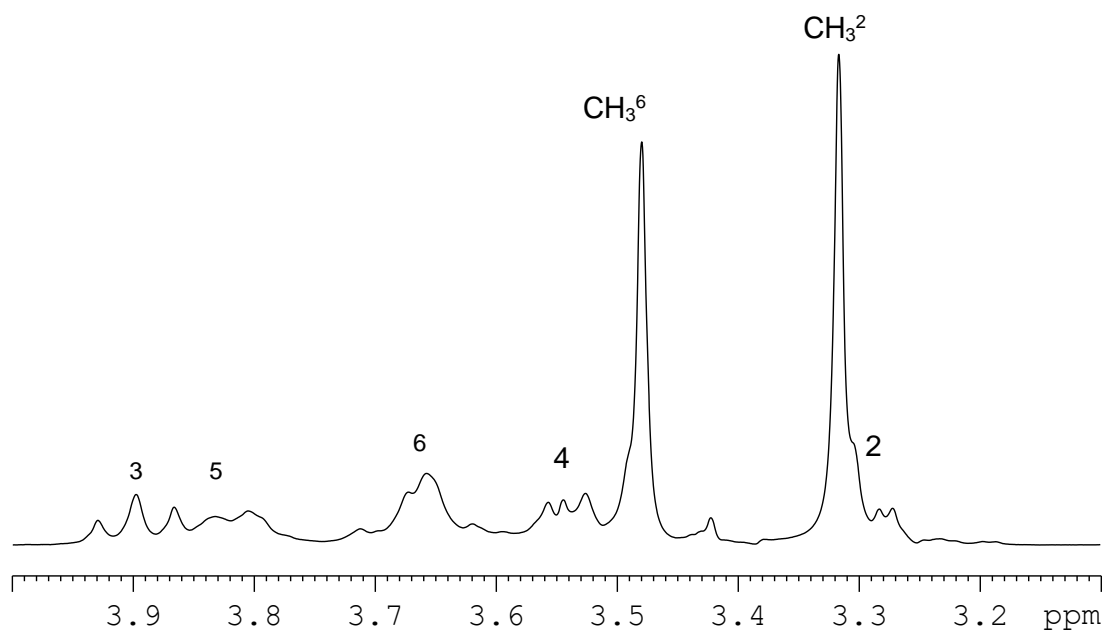


Figura 21 Espectro <sup>1</sup>H-RMN para 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina.

El espectro 2D-HSQC que correlaciona los carbonos con los protones directamente unidos permitió realizar la asignación de las señales de la DM $\beta$ CD, como sigue: el protón anomérico H1 aparece como un doblete a 5.16 ppm, a 3.89 ppm se observa la señal del H3 (triplete), luego el doble doblete correspondiente a H5 aparece a 3.81 ppm y el H6 a 3.65 ppm. Las señales del protón 2 y 4 aparecen casi superpuestas con las de los metilos 2 y 6 a 3.54 ppm (doble doblete) y un triplete a 3.29 ppm respectivamente.

Para la determinación de la geometría de inclusión del complejo JN1-6-DM $\beta$ CD se obtuvieron los espectros  $^1\text{H}$ -RMN para JN1-6 libre y formando el complejo con 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina. Se puede identificar los desplazamientos de los protones de la ciclodextrina hacia campo alto producto de la formación del complejo JN1-6-DM $\beta$ CD. En la zona aromática, se observa un desplazamiento a campo alto de los protones H4 y H6 del indazol por efecto de la inclusión. Este mismo efecto se observa para los protones H2', H5'.

Los protones H4' de la morfolina no se observan debido a que estos están superpuestos en la misma zona de la ciclodextrina. Por lo cual se procedió a realizar un espectro HSQC del complejo, para identificar correctamente los protones H3, H5 y H6 de la ciclodextrina como también para ver el desplazamiento de los protones H4'. La ventaja de utilizar HSQC, es que nos permite identificar los metilenos de los metinos y metilos, pues estos aparecen con fase inversa en el espectro (figura 22).

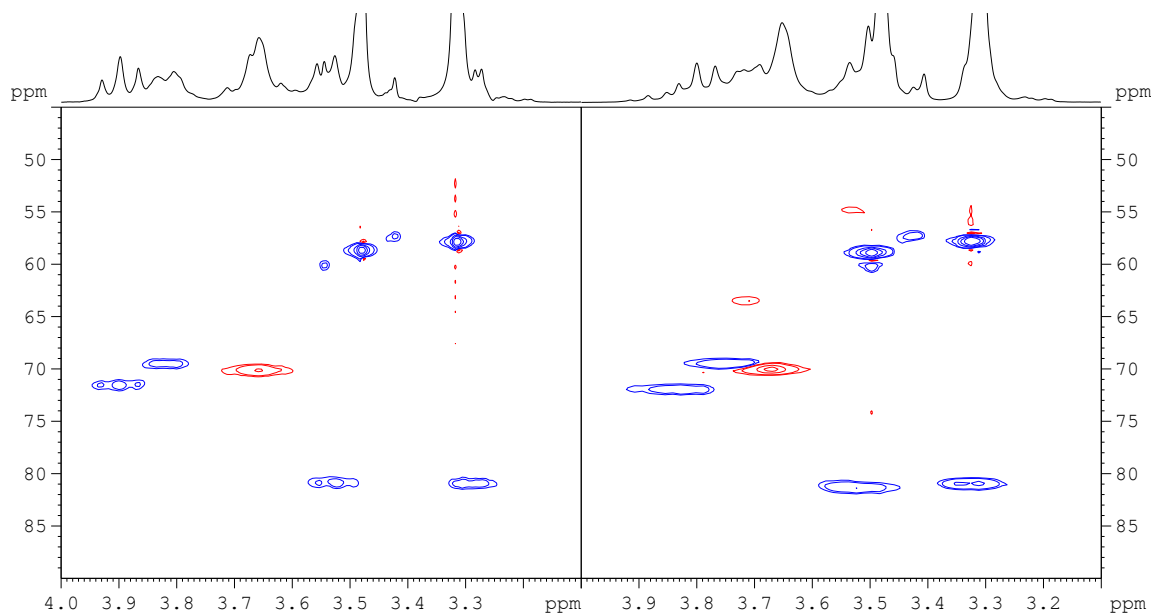


Figura 22 Espectros 2D-HSQC obtenidos para DM $\beta$ CD en (a) y en (b) para el Complejo DM $\beta$ CDJNI6.

El espectro ROESY de la figura 23 nos muestra la región de picos de cruce ampliada entre los protones de la DM $\beta$ CD y los protones aromáticos del JNI-6. Las interacciones dipolares presentes en el complejo JNI-6-DM- $\beta$ -CD son entre los protones aromáticos H4'' con H3 y H5 de la ciclodextrina, además se observa H5''y H6'' interactúan con el protón 6 de la ciclodextrina. El protón H4 presente en el anillo 5-nitroindazólico interactúa con H5 de la ciclodextrina. A su vez, se observa que el H7 del anillo indazolinico interactúa con H1' de la cadena alquílica indicando que la geometría que tiene JNI-6 en solución se mantiene al incluirse en la ciclodextrina.

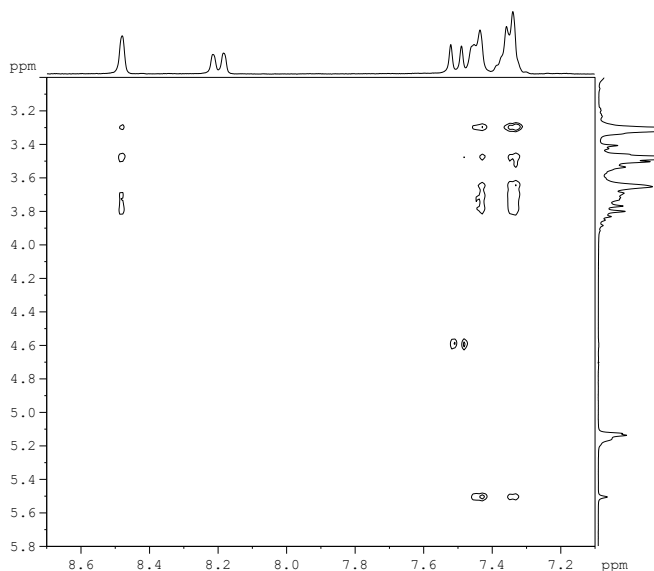


Figura 23 Espectro bidimensional ROESY obtenido para el complejo JN16DM $\beta$ CD.

En la tabla 6 se detallan los desplazamientos químicos del JN1-6 libre y formando complejos con DM $\beta$ CD, además de la diferencia de éstos. Se observa claramente que los protones H2' y H5' tienen un gran desplazamiento a campo alto, mientras que los protones H4' es a campo bajo; en cambio los protones aromáticos H4, H6 del anillo 5-nitroindazólico y los del bencilo también se desplazan a campo alto pero en menor grado que los de la morfolina.

También se muestran las diferencias entre los desplazamientos para la DM $\beta$ CD libre y formando el complejo, resultando mayores  $\Delta\delta$  (ppm) para el H3 y H5 de la CD, coincidiendo esto con las interacciones encontradas en el espectro ROESY.

De acuerdo a estos datos, podemos suponer que serían los protones H3 y H5 de la CD aquellos que interactuarían con el derivado 5-nitroindazólico y que, por consiguiente la inclusión sería por el lado ancho de la ciclodextrina, en adición a esto y en base a lo analizado en el espectro ROESY sería la región del H4 del nitroindazol junto con el

sustituyente bencilo la que estaría más incluida en la cavidad. Además el grupo bencilo estaría sobresaliendo por el lado angosto de la ciclodextrina y la morfolina se encontraría por el lado ancho de la ciclodextrina.

<b>H</b>	<b>JNI-6 <math>\delta</math> ppm</b>	<b>JNI-6- DM-<math>\beta</math>-CD</b>	<b><math>\Delta\delta</math>(libre-unido)</b>
<b>4</b>	d 8.64	8.56	0.08
<b>6</b>	dd 8.23	8.20	0.03
<b>7</b>	d 7.45	7.50	-0.05
<b>4''</b>	d 7.49	7.44	0.05
<b>5''</b>	d 7.39	7.34	0.05
<b>6''</b>	t 7.36	7.34	0.02
<b>oximetilenico</b>	d 5.49	5.49	0
<b>1'</b>	t 4.62	4.58	0.04
<b>2'</b>	t 3.62	3.49	0.13
<b>4'</b>	3.26	3.67	-0.41
<b>5'</b>	3.83	2.96	0.87
	DM- $\beta$ -CD		
<b>H<sub>3</sub></b>	t 3.89	3.84	0.05
<b>H<sub>5</sub></b>	tt 3.81	3.77	0.04
<b>H<sub>6</sub></b>	3.65	3.64	0.01

Tabla 6 En la tabla se detallan los  $\Delta\delta$ (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-6 y DM $\beta$ CD y para los  $\Delta\delta$  la ciclodextrina.

Para la determinación de la geometría de inclusión del complejo formado entre JN1-10 y la DM $\beta$ CD, se siguió el mismo procedimiento que con el complejo anterior calculándose los  $\Delta\delta$ (ppm) entre los desplazamientos del JN1-10 libre y el complejo, los resultados se disponen en la tabla 7. Debido a que algunos protones se encontraban superpuestos, fue necesario registrar el espectro HSQC para determinar los desplazamientos químicos y asignar adecuadamente los protones de la ciclodextrina, (figura 24) para hacer el estudio de inclusión.

El espectro ROESY obtenido para el complejo JN1-10-DM $\beta$ CD (figura 25) nos permite establecer las interacciones entre los protones internos de la ciclodextrina y los protones del sustrato. Se observa la interacción dipolar entre H6 de la CD con H4 del anillo 5-nitroindazólico y también con todos los protones del bencilo. Además, en la región alquílica de JN1-10, es decir, los protones metínicos del sustituyente isopropilo, interaccionan con el H5 de la ciclodextrina, esto pudo ser corroborado gracias al espectro HSQC. También se observa que los grupos metilos de este sustituyente interaccionan fuertemente con H5 de la ciclodextrina.



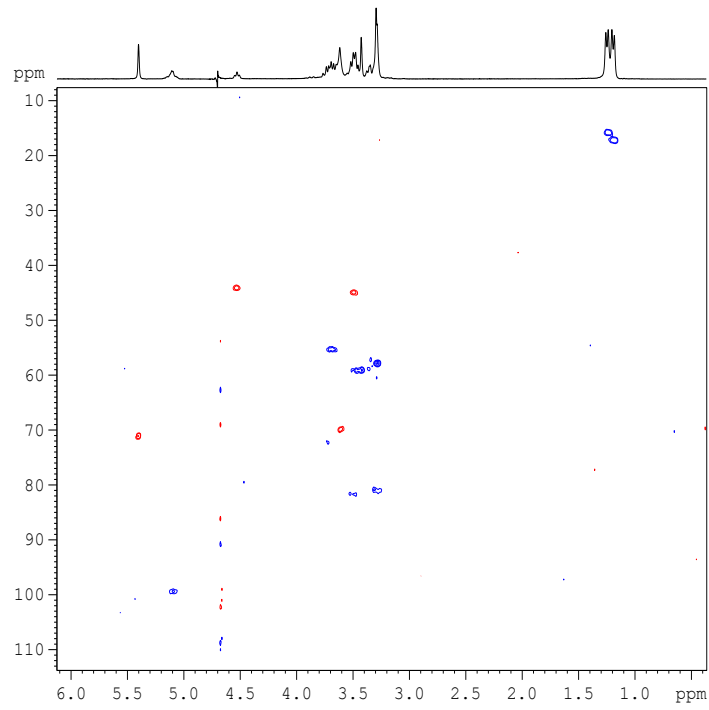


Figura 24 Espectro HSQC complejo JNI-10-DM $\beta$ CD

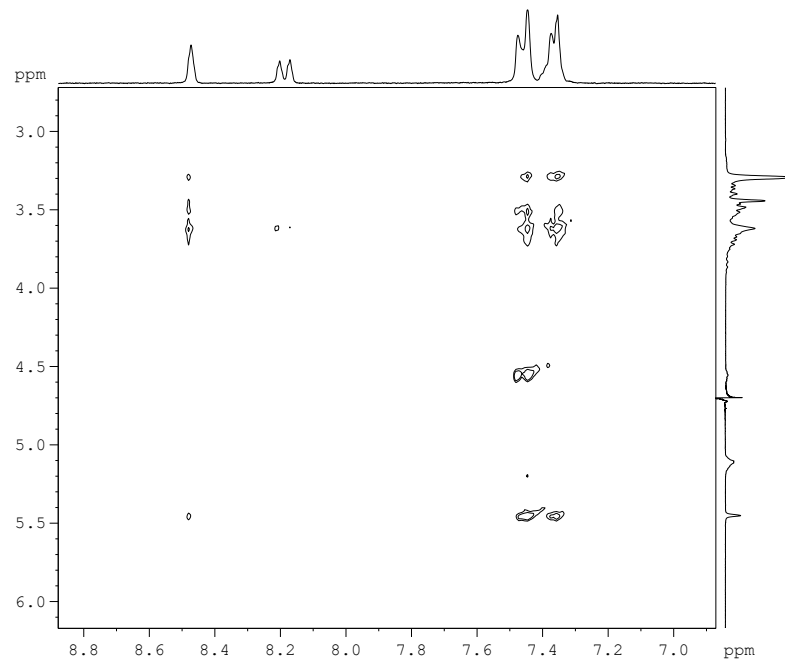


Figura 25 Espectro ROESY para zona aromática del complejo JNI-10-DM $\beta$ CD

<b>H</b>	<b>JNI-10 <math>\delta</math> ppm</b>	<b>JNI-10DM<math>\beta</math>CD <math>\delta</math> ppm</b>	<b><math>\Delta\delta</math>(libre-unido)</b>
<b>4</b>	d 8.53	8.40	0.13
<b>6</b>	dd 8.18	8.17	0.01
<b>7</b>	d 7.43	7.40	0.03
<b>4''</b>	d 7.43	7.34	0.09
<b>5''</b>	d 7.41	7.45	-0.04
<b>6''</b>	t 7.36	7.45	0.04
<b>oximetilenico</b>	d 5.40	5.41	-0.01
<b>1'</b>	t 4.56	4.53	0.03
<b>2'</b>	t 3.50	3.50	0
<b>4'</b>	m 3.76	3.72	0.04
<b>5'</b>	d 1.26	1.23	0.03
<b>7'</b>	d 1.21	1.18	0.03
	DM- $\beta$ -CD		
<b>H<sub>3</sub></b>	t 3.89	3.72	0.17
<b>H<sub>5</sub></b>	tt 3.81	3.67	0.14
<b>H<sub>6</sub></b>	3.65	3.62	0.03

Tabla 7 En la tabla se detallan los  $\Delta\delta$  (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-10 y DM $\beta$ CD y se muestran además los  $\Delta\delta$  de la ciclodextrina.

De acuerdo a los datos obtenidos el JN1-10 estaría incluido por el lado secundario de la ciclodextrina, con el sustituyente isopropilo hacia el lado ancho de la ciclodextrina y el grupo bencilo estaría sobresaliendo levemente por el lado angosto de la ciclodextrina.

Debido al hecho de que el complejo JN1-5-DM $\beta$ CD presentó un constante de asociación de 542 M<sup>-1</sup> mucho menor que los otros complejos, el espectro ROESY no pudo ser obtenido ya que la concentración del sustrato era muy baja.

Es por esta razón que sólo se determinaron los  $\Delta\delta$  y se utilizaron como criterio para proponer una geometría de inclusión.

En la tabla 8 se detallan los desplazamientos para el derivado de 5-nitroindazol libre y formando complejo con 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, así como también los valores de  $\Delta\delta$  (ppm) calculados.

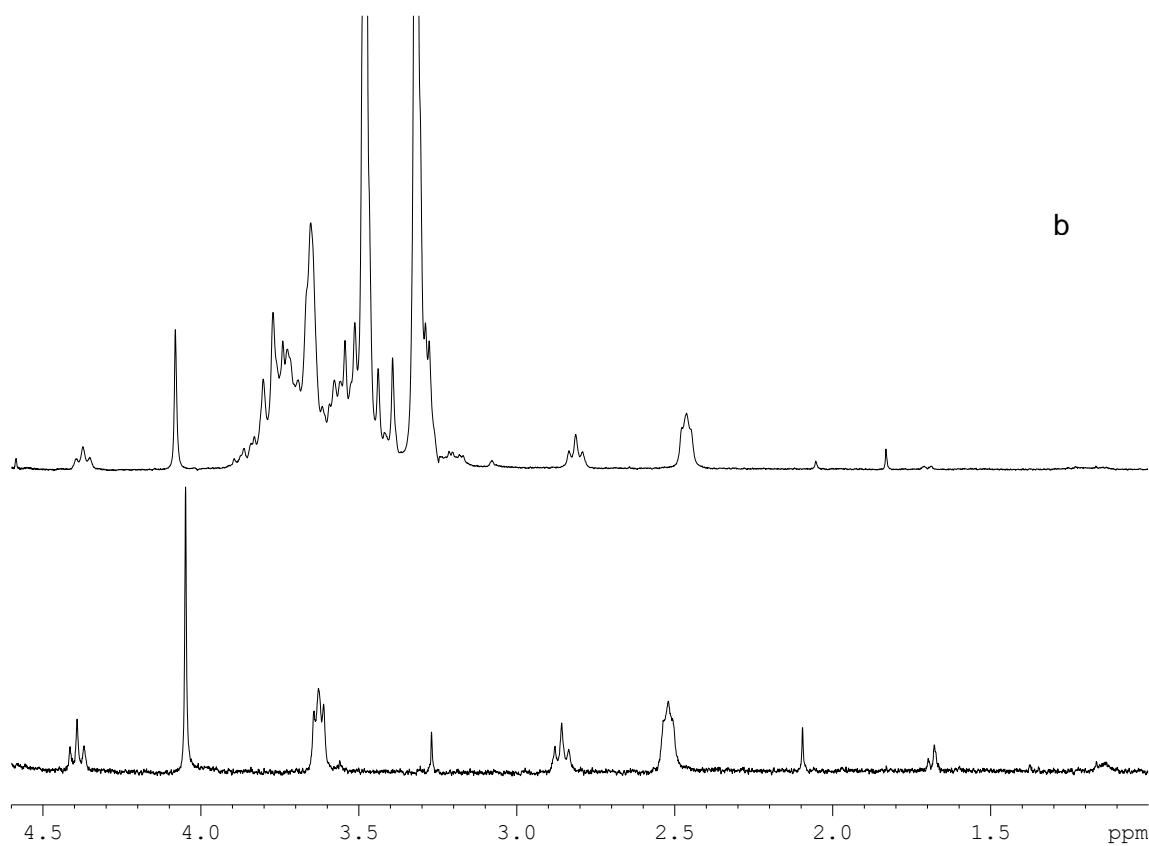
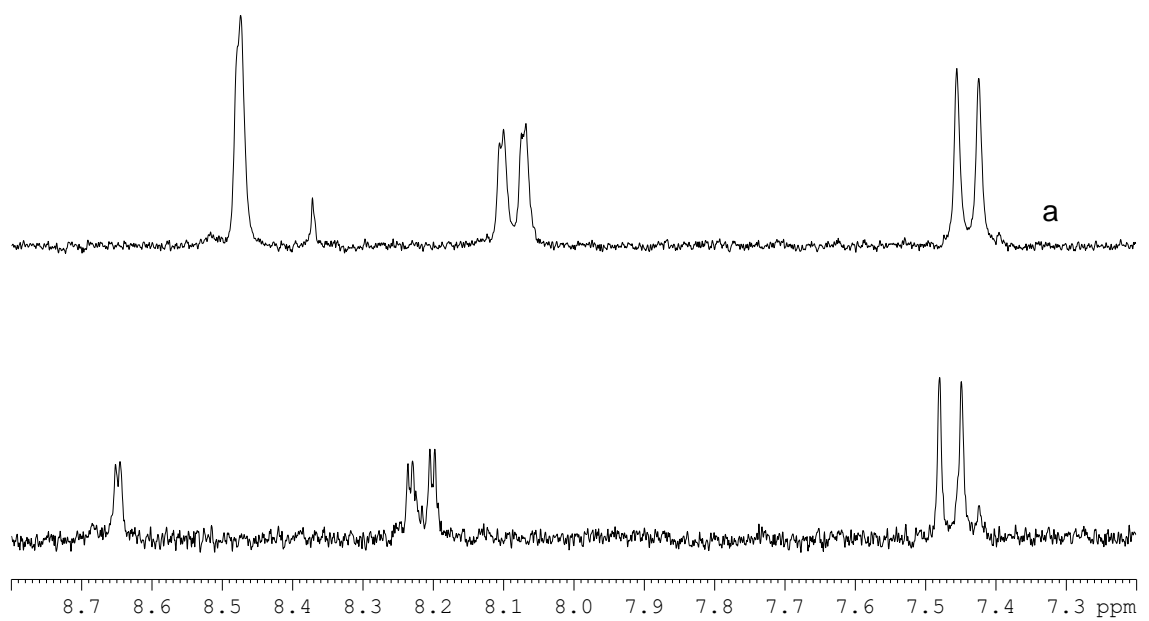


Figura 26 Espectros <sup>1</sup>H-RMN a) Zona aromática del complejo JNI-5DMβCD y b) Zona alifática del complejo JNI-5DMβCD en las dos figuras el espectro inferior corresponde a JNI-5 libre.

<b>H</b>	<b>JNI-5 δ ppm</b>	<b>JNI-5- DM-β-CD δ ppm</b>	<b>Δδ(solo-incluido)</b>
<b>4</b>	d 8.64	8.47	0.17
<b>6</b>	dd 8.21	8.08	0.13
<b>7</b>	d 7.46	7.44	0.02
<b>1'</b>	t 4.39	4.33	0.06
<b>2'</b>	t 3.62	ND	ND
<b>4'</b>	2.82	2.85	-0.03
<b>5'</b>	2.46	2.48	-0.02
<b>metoxi</b>	s 4.05	4.08	-0.03
	DM-β-CD		
<b>H<sub>3</sub></b>	t 3.89	3.77	0.12
<b>H<sub>5</sub></b>	tt 3.81	3.74	0.07
<b>H<sub>6</sub></b>	3.65	3.65	0

Tabla 8 Detalle de los Δδ (ppm) calculados para el complejo formado entre JNI-5 y DMβCD y se muestran además los Δδ de la ciclodextrina.

La mayor diferencia se observa para los protones aromáticos del indazol, específicamente el H4 y H6. El protón H3 y H5 de la CD presenta también un gran desplazamiento a campo alto, producto de la inclusión del anillo aromático, lo que estaría indicando una inclusión por el lado ancho de la ciclodextrina.

De acuerdo a lo anterior JNI-5 estaría incluido por la parte ancha de la 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina con la morfolina interactuando con los protones H3 y H5 de la ciclodextrina y el anillo 5-nitroindazolico estaría dentro de la cavidad.

---

## CONCLUSIONES

---

- El estudio electroquímico permitió determinar la formación del anión radical nitro, de acuerdo a la estructura de los nitrocompuestos se postularon dos mecanismos de reducción; el primero, una reducción monoelectrónica para el derivado JNI-5 y para las restantes moléculas una reducción monoelectrónica I, luego un equilibrio ácido-base seguido de una reducción monoelectrónica II.
- Los potenciales de reducción de las moléculas en estudio fueron mayores que nifurtimox, por lo que serían más difíciles de reducir que el fármaco comercial.
- El estudio de reactividad frente a glutatión del anión radical nitro generado electroquímicamente permitió diferenciar los compuestos en estudio en función de su reactividad resultando en forma decreciente de reactividad JNI-9 > JNI-10 > JNI-6 > JNI-5.
- El estudio REE permitió comprobar los estudios electroquímicos en relación a la generación del anión radical nitro.
- Se determinaron mediante metodología de solubilidad de fase las constantes de asociación para todos los compuestos en estudio destacándose los valores de  $K_a$

para el complejo formado entre JNI-6 y JNI-10 con 2,6-DM-  $\beta$ -ciclodextrina, obteniendo valores de  $8955 \text{ M}^{-1}$  para el primero y  $2149 \text{ M}^{-1}$  para el segundo.

- La correlación de los valores de  $K_a$  con la estructura permitió discriminar qué tipo de sustituyentes son necesarios para mejorar la inclusión de los derivados de 5-nitroindazol en la ciclodextrina, en donde el grupo bencilo y grupo morfolina de acuerdo a este estudio representan los sustituyentes que favorecieron la formación del complejo.
- La estequiometría de los complejos formados fue en todos los casos 1:1 resultado determinado mediante la obtención de gráficos Job.
- Se determinó la geometría en solución acuosa para JNI-6 determinándose que la cadena alifática y el sustituyente bencilo se encuentran plegado hacia el protón 4 y 7 del anillo 5-nitroindazólico respectivamente, formando un ordenamiento tipo “sandwich”.
- El cálculo de los  $\Delta\delta$  entre los compuestos libres y formando complejos con 2,6-DM-  $\beta$ -ciclodextrina junto con el análisis de los espectros ROESY y HSQC nos permiten concluir que la inclusión de los complejos formados entre ésta ciclodextrina y JNI-5, JNI-6 y JNI-10 se produce por el lado ancho de la ciclodextrina, donde JNI-5 tiene el anillo nitroindazólico al interior de la cavidad



y el grupo morfolina estaría por el lado ancho de la ciclodextrina, JNI-6 tendría la región del H4 del nitroindazol junto al sustituyente bencilo más incluida en la cavidad, sobresaliendo este último por el lado angosto de la ciclodextrina y la morfolina se encontraría por el lado ancho de la ciclodextrina y JNI-10 tendría el sustituyente isopropilo hacia el lado ancho de la ciclodextrina y el grupo bencilo estaría sobresaliendo levemente por el lado angosto de la ciclodextrina.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1.-WHO, Chagas Disease: Strategic Direction for Research. Disease Burden and Epidemiological Trends, <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>, Revisado en Agosto 2008.
- 2.- Cançado JR, Brener Z: **Terapeutica. In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, (eds), Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp. 362-424, 1979.
- 3.- Storino RA, Gallerano R, Sosa R: **Tratamiento antiparasitario específico. In: Enfermedad de Chagas**, (eds.), Buenos Aires, Mosby-Doyma Argentina S.A., pp 557-68, 1994.
4. Fairlamb A: **Biochemistry of trypanosomiasis and rational approaches to chemotherapy**, Trends Biochem Sci 7: 249-53, 1982.
5. Stoppani AOM: **Rational approaches to Chagas' disease chemotherapy. In: New strategies for orphan drugs**, (ed.) Accademia Nazionale delle Scienze, detta dei XL, Roma, pp. 125-39, 1986.
6. Marr JJ, Docampo R: **Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research**, Rev Infect Dis 8: 884-903, 1986.
7. Docampo R, Moreno SNJ: **Free radical metabolism of antiparasitic agents**. Fed Proc 45: 2471-6, 1986.
8. Morello A, Aldunate J, Letelier ME, Repetto Y: **Bases bioquímicas de la acción de drogas antichagásicas**, Arch Biol Med Exp 21: 93-9, 1988.
9. Castro GD, Castro JA: **Formación de especies químicas reactivas en la biotransformación de xenobióticos y toxicología**, Toxicol 22: 221-38, 1988.
10. De Castro SL: **The challenge of Chagas disease chemotherapy. An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi***, Acta Trop 53: 83-98, 1993.
11. De Castro SL, Pinto MCFR, Pinto AV: **Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosona cruzi*. stablishing a structure/activity relationship**. Microbios, 78: 83-90, 1994.

- 12.- Stoppani AOM, Paulino M, Dubin M: **Oxygen radicals and the chemotherapy of Chagas disease: an overview**, Ciência e Cultura 48: 75-85, 1996.
- 13.- Frayha GJ, Smyth JD, Gobert JG, Savel J: **The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man**, Gen Pharmacol 28: 273-99, 1997.
- 14.- Laplumé H, Barousse AP, Cabrera H: **Efectos indeseables de Nifurtimox y Benznidazol**, Medicina (Buenos Aires) 42: 223, 1982.
- 15.- Castro JA, Diaz de Toranzo EG: **Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas Disease)**, Biomed Environ Sci 1: 19-33, 1988.
- 16.- Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM: **Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation**. Arch Biochem Biophys, 207: 316-24, 1981.
- 17.- Youngman RJ, Osswald WF, Elstner EF: **Crypto - OH. Radical production by nitrofurantoin**, Biochem Pharmacol, 31: 603-6, 1982.
- 18.- Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM, Leon W, Cruz FS, Villalta F, et al: **Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi***, Biochem Pharmacol 30: 1947-51, 1981.
- 19.- Docampo R, Stoppani AOM: **Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi***, Arch Biochem Biophys, 197: 317-21, 1979.
- 20.- Grinblat L, Sreider CM, Stoppani AOM: **Superoxide anion production by lipoamide dehydrogenase redox-cycling: effect of enzyme modifiers**, Biochem Int 23: 83-92, 1991.
- 21.- Grinblat L, Sreider CM, Stoppani AOM: **Nitrofurantoin inhibition of yeast and rat tissue glutathione reductase**, Biochem Pharmacol 38: 767-72, 1989.
- 22.- Kedderis GL, Miwa GT: **The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents**, Drug Metab Rev 19: 33-62, 1988.
- 23.- Edwards DI: **Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms.II. Mechanisms of resistance**, J Antimicrob Chemother 31: 201-10, 1993.
- 24.- Boveris A, Stoppani AOM: **Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi***. Experientia 33: 1306-1308, 1977.

- 25.- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM: **Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi***, J Biochem 188: 643-8, 1980.
- 26.- Kedderis GL, Argenbright LS, Miwa GT: **Covalent interaction of 5-nitroimidazoles with DNA and protein in vitro: mechanism of reductive activation**. Chem Res Toxicol 2: 146-9, 1989.
- 27.- Maya J., Bollo S., Nuñez-Vergara L. , Squella J. , Repetto Y., Morello A.,Péirié J. , Chauvière G. **“Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives”**, Biochemical Pharmacology 65: 999–1006, 2003.
- 28 Carvalho S., Lopes F, Salomao K., Romeiro N., Wardell S. , de Castro S., da Silva E. and Fraga C., **“Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives”**, Bioorganic & Medicinal Chemistry 16: 413–421, 2008.
- 29.- Man-Chin Chung, Carvalho Guido R., Favarato Martinelli T., Ferreira Gonçalves M., Carneiro Polli M., Alves Botelho K., Varanda E., Colli W., Miranda M. Teresa and Ferreira E., **“Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug”**, Bioorg. Med. Chem. 11: 4779–4783, 2003.
- 30.- Aguirre G., Boiani L., Cerecetto H., Fernández M., González M., Denicola A., Otero L., Gambino D., Rigol C., Olea-Azar C. and Faundez M., **“In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones”** Bioorganic & Medicinal Chemistry 12: 4885–4893, 2004.
- 31.- Rigol C., Olea-Azar C., Mendizábal F., Otero L., Gambino D., González M., Cerecetto H., **“Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs”** Spectrochimica Acta Part A 61: 2933–2938, 2005.
- 32.- Arán V., Ochoa C., Boiani L., Buccino P., Cerecetto H., Gerpe A., González M., Montero D., Nogal J., Gómez-Barrio A., Azqueta A., López de Ceráin A., Piro O. y Castellano E.. **“Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives”** Bioorganic & Medicinal Chemistry 13: 3197–3207, 2005.

- 33.- Rodríguez J., Olea-Azar C., Barriga G., Folch C., Gerpe A., Cerecetto H., González M., **“Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3- hydroxy and 3-oxo derivatives”** Spectrochimica Acta Part A 70: 557–563, 2008.
- 34.- Jullian C., Morales-Montecinos J., Zapata- Torres G., Aguilera B., Rodriguez J., Arán V. and Olea-Azar C., **“Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusión complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins”** Biorganic & Medicinal Chemistry 16 :5078-5084, 2008.
- 35.- Leyva E., Moctezuma E., Strouse J. and García-Garibay M., **“Spectrometric and 2D NMR Studies on the Complexation of Chlorophenols with Cyclodextrins”**, Journal of Inclusion phenomena and Macrocyclic Chemistry 39: 41-46, 2001.
- 36.- Ventura C, Giannone I, Paolino D., Pistarà V., Corsaro A., Puglisi G. **“Preparation of celecoxib-dimethyl- $\beta$ - cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study”** European Journal of Medicinal Chemistry 40: 624–631, 2005.
- 37.- Grillo R., Ferreira Silva Melo N., Morales Moraes C., Henríquez Rosa A., Frutuoso Roveda J., Menezes C., Igne Ferreira E., Fernandes Fraceto L. **“Hydroxymethylnitrofurazone:Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complex: A Physical-Chemistry Characterization”**, J. Biol. Phys. DOI 10.1007/s10867-008-9054-7, 2008.
- 38.-Christopher M, A. Brett and Ana María Oliveira Brett, **“Electrochemistry, Principles, Methods, and Applications”**, Oxford University Press, 12: 260,1993.
- 39.- Higuchi, T.; Connors, K. A.**“Phase-solubility techniques”**, Adv. Anal. Chem. Instr., 4:117, 1965.
- 40.- Martin Del Valle E. M. **“Cyclodextrins and their uses: a review”**, Process Biochemistry 39: 1033-1046, 2004.
- 41.- Gaspar de Araújo M., Barbosa Vieira E., Silva Lázaro G., de Souza Conegero L., Pastor Ferreira O., Almeida L., Silva Barreto L., Bezerra da Costa N., Jr. and Iara F. Gimenez **“Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modelling”** Bioorganic & Medicinal Chemistry 15: 5752–5759, 2007.
- 42.- Job P. “Formation and stability of inorganic complexes in solution”, Ann. Chim., 9:113-203, 1928.

- 43.- Silverstein, R.M. et al., **Spectrometric Identification of Organic compounds**, Wiley International, 3a. ed, 1980.
- 44.- Olea-Azar C., Cerecetto H., Gerpe A., González M., Arán V., Rigol C., Opazo L., **“ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity”** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 63: 36-42, 2006.
- 45.- Jan Vitecek, Jitka Petrlova, Jiri Petrek, Vojtech Adam, David Potesil, Ladislav Havel, Radka Mikelova, Libuse Trnkova, Rene Kizek **“Electrochemical study of S-nitrosoglutathione and nitric oxide by carbon fibre NO sensor and cyclic voltammetry – possible way of monitoring of nitric oxide”**, Electrochimica Acta, 51: 24: 5087-5094, 2006.
- 46.- R.S. Nicholson and I. Shain. Anal. Chem. **36**:706, 1964.