

UCH-F&F  
DOC-02  
A694  
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**LABORATORIO DE BIOELECTROQUÍMICA**

# **Síntesis y Caracterización Electroquímica de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-Dihidropiridinas sustituidas**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**Luis Núñez Vergara**

**Arturo Squella Serrano**

**Jacqueline Argüello Da Silva**

**Santiago de Chile**

**2004**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, que la tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**JACQUELINE ARGÜELLO DA SILVA**

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día ..... 7 de Mayo de 2004. .....

**Directores de Tesis:**

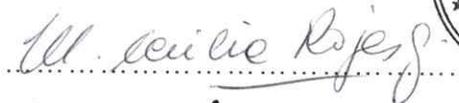
Prof. Luis J. Núñez-Vergara



Prof. Arturo Squella-Serrano

**Comisión de Evaluación de Tesis:**

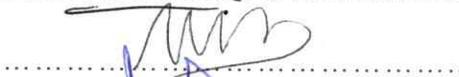
Dra. María Cecilia Rojas



Dra. Soledad Ureta



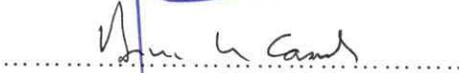
Dr. Mario Bodini



Dr. Hernán Pessoa



Dr. Bruce Cassels (Presidente)



La presente Tesis fue realizada gracias al apoyo financiero de la Beca doctoral DAAD, el Proyecto FONDECYT de líneas complementarias No 8000016 y el Proyecto de financiamiento parcial de tesis del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile (PG/84/02).

*P*orque algunos logros no son mera casualidad.

*A* mis Padres, por tan digno ejemplo de honestidad y perseverancia.

*A*l Profesor Mario Bodini, por su extraordinaria fortaleza y calidad humana.

# *Agradecimientos*

Agradezco al DAAD por la oportunidad que me ha brindado para realizar este Doctorado y a mis directores de tesis, los Profesores Arturo Squella y Luís Núñez Vergara, quienes dotados de una excepcional capacidad orientadora y humana han sabido guiar mis primeros pasos por el sendero de la ciencia.

Han transcurrido cuatro años, el tiempo ha pasado y seguirá pasando mientras que los recuerdos como un vino añejado tendrá el exquisito sabor a nostalgia cada vez que lo rememoro, hoy siento una tremenda satisfacción en reconocer el importante aporte académico y emocional de mis compañeros de doctorado: Jorge Heredia, Vladimir Lavayen, Eduardo Carrasco, Jacqueline Pezoa, Fabienne Barroso, Elizabeth Pabón.

La primera etapa en el desarrollo de esta tesis fue bastante difícil, estaba explorando un área que desconocía completamente, sin embargo la mano amiga de Danilo Saldaña, Wilson Cardona, Cristina Valencia, Neisy Mirabal, Eduardo Chamorro y Carolina Jullian me ayudaron a superar esas barreras. Agradezco a los profesores Claudio Saitz, Gérard Chauviere, Claudio Olea y Patricio Navarrete por sus buenos consejos.

Doy gracias a Dios, quien supo guiarme para escoger el Laboratorio de Bioelectroquímica para realizar mi tesis doctoral, por que allí encontré un grupo humano muy generoso que ha sabido orientarme en el campo de la electroquímica.

La comisión evaluadora constituida por los profesores María Cecilia Rojas, Soledad Ureta, Hernán Pessoa, Mario Bodini y Bruce Cassels no sólo ha acompañado el desarrollo mi tesis sino que, además, sus sugerencias y directrices han resultado en un importante aporte en mi formación científica.

La señora Miriam Salazar fue la primera persona amiga con quien contacté en Chile, por esta razón quisiera expresarle mi gratitud por todo el apoyo que me ha proporcionado y hacer extensiva este reconocimiento a la labor de la señora Gladys Urzúa y a la buena predisposición

de las señoras Cecilia, Graciela y Ximena de la Secretaria de Decanato de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Hay días más grises que otros, y en esos días es casi vital escuchar una voz amiga que intenta comprender tus vicisitudes, sostengo firmemente la idea de que una formación académica y profesional que no va acompañada de un crecimiento personal y espiritual es la edificación de un gran monumento de mármol sobre una base de paja. Por eso, a Gloria, Gabriela, Betty, Maria Ester, Paola y aún en la lejanía a Vilma, Haydee, Dolly y Daisy les doy las gracias por compartir conmigo ese don tan preciado que es la amistad.

Agradezco la cooperación de Celeste Vega (Departamento de parasitología de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid) por los análisis citotóxico reportados en esta tesis.

A pesar de la distancia mi familia siempre ha estado conmigo manifestándome todo su amor y apoyo.

Gracias a todos los que me han brindado su apoyo y confianza.

Pero por sobre todo gracias a ti Dios, por que eres la luz que guía mis pasos.

## Publicaciones

DERIVADAS DE ESTA TESIS HASTA ABRIL DE 2004

Unexpected diastereotopic behaviour in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 1,4-dihydropyridine derivatives triggered by chiral and prochiral centres. Jacqueline Argüello-DaSilva, Claudio Saitz Barría, Carolina Jullian, Patricio Navarrete, Luis Núñez Vergara, Juan A. Squella. Journal of the Brazilian Chemical Society (aceptada con correcciones)

Voltammetric oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines in protic media: substituent effect on 3,4,5 positions of the heterocyclic ring. J. Arguello, L. J. Núñez-Vergara, J.C. Sturm and J. A. Squella. Electrochimica Acta (aceptada con correcciones)

## **Presentaciones a Congresos**

Electrochemical Behavior of Some C-4 Substituted-(2-furyl-5-nitro)-1,4-dihydropyridine derivatives of Pharmacological Interest. J. Argüello D., P. Navarrete, J. A. Squella, L.J. Nuñez. **54<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)**, Sao Pedro, Brasil, 31 de Agosto a 5 de Septiembre de 2003.

Oxidación Electroquímica de 1,4-dihidropiridinas sustituidas en Medio Prótico. Jacqueline Argüello, Juan A. Squella, Luis J. Núñez-Vergara. **XXV Jornadas Chilenas de Química**, Antofagasta, Chile, 6 al 9 de Enero de 2004.

Estudio Electroquímico de 4-(5'-nitro-2'-fúril)-1,4-dihidropiridinas sustituidas en Medio Mixto. Jacqueline Argüello, Juan A. Squella, Luis J. Núñez-Vergara. **XXV Jornadas Chilenas de Química**, Antofagasta, Chile, 6 al 9 de Enero de 2004.

Estudio Electroquímico de 4-(5'-nitro-2'-fúril)-1,4 dihidropiridinas en Medio Aprótico. Jacqueline Argüello Da Silva, Luis J. Núñez-Vergara, Juan A. Squella, Patricio Navarrete. **XVI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica**, San José, Costa Rica, 9 al 14 de Febrero de 2004.

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>1.1. Antecedentes e investigación propuesta</b> .....	6
<b>1.2. Hipótesis</b> .....	9
<b>1.3. Objetivo General</b> .....	9
<b>1.4. Objetivos Específicos</b> .....	9
<b>1.5. Estructura de la tesis</b> .....	10
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	11
<b>2.1. Síntesis de 1,4-dihidropiridinas</b> .....	12
2.1.1. Compuestos.....	12
2.1.2. Reactivos de partida.....	12
2.1.3. Determinación estructural.....	13
2.1.4. Procedimiento.....	13
<b>2.2. Oxidación electroquímica de DHPs</b> .....	17
2.2.1. Compuestos.....	17
2.2.2. Medio electrolítico.....	17
2.2.3. Análisis voltamperométrico.....	17
2.2.4. Análisis coulombimétrico.....	17
<b>2.3. Electro-reducción de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs</b> .....	18
2.3.1. Compuestos.....	18
2.3.2. Medio electrolítico.....	18
2.3.3. Técnicas empleadas.....	19

<b>2.4. Estudio de estabilidad e interacción del anión radical nitro.....</b>	<b>20</b>
2.4.1. Compuestos.....	20
2.4.2. Medio electrolítico.....	20
2.4.3. Técnicas empleadas.....	20
2.4.4. Determinación del tipo de reacción electródica.....	21
2.4.5. Metodología aplicada a la caracterización cinética del anión radical nitro.....	23
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Síntesis de 1,4-dihidropiridinas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Oxidación electroquímica de DHPs.....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Medio Prótico.....	32
3.2.2. Medio Aprótico.....	53
<b>3.3. Electro-reducción de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs.....</b>	<b>58</b>
3.3.1. Medio Prótico.....	58
3.3.2. Medio Mixto.....	70
3.3.3. Medio Aprótico.....	80
<b>3.4. Estudio de estabilidad e interacción del anión radical nitro.....</b>	<b>83</b>
3.4.1. Estudio de estabilidad del anión radical nitro.....	85
3.4.1.1. Medio Mixto.....	85
3.4.1.2. Medio Aprótico.....	94
3.4.2. Estudio de la interacción del anión radical nitro.....	107
<b>4. Conclusiones generales .....</b>	<b>111</b>

<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>115</b>
<b>Apéndice A .....</b>	<b>120</b>
<b>Apéndice B.....</b>	<b>127</b>

## Indice de Figuras

<b>Figura 2.1</b>	Estructuras químicas de los compuestos sintetizados.....	12
<b>Figura 2.2</b>	Estructuras químicas de los compuestos estudiados.....	18
<b>Figura 2.3</b>	Estructuras químicas de los endo/xenobióticos.....	20
<b>Figura 2.4</b>	Principales parámetros en un voltamperograma cíclico.....	22
<b>Figura 2.5</b>	Curva teórica de trabajo para un mecanismo EQi de segundo orden. A: Dismutación, B: Dimerización.....	23
<b>Figura 3.1</b>	Estructura química de 2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-dihidropiridina.....	28
<b>Figura 3.2</b>	Simulación de una fracción del espectro <sup>1</sup> H RMN del compuesto <b>6c</b> .....	31
<b>Figura 3.3</b>	Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto <b>c</b> a diferentes valores de pH.....	33
<b>Figura 3.4</b>	Voltamperogramas cíclicos del compuesto <b>c</b> a pH 3, 7 y 11.....	35
<b>Figura 3.5</b>	a. Evolución de log <i>i<sub>p</sub></i> frente a log <i>v</i> ; b. Dependencia del potencial de oxidación con el log <i>v</i> . (compuesto <b>c</b> ).....	36
<b>Figura 3.6</b>	Evolución de los voltamperogramas de barrido lineal a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 9, 10, 11) de los compuestos <b>a-f</b> .....	37
<b>Figura 3.7</b>	Dependencia del potencial de pico con el pH de los compuestos <b>a-f</b> .....	38
<b>Figura 3.8</b>	Gráfico de <i>E</i> versus log [ <i>i</i> /( <i>i<sub>d</sub></i> - <i>i</i> )], para el compuesto <b>d</b> , a pH = 10.....	39
<b>Figura 3.9</b>	Evolución del potencial de media onda con el pH de un compuesto N-alquilado.....	40
<b>Figura 3.10</b>	Influencia del pH sobre las intensidades de corriente de los voltamperogramas de barrido lineal de los compuestos <b>a-f</b> .....	44
<b>Figura 3.11</b>	a. Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto <b>f</b> a diferentes concentraciones (pH 10). b. Gráfico de potencial de pico versus logaritmo de la concentración.....	48

<b>Figura 3.12</b>	a. Curva Carga-Tiempo del compuesto <b>b</b> , a pH 3, 7 y 11; <b>b</b> . Número de electrones calculados <i>versus</i> pH.....	49
<b>Figura 3.13</b>	Voltamperogramas de pulso diferencial de los compuestos <b>a-f</b> .....	53
<b>Figura 3.14</b>	a) Voltamperogramas cíclicos del compuesto <b>a</b> , a diferentes velocidades de barrido. b) Evolución del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad. c) Gráfico de $\log i_p - \log v$ .....	54
<b>Figura 3.15</b>	Voltamperogramas de barrido lineal de los compuestos <b>a-f</b> .....	54
<b>Figura 3.16</b>	Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto <b>f</b> . a) Adición de concentraciones crecientes de hidróxido de tetrabutilamonio. b) Completa transformación y restitución de la especie neutra.....	56
<b>Figura 3.17</b>	a) Polarogramas TAST y b) polarogramas de pulso diferencial del compuesto FDHP1, a distintos valores de pH.....	59
<b>Figura 3.18</b>	Dependencia del potencial de pico con el pH de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	60
<b>Figura 3.19</b>	Gráfico de $E$ <i>versus</i> $\log [i/(i_d - i)]$ para FDHP1, a pH = 4.....	61
<b>Figura 3.20</b>	Influencia del pH sobre la corriente límite de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	62
<b>Figura 3.21</b>	Estructura química del 2-nitrofurano.....	63
<b>Figura 3.22</b>	Efecto de sustituyente sobre los potenciales de reducción.....	64
<b>Figura 3.23</b>	Voltamperogramas cíclicos de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2, c) FDHP3, a pHs 3, 7 y 9 (0.1 V/s).....	65
<b>Figura 3.24</b>	a) Evolución de $\log i_p$ frente a $\log v$ ; b) Dependencia del potencial de reducción con $\log v$ . (FDHP2, pH 3).....	66
<b>Figura 3.25</b>	Voltamperograma cíclico de FDHP3 a pH 9 (10V/s).....	67
<b>Figura 3.26</b>	Voltamperogramas cíclicos de FDHP2, a pH 3, 0.1 V/s.....	68
<b>Figura 3.27</b>	Polarogramas de pulso diferencial de FDHP2 a diferentes valores de pH. En recuadro: Evolución de los potenciales de pico con el pH.....	70
<b>Figura 3.28</b>	Polarogramas TAST a diferentes valores de pH de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	71

<b>Figura 3.29</b>	Dependencia de la corriente límite con el pH de los compuestos: a)FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	72
<b>Figura 3.30</b>	a)Incremento en la relación $i(II)/i(I)$ con el aumento del pH y b) Dependencia de la sumatoria de $i_{Lim}$ de las ondas I y II con el pH, del compuesto FDHP1.....	72
<b>Figura 3.31</b>	Voltamperogramas cíclicos de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2, c) FDHP3, a pHs 3, 7 y 9 (0.1 V/s).....	74
<b>Figura 3.32</b>	Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental (——) del compuesto FDHP1, a pH 3.....	76
<b>Figura 3.33</b>	Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental (——) del compuesto FDHP1, a pH 9.....	78
<b>Figura 3.34</b>	Polarogramas TAST y de pulso diferencial de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	80
<b>Figura 3.35</b>	Voltamperogramas cíclicos de FDHP1 en medio aprótico.....	81
<b>Figura 3.36</b>	Voltamperogramas cíclicos de FDHP1, a pH 9.....	85
<b>Figura 3.37</b>	Voltamperogramas cíclicos, a diferentes velocidades de barrido, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	86
<b>Figura 3.38</b>	Dependencia del potencial de pico con la velocidad de barrido de: a)FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	87
<b>Figura 3.39</b>	Dependencia de $i_{pa}/i_{pc}$ con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	88
<b>Figura 3.40</b>	Dependencia de $\omega$ frente a $\tau$ de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	89
<b>Figura 3.41</b>	Efecto del cambio de concentración de FDHP1 sobre la razón de corrientes $i_{pa}/i_{pc}$ .....	90
<b>Figura 3.42</b>	a)Dependencia de la razón de corrientes con el logaritmo de la velocidad de barrido a diferentes valores de pH. b) Relación lineal de $\omega$ versus $\tau$ .....	91
<b>Figura 3.43</b>	Dependencia con el pH del logaritmo de la constante cinética del anión radical nitro de FDHP3.....	92

<b>Figura 3.44</b>	Voltamperogramas cíclicos, a diferentes velocidades de barrido, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	94
<b>Figura 3.45</b>	Dependencia de $i_{pa}/i_{pc}$ con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a)FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	94
<b>Figura 3.46</b>	Dependencia de $\omega$ frente a $\tau$ de:a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	95
<b>Figura 3.47</b>	Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental ( — ) del compuesto FDHP1, a pH 3.....	96
<b>Figura 3.48</b>	Gráfico que relaciona los potenciales de reducción con la constante cinética de segundo orden.....	97
<b>Figura 3.49</b>	Relación lineal entre los valores de $E_{pc}$ y % IC.....	99
<b>Figura 3.50</b>	a)Gráfico de $\omega$ versus $\tau$ y b) Dependencia del tiempo de vida media del anión radical de FDHP2 con la concentración.....	99
<b>Figura 3.51</b>	Evolución del par redox $RNO_2/RNO_2^-$ durante la EPC.....	100
<b>Figura 3.52</b>	Evolución de las señales de reducción correspondientes a la reducción del grupo nitro de FDHP1 en el transcurso de la EPC.....	101
<b>Figura 3.53</b>	Comparación de voltamperogramas cíclicos de FDHP1 registrados: a) A diferentes tiempos de la EPC y b) Después de la adición de base.....	102
<b>Figura 3.54</b>	Polarogramas de pulso diferencial, TAST y voltamperogramas cíclicos de la especie neutra, a, y de la especie aniónica, b, de: a) FDHP1 y b) FDHP3.....	103
<b>Figura 3.55</b>	Dependencia de $i_{pa}/i_{pc}$ con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a) FDHP1 y b) FDHP2.....	104
<b>Figura 3.56</b>	Relación lineal de $\omega$ versus $\tau$ de: a) FDHP1 y b) FDHP2.....	104
<b>Figura 3.57</b>	Dependencia de los valores de $i_{pa}/i_{pc}$ con $\text{Log } v$ de FDHP2, a diferentes concentraciones de: a) glutatión, b) adenina y c) <i>N</i> -acetilcisteína.....	107
<b>Figura 3.58</b>	Relación lineal de $\omega$ versus $\tau$ de FDHP2, a diferentes concentraciones de: a) glutatión, b) adenina y c) <i>N</i> -acetilcisteína.....	108
<b>Figura 3.59</b>	Dependencia de $k_{app}/2k_{obs}$ con la concentración del endo/xenobiótico, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.....	108

## Indice de Tablas

<b>Tabla 3.1</b>	Los sustituyentes R, R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub> de los compuestos sintetizados.....	29
<b>Tabla 3.2</b>	Potenciales de pico de los compuestos c, d y e.....	34
<b>Tabla 3.3</b>	Valores de $\alpha n$ y p, a pH = 10.....	39
<b>Tabla 3.4</b>	Valores de E ½ a pH 3 y a pH 11.....	43
<b>Tabla 3.5</b>	Número de electrones calculados por coulombimetría a pH 3 y pH 11...	47
<b>Tabla 3.6</b>	Valores de E ½ y Nro de electrones determinados.....	55
<b>Tabla 3.7</b>	Diferencia de potenciales de oxidación entre la dihidropiridina y el anión dihidropiridínico.....	57
<b>Tabla 3.8</b>	Valores de $\alpha n$ y p calculados a pH 2, 4 y 6.....	61
<b>Tabla 3.9</b>	Potenciales de media onda y número de electrones.....	63
<b>Tabla 3.10</b>	Potenciales de media onda y número de electrones transferidos a pH 7.	73
<b>Tabla 3.11</b>	Valores de $\Delta E_p$ y número de electrones determinado.....	86
<b>Tabla 3.12</b>	Valores de E <sub>pc</sub> , k <sub>2</sub> y t ½.....	90
<b>Tabla 3.13</b>	Valores de k <sub>2</sub> y t ½ del anión radical nitro derivado de FDHP3.....	92
<b>Tabla 3.14</b>	Parámetros cinéticos y electroquímicos.....	96
<b>Tabla 3.15</b>	Potencial de reducción y actividad antiepimastigote.....	98
<b>Tabla 3.16</b>	Parámetros cinéticos y electroquímicos de la forma aniónica de los compuestos dihidropiridínicos.....	105
<b>Tabla 3.17</b>	Constantes cinéticas de la reacción de interacción entre los endo/xenobióticos y RNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	109

## Indice de esquemas

<b>Esquema 3.1</b>	Esquema de la ruta sintética de 1,4-dihidropiridinas.....	29
<b>Esquema 3.2</b>	Mecanismo de electro-oxidación de los compuestos <b>a-f</b> , en medio ácido (pH = 4).....	42
<b>Esquema 3.3</b>	Mecanismo de electro-oxidación propuesto para el compuesto <b>a</b> , en medio básico.....	46
<b>Esquema 3.4</b>	Proceso global de la reacción de oxidación de las dihidropiridinas en medio básico.....	50
<b>Esquema 3.5</b>	Mecanismo de electro-oxidación de los compuestos <b>c, d</b> y <b>e</b> a pH > 4.	52

**Resumen**

Esta tesis constituye una contribución al conocimiento electroquímico de derivados nitrofuranos y 1,4-dihidropiridínicos con miras a proporcionar un sustento químico para nuevas estrategias que ayuden al tratamiento de algunas parasitosis. Hemos sintetizado y caracterizado electroquímicamente seis compuestos de la serie 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridinas.

Hemos encontrado que en medio ácido la reacción de condensación de dos moles de enaminas con un mol de aldehído es una ruta sintética rápida y eficiente. La mayoría de los derivados dihidropiridínicos fueron obtenidos a temperatura ambiente. Los compuestos sintetizados fueron identificados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN), espectroscopía infrarroja (IR) y análisis elemental.

Análisis voltamperométrico y coulombimétrico fueron aplicados para elucidar los posibles mecanismos de oxidación electroquímica del fragmento dihidropiridínico en medio aprótico y prótico. En medio prótico, hemos evaluado la influencia del pH sobre el comportamiento electroquímico. Empleando las técnicas de voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría cíclica, voltamperometría de barrido lineal con electrodo de disco rotatorio y coulombimetría propusimos los mecanismos de electro-oxidación de los compuestos estudiados. Todos los compuestos, en medio prótico ( $\text{pH} < 4$ ) y medio aprótico siguieron un mecanismo de oxidación obedeciendo la secuencia EQEQ. Sin embargo, a  $\text{pH} > 4$ , las 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-dihidropiridinas fueron oxidadas siguiendo una secuencia EQEQ, mientras que los otros compuestos siguieron un mecanismo DISP 1.

Por otro lado, la reducción del grupo nitro presente en los tres compuestos de la serie 2,6-dimetil-4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-dihidropiridinas fue estudiada en medio prótico, mixto y aprótico. Los experimentos de polarografía de pulso diferencial, polarografía TAST y voltamperometría cíclica indicaron que el proceso de reducción es altamente dependiente del medio electrolítico. A pH básico en medio mixto y en medio aprótico, la señal de reducción del anión radical nitro fue aislada. Este hecho nos permitió estudiar la formación y estabilidad del anión radical nitro y su reactividad con las biomoléculas: glutatión, adenina y *N*-acetilcisteína.

**Abstract**

This Thesis constitutes a contribution to the electrochemical knowledge of the nitrofuran and 1,4-dihydropyridine derivatives in order to provide a chemical background to develop new strategies in the parasitic disease treatment. The synthesis and the corresponding We have electrochemical characterization of six compounds of the series 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridines is reported in the present Thesis.

We have found that in acidic media the condensation reaction of two molecules enamines and one molecule of aldehyde is a fast and efficient synthetic route. Most of dihydropyridine derivatives were obtained at room temperature. The synthesized compounds were identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR), infrared spectroscopy (IR) and elemental analysis.

Voltammetric and coulometric analysis were applied to elucidate the electrochemical oxidation mechanism of the dihydropyridine moiety in aprotic and protic media. In protic media, we have evaluated the pH-dependence on the electrochemical behavior. By using differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry, lineal sweep voltammetry with rotating disk electrode and coulometry techniques, the electro-oxidation mechanism of the studied compounds have been proposed. All the compounds, in protic media ( $\text{pH} < 4$ ) and aprotic media followed an oxidation mechanism obeying the ECEC sequence. However, at  $\text{pH} > 4$ , the 4-(5'-nitro-2'-furyl)- 1,4-dihydropyridine derivatives were oxidized following an ECEC sequence, while the others compounds followed a DISP 1 mechanism.

On the other hand, the electrochemical reduction of nitro group corresponding to the series 2,6-dimethyl-4-(5'-nitro-2'-furyl)- 1,4-dihydropyridine derivatives was studied in protic, mixed and aprotic media. Differential pulse polarography, TAST polarography and cyclic voltammetry results indicated that the reduction process is greatly dependent of the electrolytic media. Both in aprotic media and mixed media at basic pH, the reduction signal of the nitro radical anion was isolated. This fact permitted us to study on the formation and its stability of the corresponding nitro radical anion. Also, its reactivity with biomolecules of pharmacological interest such as glutathione, adenine and *N*-acetylcysteine was studied.

## **1. Introducción**

## 1.1. Antecedentes e investigación propuesta

Desde su descubrimiento las dihidropiridinas (DHPs) han sido objeto de múltiples investigaciones, como modelos del NAD(P)H para elucidar mecanismos de transferencia de hidrógeno y sobre todo por sus aplicaciones en medicina como antagonistas de canales de calcio. Se han desarrollado nuevas estrategias sintéticas, que han permitido realizar una gran variedad de modificaciones estructurales, enfocadas a obtener compuestos con mejores perfiles clínicos, con mayor actividad y selectividad farmacológicas.<sup>1-5</sup>

En la búsqueda de nuevas aplicaciones farmacológicas de este tipo de compuestos, Núñez-Vergara y colaboradores<sup>6,7</sup> han encontrado actividad citotóxica de derivados 4-nitrofenil-1,4-dihidropiridínicos sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Estos autores han determinado que el efecto tripanocida no está relacionado con alteraciones en la homeostasis del calcio, sino probablemente a la acción del grupo nitro presente en la molécula. La reducción metabólica de un grupo nitroaromático, puede generar distintos intermediarios capaces de inducir toxicidad. Existen evidencias experimentales que señalan al anión radical nitro como principal responsable del efecto tóxico. Aunque, eventualmente esto también podría ocurrir en el huésped, un eficiente mecanismo de defensa contra la acción nociva de especies radicalarias impide la citotoxicidad.

La electroquímica ha sido ampliamente utilizada como una herramienta en la elucidación de mecanismos de procesos redox en sistemas biológicos. El conocimiento de las propiedades electroquímicas es esencial para una mejor comprensión de la actividad biológica y de las propiedades de especies radicalarias libres que emergen de la conversión de esta clase de compuestos.

Se han descrito algunas correlaciones de afinidad electrónica con la actividad biológica. Las drogas que presentan mayor electroafinidad, potenciales de reducción menos negativos, son generalmente las más tóxicas y mutagénicas.<sup>8-10</sup>

Por otro lado, hay que tener en cuenta que las 4-nitrofenil-1,4-dihidropiridinas tienen un interés especial, pues ya han sido probadas en humanos y presentan un bajo perfil tóxico. Con todo esto, creemos que una modificación estructural que permita retener estas propiedades y generar únicamente cambios en su comportamiento redox, es una interesante propuesta de investigación. Desde el punto de vista electroquímico, la sustitución del fragmento nitrofenilo por un grupo nitrofurilo en la posición 4 del anillo dihidropiridínico, constituye una interesante modificación estructural, sobre todo, si esto puede afectar el comportamiento redox de la molécula. Wardman y colaboradores<sup>11</sup> han determinado que los potenciales de reducción medidos contra un electrodo normal de hidrógeno (ENH) a pH 7, en medio acuoso, del nitrofurano y del nitrobenzeno son -330 mV y -490 mV respectivamente. Este hecho indica, que se puede esperar una diferencia superior a 100 mV en los potenciales de reducción en la serie 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs con respecto a las 4-nitrofenil-1,4-DHPs.

Hay que destacar, que estos compuestos presentan dos centros electro activos, ambos de interés farmacológico: el grupo nitro reducible que ya hemos mencionado, y el anillo dihidropiridínico oxidable. Se ha determinado que la integridad de este anillo es esencial para la actividad antagonista de los canales de calcio.<sup>12,13</sup> La aromatización pone fin a su actividad farmacológica. Existen evidencias experimentales que señalan que también se forman especies radicalarias intermediarias en el proceso de oxidación de estos compuestos.<sup>14-16</sup> Esperábamos que las modificaciones estructurales que hemos planteado también generasen cambios en el proceso oxidativo de estas drogas.

Nuestro interés estuvo enfocado en el estudio de la reducción y oxidación electroquímica de tres compuestos de la serie 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs, con miras a establecer posibles mecanismos redox en distintos sistemas de solventes. Los antecedentes experimentales señalan que tanto la reducción como la oxidación de este tipo de compuestos son altamente dependientes del medio de trabajo.<sup>17-19</sup>

Así, en medio prático, por lo general, se observa una única señal correspondiente a la reacción de electro-reducción del grupo nitro, donde la transferencia de 4 electrones y 4 protones da lugar a la formación de la hidroxilamina, según la siguiente ecuación global:



Sin embargo, en medio aprótico y en algunos casos en medio mixto, la conversión nitro/hidroxilamina genera dos señales: la primera da cuenta de la reducción monoelectrónica del grupo nitro, generando un anión radical, y la segunda consiste en la reducción del anión radical formado hasta el derivado hidroxilamínico. Este mecanismo se presenta en las ecuaciones 1.2 y 1.3.



Se ha determinado que, generalmente, la transferencia del primer electrón es un proceso reversible, seguido de una reacción química irreversible que da cuenta del decaimiento natural del anión radical nitro.<sup>8,20,21</sup> Olmstead y colaboradores<sup>22,23</sup> han propuesto una metodología para determinar las constantes cinéticas de las reacciones químicas asociadas a la transferencia electrónica.

A través de la caracterización electroquímica en medio prótico, mixto y aprótico, esperábamos determinar las condiciones óptimas de generación del anión radical nitro, de tal manera de poder establecer la constante cinética de decaimiento del radical y su tiempo de vida media.

Finalmente, como lo habíamos mencionado, la capacidad de un organismo para evitar la acción letal de los intermediarios de la reducción del grupo nitro radica en su eficiente sistema de detoxificación. En este aspecto, muchos parásitos son deficientes para evitar daños en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El glutatión y otros compuestos que contienen grupos tioles participan activamente en los mecanismos de defensa contra el efecto dañino de radicales libres. La determinación de la interacción del anión radical nitro resulta un importante parámetro del efecto tóxico que pueden generar las drogas nitroaromáticas en los seres humanos y en los animales.

Núñez-Vergara y Squella<sup>24</sup> han establecido una metodología para cuantificar la interacción de endo/xenobióticos con el anión radical nitro. Desde el punto de vista de la estabilidad del anión radical nitro, hemos considerado pertinente determinar su reactividad con algunas moléculas de importancia biológica.

## 1.2. Hipótesis

“A partir de los antecedentes descritos, es posible esperar que los compuestos de la serie de las 4-(2'-nitro-5'-fúril)-1,4-dihidropiridinas sustituidas presenten propiedades redox diferentes a sus análogos estructurales nitrofenílicos”.

## 1.3. Objetivo General

“Contribuir al conocimiento de la electroquímica de derivados de nitrofuranos y 1,4-dihidropiridinas con miras a proporcionar sustento químico para nuevas estrategias que ayuden al tratamiento de algunas parasitosis”.

## 1.4. Objetivos Específicos

- 1.4.1. Sintetizar tres compuestos de la serie de las 2,6-dimetil-4-(5'-nitro-2'-fúril)-1,4-dihidropiridinas sustituidas. Establecer los mecanismos de óxido-reducción de los tres compuestos a través de técnicas electroquímicas, con énfasis sobre el efecto del medio de trabajo.
- 1.4.3. Generar el anión radical nitro a micro y macro escala, a fin de determinar su estabilidad y mecanismo de decaimiento.
- 1.4.4. Evaluar la reactividad *in vitro* del anión radical nitro con *N*-acetilcisteína, glutatión y adenina.

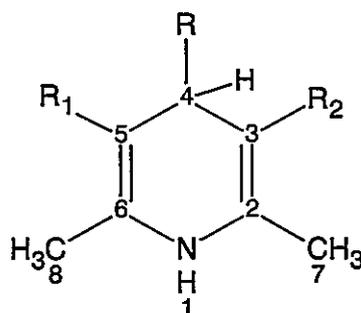
## 1.5. Estructura de la tesis

Esta tesis ha sido organizada en 4 capítulos. El primero consiste en la introducción, en la cual presentamos los antecedentes teóricos y experimentales con respecto a la síntesis y caracterización electroquímica de nitrocompuestos y dihidropiridinas, la hipótesis de trabajo, el objetivo general y los objetivos específicos. En el segundo capítulo presentamos los materiales y métodos empleados en el desarrollo de la tesis. En el tercer capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en la síntesis y en la caracterización electroquímica. Finalmente, el último capítulo se refiere a las conclusiones generales.

## **2. Materiales y Métodos**

## 2.1. Síntesis de 1,4-dihidropiridinas

**2.1.1. Compuestos:** las estructuras químicas de los seis compuestos sintetizados se presentan en la **figura 2.1**.



Compuestos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R
<b>a</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> 9 10	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H
<b>b</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub> 11
<b>c</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
<b>d</b>	-CN	-CN	
<b>e</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CN	
<b>f</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	

**Figura 2.1.** Estructuras químicas de los compuestos sintetizados

**2.1.2. Reactivos de partida:** los reactivos empleados en la síntesis de los compuestos **a-f** fueron: 3-aminocrotononitrilo (96 %, Aldrich), 3-aminocrotonato de etilo (99 %, Aldrich), 5-nitro-2-furaldehído (> 99 %, Merck), 3-nitrobenzaldehído (> 98 %, Merck), acetaldehído (99

%, Merck), formaldehído (37 %, Merck), ácido acético glacial (100 %, Merck), ácido clorhídrico (32 %, Merck).

### 2.1.3. Determinación estructural.

Todos los compuestos fueron caracterizados por espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, FT-IR y análisis elemental. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN se midieron en un espectrómetro Bruker WM-300, utilizando como disolventes dimetilsulfóxido- $d_6$  (compuesto **d**) y cloroformo- $d$ . Los espectros infrarrojos fueron medidos en un espectrofotómetro FT-IR Paragon Spectrometer 100PC en discos de bromuro de potasio. El análisis elemental de C, N, H se realizó en un microanalizador elemental Perkin Elmer 240 B.

### 2.1.4. Procedimiento

Los compuestos **a**, **b**, **c** y **f** fueron sintetizados siguiendo el siguiente procedimiento general: 3-aminocrotonato de etilo y el aldehído correspondiente fueron disueltos en ácido acético glacial (30 ml). A la disolución resultante le fue adicionada agua hasta observar la formación de un precipitado. El sólido crudo fue filtrado y lavado con éter etílico. Los compuestos fueron recristalizados dos veces en etanol.

#### 2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (6a)

Preparado a partir de 3-aminocrotonato de etilo (2,6 ml, 20 mM) y formaldehído (0,8 ml, 10 mM). El producto purificado pesó 0.455 g (18 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3350,3 (NH); 1693,1 (C=O); 1651,6 (C=C); 1212,0 (CO-O); 1116,5 (CO-O)

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 1,29 (t, 6H,  $J = 7,10$ , H-10); 2,19 (s, 6 H, H-7 y H-8); 4,17 (q, 4H,  $J = 7,10$ , H-9); 3,27 (s, 2H, H-4); 5,17 (brs, 1H, H-1).

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 168,0 (C2); 144,7 (C2); 99,6 (C2); 59,7 (C2); 24,8; 19,2 (C2); 14,5 (C2).

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ : C, 61,64; H, 5,53; N, 7,56. Experimental: C, 61,40; H, 5,55; N, 7,59.



**2,4,6-trimetil-3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (6b)**

Preparado a partir de 3-aminocrotonato de etilo (2,6 ml, 20 mM) y acetaldehído (0,6 ml, 10 mM). El producto purificado pesó 1.01 g (38 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3345,3 (NH); 1697,1 (C=O); 1641,9 (C=C); 1215,0 (CO-O); 1134,2 (CO-O).

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,97 (d, 3H,  $J = 6,4$ , H-11); 1,30 (dd, 6H,  $J = 7,0$ ,  $J = 7,0$ , H-10); 2,27 (s, 6 H, H-7 y H-8); 4,16 (dq, 2H,  $J = 11$ ,  $J = 7,0$ , H-9); 4,22 (dq, 2H,  $J = 11$ ,  $J = 7,0$ ); 3,83 (q, 1H,  $J = 6,4$ , H-9); 5,57 (brs, 1H, H-1).

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 167,9 (C2); 144,2 (C2); 104,7 (C2); 59,6 (C2); 28,5; 22,3; 19,6 (C2); 14,5 (C2).

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ : C, 62,90; H, 7,92; N, 5,24, Experimental: C, 62,97; H, 7,91; N, 5,26.

**2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(5'-nitro-2'-fural)-1,4-dihidropiridina (6c)**

Preparado a partir de 3-aminocrotonato de etilo (1,3 ml, 10 mM) y 5-nitro-2-furaldehído (0.705 g, 5 mM). El producto purificado pesó 1.09 g (60 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3346,7 (N-H); 1704,3 (C=O); 1656,0 (C=C); 1517 (C=C) ar; 1487,9 ( $\text{NO}_2$ ); 1400 (C=C) ar; 1355,0 ( $\text{NO}_2$ ); 1211,9 (CO-O); 1114,4(CO-O).

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 1,28 (dd, 6H,  $J = 7,1$ ,  $J = 7,1$ , H-10); 2,36 (s, 6 H, H-7 y H-8); 4,15 (dq, 2H,  $J = 10,9$ ,  $J = 7,1$ , H-9); 4,21 (dq, 2H,  $J = 10,9$ ,  $J = 7,1$ , H-9); 5,27 (s, 1H, H-4); 6,19 (brs, 1H, H-1); 6,26 (d, 1H,  $J = 3,4$ , H-3'); 7,21 (d, 1H,  $J = 3,4$ , H-4').

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 166,8 (C2); 162,7 (C2); 146,4 (C2); 113,2; 108,9; 99,0 (C2); 60,2 (C2); 34,6; 19,6 (C2); 14,3 (C2).

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ : C, 56,04; H, 5,53; N, 7,69. Experimental: C, 55,85; H, 5,54; N, 7,72.

**2,6-dimetil-3,5-diciano-4-(5'-nitro-2'-fural)-1,4-dihidropiridina (6d)**

3-aminocrotononitrilo (1,54 g, 18 mM) y 5-nitro-2-furaldehído (1.27 g, 9 mM) fueron disueltos en ácido acético glacial (30 ml), observándose inmediatamente la formación de un precipitado amarillo-anaranjado. La mezcla de reacción fue dejada en reposo hasta producirse una completa precipitación. Luego lentamente fueron adicionadas gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado hasta disolución del precipitado. A la disolución resultante le fue adicionada agua caliente, lo cual permitió la formación de un segundo precipitado correspondiente a la dihidropiridina. El cual fue filtrado y lavado con éter etílico. El residuo fue extraído con cloroformo y lavado con agua varias veces. Después de extraer el disolvente, el producto fue recristalizado en etanol. El producto purificado pesó 1.04 g (43 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3369,2 (NH); 2205,9 (C=N); 1665,8 (C=C); 1536,3 (C=C) ar; 1505,1 ( $\text{NO}_2$ ); 1393,1 (C=C) ar; 1358,8 ( $\text{NO}_2$ ).

Espectro  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) ppm: 2,07 (s, 6 H, H-7 y H-8); 4,92 (s, 1H, H-4); 9,81 (brs, 1H, H-1); 6,82 (d, 1H, J= 3,8, H-3'); 7,70(d, 1H, J=3,8, H-4').

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) ppm: 159,7 (C2); 158,0 (2); 121,8 (C2); 114,9; 111,9; 73,8 (C2); 33,9; 20,8 (C2).

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$ : C, 57,78; H, 3,73; N, 20,73. Experimental: C, 57,75; H, 3,73; N, 20,65.

**2,6-dimetil-3-etoxicarbonil-5-ciano-4-(5'-nitro-2'-fural)-1,4-dihidropiridina (6e)**

3-aminocrotonato de etilo (0.7 ml, 5 mM), A, 3-aminocrotononitrilo (0,43 g, 5 mM), B, and 5-nitro-2-furaldehído (0.71 g, 5 mM), C, fueron disueltos separadamente en ácido acético glacial (10 ml). Las disoluciones A y B con una vigorosa agitación fueron lentamente adicionadas a la disolución C. A la mezcla previamente calentada (aprox. 15 minutos) le fue adicionada agua hasta formación de un precipitado amarillo pálido. Después de filtrado y lavado con éter etílico, el producto crudo fue purificado mediante una sucesiva separación cromatográfica empleando una columna de sílica gel. Los sistemas de disolventes empleados fueron (acetato de etilo/éter de petróleo, en una proporción 1:3) y diclorometano. El producto purificado pesó 1.10 g (70 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3317,9 (NH); 2199,4 (C=N); 1664,3 (C=O); 1638,5 (C=C); 1527,1 (C=C) ar; 1493,1 ( $\text{NO}_2$ ); 1383,0 (C=C) ar; 1355,5 ( $\text{NO}_2$ ); 1257,0 (CO-O); 1115,7 (CO-O).

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm:  $\delta$  1,29 (dd, 3H,  $J = 7,1$ ,  $J = 7,2$ , H-10); 2,18 (s, 3 H, H-8); 2,38 (s, 3 H, H-7); 4,12 (dq, 1H,  $J_3 = 10,9$ ,  $J = 7,1$ , H-9); 4,16 (dq, 1H,  $J = 10,9$ ,  $J = 7,2$ , H-9); 4,90 (s, 1H, H-4); 6,04 (brs, 1H, H-1); 6,38 (d, 1H,  $J = 3,7$ , H-3'); 7,24 (d, 1H,  $J = 3,7$ , H-4').

Espectro  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 166,2; 160,0 (C2); 147,6; 146,3; 118,6; 113,0; 109,5; 97,6; 81,8; 60,5; 35,9; 19,7; 18,5; 14,2.

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$ : C, 56,78; H, 4,76; N, 13,2. Experimental: C, 56,56; H, 4,77; N, 13,19.

### **2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(3'-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina (6f)**

Preparado a partir de 3-aminocrotonato de etilo (1,3 ml, 10 mM) y 3-nitrobenzaldehído (0,76 g, 5 mM). El producto purificado pesó 1.49g (80 %).

Espectro IR (KBr)  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3344,9 (NH); 1704,8 (C=O); 1645,5 (C=C); 1524,7 (C=C) ar; 1487,9 ( $\text{NO}_2$ ); 1370,4 (C=C) ar; 1347,6 ( $\text{NO}_2$ ); 1212,9 (CO-O); 1118,8 (CO-O),

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 1,29 (dd, 6H,  $J = 7,1$ ,  $J = 7,2$ , H-10); 2,37 (s, 6 H, H-7 y H-8); 4,1 (dq, 2H,  $J = 10,8$ ,  $J = 7,1$ , H-9); 4,11 (dq, 2H,  $J = 10,8$ ,  $J = 7,2$ , H-9); 5,09 (s, 1H, H-4); 5,74 (brs, 1H, H-1); 7,37 (dd, 1 H,  $J = 8,2$ ,  $J = 7,7$ , H-5'); 7,64 (ddd, 1H,  $J = 1,2$ ,  $J = 1,8$ ,  $J = 7,7$ , H-6'); 8,00 (ddd, 1 H,  $J = 1,2$ ,  $J = 2,3$ ,  $J = 8,2$ , H-4'); 8,13 (dd, 1 H,  $J = 1,8$ ,  $J = 2,3$ , H-2').

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 167,1 (C2); 149,9; 148,1; 144,6 (2C); 134,5; 128,6; 123,1; 121,4; 103,4 (C2); 60,0 (C2); 40,0; 19,7(C2); 14,2 (C2).

Análisis elemental teórico para  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ : C, 60,95; H, 5,92; N, 7,48. Experimental: C, 61,01; H, 5,94; N, 7,51.

## 2.2. Oxidación electroquímica de DHPs

**2.2.1. Compuestos:** hemos estudiado la electro-oxidación de los seis compuestos dihidropiridínicos presentados en la **figura 2.1**.

### 2.2.2. Medio electrolítico:

El medio prótico consistió preferentemente en una disolución etanol: buffer Britton Robinson 0,1 M en una relación 40:60. KCl 0,3 M fue empleado como electrolito soporte.

Para el medio aprótico fue utilizado *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HFPTBA) 0,1 M como electrolito soporte.

Se emplearon concentraciones entre 0,1 mM – 1 mM para las disoluciones de trabajo.

### 2.2.3. Análisis voltamperométrico:

Las técnicas voltamperométricas empleadas fueron: voltamperometría de pulso diferencial (VPD), voltamperometría cíclica (VC), y voltamperometría de barrido lineal. Para los experimentos por VPD y VC un electrodo de carbono vítreo fue empleado como electrodo de trabajo. Los experimentos por voltamperometría de barrido lineal se llevaron a cabo con un electrodo de disco rotatorio de carbono vítreo. Un alambre de platino fue usado como electrodo auxiliar y todos los potenciales fueron medidos contra un electrodo de Ag/AgCl saturado en KCl. Los voltamperogramas fueron registrados en un analizador electroquímico BAS CV50 y BAS 100B.

### 2.2.4. Análisis coulombimétrico:

Para el medio prótico las disoluciones fueron electrolizadas empleando una malla de carbono vítreo, en tanto, que una malla de platino fue empleada como electrodo de trabajo en medio aprótico. Un equipo BAS CV50 fue empleado para electrolizar las disoluciones.

## 2.3. Electro-reducción de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs

**2.3.1. Compuestos:** para facilitar la nominación de los compuestos en la exposición de los resultados fueron asignados como FDHP1, FDHP2 y FDHP3. (Figura 2.2)

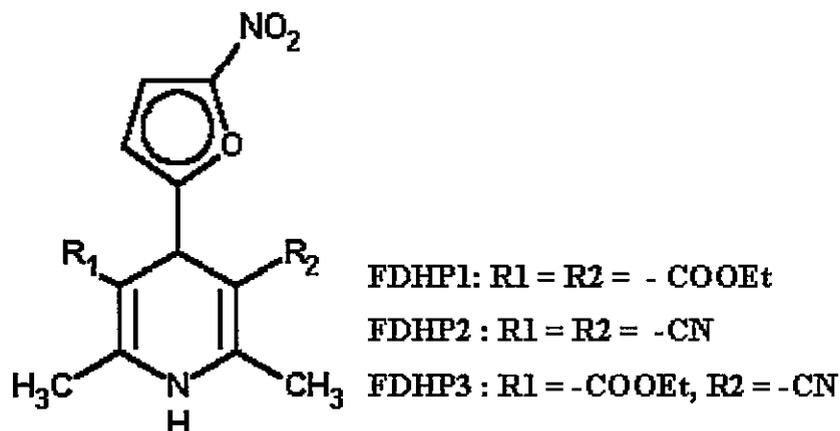


Figura 2.2. Estructuras químicas de los compuestos estudiados.

### 2.3.2. Medio electrolítico:

El medio prótico consistió en una disolución de etanol: buffer Britton Robinson 0,1 M (30:70). KCl 0,3 M fue empleado como electrolito soporte.

Para el medio aprótico fue utilizado *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente y perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) 0,1 M como electrolito soporte.

Basados en estudios preliminares realizados en el laboratorio de bioelectroquímica, sobre el medio mixto óptimo para el estudio electroquímico, seleccionamos la siguiente composición: DMF/ buffer citrato 0,015 M: 60/ 40. 0,3 M de KCl y 0,1 M de PTBA fueron empleados como electrolitos soportes.

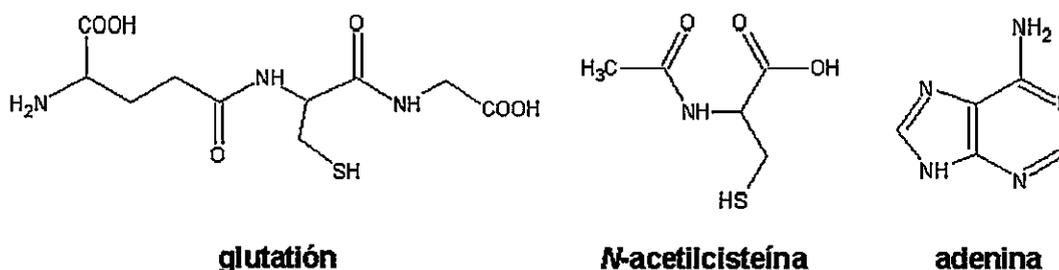
Se emplearon concentraciones entre 0,1 mM – 1 mM para las disoluciones de trabajo.

### 2.3.3. Técnicas empleadas:

Las técnicas electroquímicas empleadas fueron: polarografía de pulso diferencial (PPD), voltamperometría cíclica (VC), polarografía TAST (PT) y coulombimetría. Para los experimentos por PPD y PT un electrodo de gota de mercurio fue empleado como electrodo de trabajo. Los experimentos por VC se llevaron a cabo con un electrodo de gota colgante de mercurio. Las disoluciones fueron electrolizadas empleando una poza de mercurio como electrodo de trabajo para el análisis coulombimétrico. Un alambre de platino fue usado como electrodo auxiliar. En medio prótico, todos los potenciales fueron medidos contra un electrodo de Ag/AgCl saturado en KCl. Sin embargo, debido a la formación de perclorato de potasio,  $\text{KClO}_4$ , producto de la reacción de KCl con PTBA en medio aprótico fue empleado Ag/AgCl saturado en NaCl. Las mediciones fueron realizadas en un analizador electroquímico BAS CV50.

## 2.4. Estudio de estabilidad e interacción del anión radical nitro

**2.4.1. Compuestos:** los endo/xenobióticos empleados en el estudio de la interacción del anión radical nitro fueron: glutatión reducido (> 99 %, Merck), adenina (= 98 %, Merck) y *N*-acetilcisteína (> 99 %, SIGMA) (Figura 2.3). Las estructuras químicas de FDHP1, FDHP2 y FDHP3 fueron presentadas en la sección 2.3.1.



**Figura 2.3.** Estructuras químicas de los endo/xenobióticos

### 2.4.2. Medio electrolítico:

El medio mixto consistió de un sistema de disolventes constituido por DMF: buffer de citrato 0,015 M, en una relación 60:40. Como electrolitos soportes fueron empleados 0,3 M de KCl y 0,1 M de PTBA.

Para el medio aprótico fue utilizado *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente y perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) 0,1 M como electrolito soporte.

Se emplearon concentraciones entre 1 mM – 5 mM para las disoluciones de trabajo.

### 2.4.3 Técnicas empleadas:

Las técnicas electroquímicas empleadas fueron: voltamperometría cíclica (VC) y coulombimetría. Un analizador electroquímico BAS CV 50 fue empleado. Los experimentos por VC se llevaron a cabo con un electrodo de gota colgante de mercurio. Las disoluciones

fueron electrolizadas empleando una poza de mercurio como electrodo de trabajo para el análisis coulombimétrico. Un alambre de platino fue usado como electrodo auxiliar y todos los potenciales fueron medidos contra un electrodo de Ag/AgCl saturado en NaCl.

#### 2.4.4. Determinación del tipo de reacción electródica

La voltamperometría cíclica puede ser considerada como una herramienta muy útil en el estudio de mecanismos de procesos electródicos, debido a que no solo proporciona información termodinámica del proceso redox, sino que, además, permite la determinación de parámetros cinéticos de reacciones de transferencias electrónicas heterogéneas y de reacciones químicas acopladas.<sup>25</sup>

Los parámetros más interesantes, desde el punto de vista mecanicista, de esta técnica son la relación de intensidades de corriente de oxidación y reducción ( $i_{pa}/i_{pc}$ ) y la separación de los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ). Este último puede ser obtenido mediante la siguiente expresión:

$$\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Esta diferencia entre los potenciales de reducción y de oxidación, es un criterio habitualmente empleado para identificar una reacción nerstiana o reversible.  $\Delta E_p \approx 59 \text{ mV}$  para una transferencia monoelectrónica reversible.<sup>26</sup>

Los parámetros  $i_{pa}$  = corriente anódica,  $i_{pc}$  = corriente catódica,  $E_{pa}$  = potencial de oxidación,  $E_{pc}$  = potencial de reducción y  $E_{ps}$  = potencial de inversión o switching están representados en la **figura 2.4**.

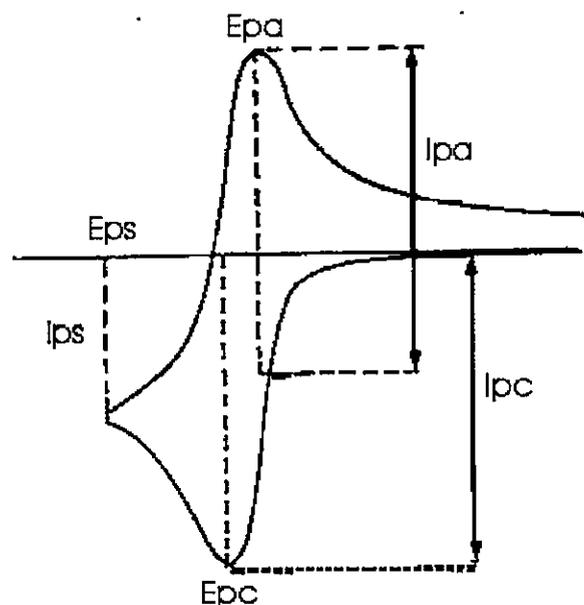


Figura 2.4. Principales parámetros en un voltamperograma cíclico.<sup>27</sup>

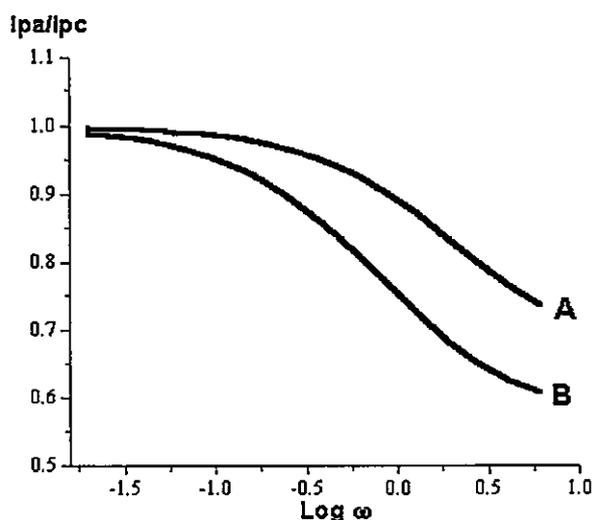
Con respecto a la determinación de la relación  $i_{pa}/i_{pc}$ , es importante señalar que, cuando el grado de reversibilidad de un proceso de electrodo implica que ambos picos son registrados en la misma región de potencial, surge una mezcla de corrientes. Consecuentemente, para una correcta evaluación de la corriente de oxidación, cuando el barrido se inicia en el sentido negativo, es necesario establecer una línea base para sustraer la contribución de la corriente de reducción.<sup>27</sup> Aunque, esta contribución pueda ser determinada experimentalmente, el empleo de una simple ecuación operativa (Ec. 2.2), propuesta por Nicholson, facilita el cálculo de la relación  $i_{pa}/i_{pc}$ .<sup>28</sup> El superíndice "0" indica que los valores son tomados considerando como base la línea correspondiente a una intensidad cero.

$$i_{pa}/i_{pc} = (i_{pa}/i_{pc})^0 + 0,485(i_{ps}/i_{pc})^0 + 0,086 \quad \text{Ec. 2.2}$$

Nicholson y Shain, a partir de complejas ecuaciones diferenciales que relacionan la corriente con velocidades de difusión, reacción química acoplada y barrido de potencial, han establecido criterios de diagnóstico de una amplia variedad de mecanismos de procesos electroquímicos.<sup>29</sup> Uno de los parámetros que estos autores consideran es la relación entre la corriente de oxidación y de reducción, como una función de la velocidad de barrido. Los cambios en la razón de corrientes pueden proporcionar importante información acerca de la naturaleza del proceso que ocurre en el electrodo.

### 2.4.5. Metodología aplicada a la caracterización cinética del anión radical nitro

Si una reacción química homogénea está acoplada a una reacción de transferencia electrónica (proceso EQ), la voltamperometría cíclica proporciona métodos muy útiles para la determinación de parámetros cinéticos. Por lo general, la reacción que da cuenta del decaimiento natural del anión radical nitro sigue una cinética de segundo orden, como lo avala la amplia bibliografía existente al respecto.<sup>20,21,30</sup> Una constante cinética de segundo orden puede ser obtenida empleando la curva teórica de trabajo propuesta por Olmstead y colaboradores, la cual relaciona la razón de corrientes  $i_p/i_{pc}$  con el parámetro cinético  $\log \omega$ .<sup>22,23</sup> (Figura 2.5)



**Figura 2.5.** Curva teórica de trabajo para un mecanismo EQi de segundo orden. A: Dismutación, B: Dimerización

En este método los valores de  $i_p/i_{pc}$  determinados a diferentes velocidades de barrido son incorporados en la curva de trabajo para determinar el parámetro cinético " $\omega$ ", el cual según el decaimiento del radical se lleve a cabo en un proceso de dismutación (Ec. 2.3) o de dimerización (Ec. 2.4), dependiendo del medio electrolítico, se define como:

$$\log \omega = \log (k_2 \cdot C_0 \cdot \tau) + 0,047 \text{ (at -4)} \quad \text{Ec. 2.3}$$

$$\log \omega = \log (k_2 \cdot C_0 \cdot \tau) + 0,034 \text{ (at -4)} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde  $k_2$  es la constante de velocidad de segundo orden y  $\tau$  es la constante de tiempo y está definida por la siguiente expresión:

$$\tau = (E_{1/2} - E_{ps}) / v \quad \text{Ec. 2.5}$$

$E_{1/2}$ , en esta expresión, es el potencial de semionda calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2 \quad \text{Ec. 2.6.}$$

y " $v$ " es la velocidad de barrido de potencial.  $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$  y  $E_{ps}$ , como ya lo hemos manifestado, son los potenciales de oxidación, reducción y de inversión. Y por último,  $at$  tiene el siguiente significado:

$$at = nF/RT (E_{ps} - E_{1/2}) \quad \text{Ec. 2.7}$$

Si ajustamos los valores de  $E_{ps}$  para que el valor de  $at$  sea igual a 4, las ecuaciones 2.3 y 2.4 se reducen a la primera expresión. Un gráfico de  $\omega$  versus  $\tau$ , resulta en una relación lineal, cuya pendiente nos permitirá calcular la constante cinética de segundo orden,  $k_2$ , a partir de la siguiente ecuación:

$$\omega = k_2 \cdot C_0 \cdot \tau \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde  $k_2 = 2 k_{obs}$  para una reacción del tipo:  $2 A \longrightarrow B + C$  o bien  $2 A \longrightarrow D$ , cuya expresión cinética se representa en la siguiente ecuación:

$$- d[A] / dt = 2 k_{obs} [A]^2 \quad \text{Ec. 2.9}$$

A partir del valor de  $k_2$ , se puede determinar la vida media del anión radical nitro, empleando la fórmula descrita para procesos de segundo orden:

$$t^{1/2} = 1/(k_2 \cdot C_0) \quad \text{Ec. 2.10}$$

Con respecto a la estimación cuantitativa de la interacción del anión radical nitro con los endo/xenobióticos (glutación, adenina y *N*-acetilcisteína), Squella y colaboradores han propuesto una metodología para determinar la constante de interacción,  $k_i$ .<sup>24</sup> El procedimiento consiste en considerar que en presencia de un endo o xenobiótico, el decaimiento natural del anión radical nitro compite con la reacción de transferencia electrónica homogénea, representado en la ecuación 2.11.



por lo cual, la expresión de la constante de velocidad de interacción consta de dos términos, el primero que da cuenta del decaimiento natural de la especie radicalaria  $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ , tal como esta expresado en la Ec. 2.9, y el segundo corresponde a la interacción propiamente tal. Como se puede observar en la siguiente ecuación:

$$-d[\text{RNO}_2^{\cdot-}]/dt = 2 k_{\text{obs}}[\text{RNO}_2^{\cdot-}]^2 + k_i [\text{end o xen}][\text{RNO}_2^{\cdot-}] \quad \text{Ec. 2.12}$$

Una constante aparente de segundo orden,  $k_{\text{app}}$ , puede ser definida por la siguiente expresión:

$$k_{\text{app}} = 2 k_{\text{obs}} + k_i [\text{end o xen}]/[\text{RNO}_2^{\cdot-}] \quad \text{Ec. 2.13}$$

En ausencia del endobiótico o xenobiótico,  $k_{\text{app}} = 2 k_{\text{obs}}$ . Si la ecuación anterior es dividida por  $2 k_{\text{obs}}$ , se obtiene la siguiente expresión final:

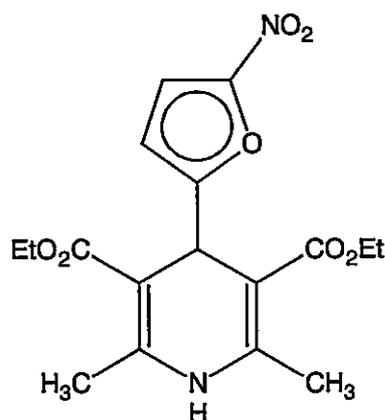
$$k_{app} / 2 k_{obs} = 1 + k_i [\text{end o xen}] / 2 k_{obs} [\text{RNO}_2^-] \quad \text{Ec. 2.14}$$

Si la concentración del anión radical nitro se mantiene constante, el valor de  $k_i$  se puede obtener de la pendiente del gráfico de  $k_{app}/2k_{obs}$  *versus* la concentración del endo/xenobiótico.

### **3. Resultados y Discusión**

### 3.1. Síntesis de 1,4-dihidropiridinas

. Las primeras dihidropiridinas fueron sintetizadas por Hantzsch en 1882.<sup>31</sup> Actualmente, se conocen muchas variaciones de la síntesis original.<sup>4</sup> La síntesis de 2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(5'-nitro-2'-fural)-1,4-dihidropiridina (**Figura 3.1**) se llevo a cabo mediante la clásica reacción de Hantzsch. Sin embargo, el calentamiento a reflujo por varias horas de 5-nitro-2-furaldehído, acetoacetato de etilo e hidróxido de amonio en etanol produjo el derivado dihidropiridínico con un rendimiento no mayor al 20 %.

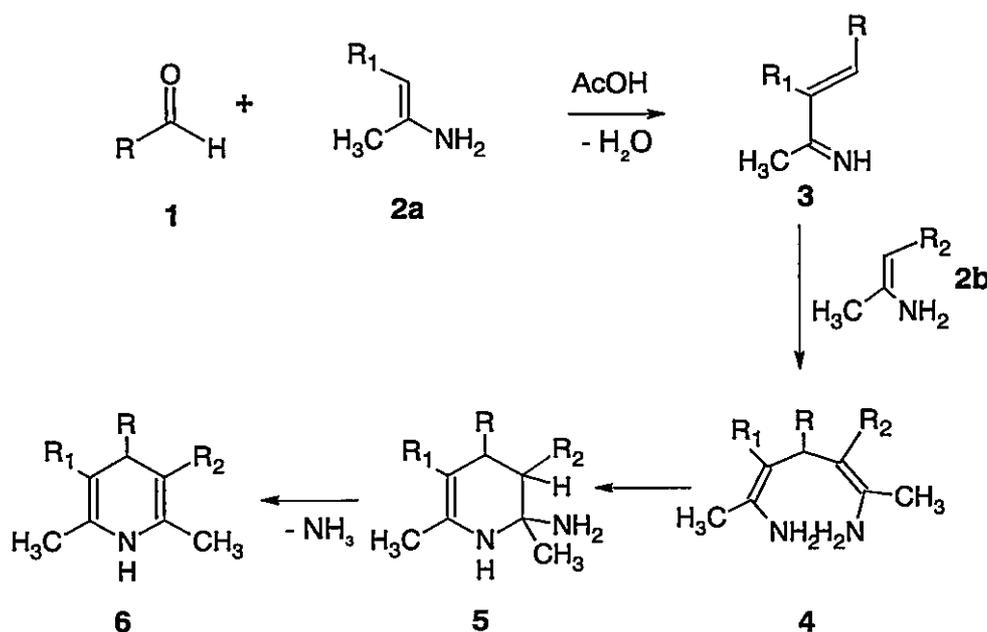


**Figura 3.1.** Estructura química de 2,6-dimetil-3,5-dietoxicarbonil-4-(5'-nitro-2'-fural)-1,4-dihidropiridina

Debido al interés farmacológico y químico de este tipo de compuestos se han descrito nuevas alternativas sintéticas, de las cuales hemos probado la síntesis por microondas. Obtuvimos el derivado dihidropiridínico como producto de la reacción de acetoacetato de etilo, 5-nitro-2-furaldehído y urea. Los reactivos fueron mezclados con silica gel y la mezcla de reacción fue sometida a irradiación de microondas por aproximadamente 1 minuto. Debemos destacar, que aunque abandonamos la síntesis por microondas, la aplicación de este método sintético presenta algunas ventajas con respecto a la síntesis convencional, entre ellos: algunas reacciones pueden llevarse a cabo en sistemas libres de disolventes, también se han observado en ciertas reacciones una mayor selectividad y un aumento en la velocidad de la reacción.

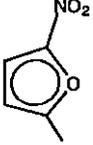
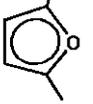
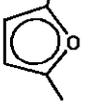
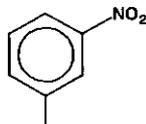
Sin embargo, hemos encontrado que los compuestos propuestos eran asequibles mediante la reacción de un mol de aldehído y dos moles de enamina en ácido acético glacial (**Esquema**

3.1). La reacción demostró ser bastante eficiente, ya que a temperatura ambiente o con leve calentamiento encontramos mejores rendimientos que los métodos anteriormente descritos.



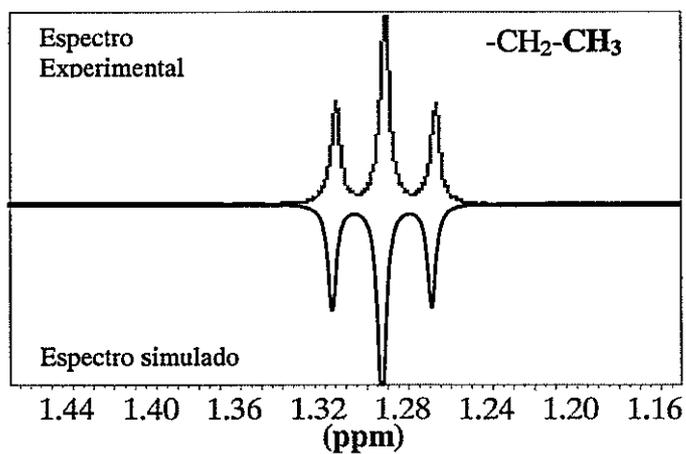
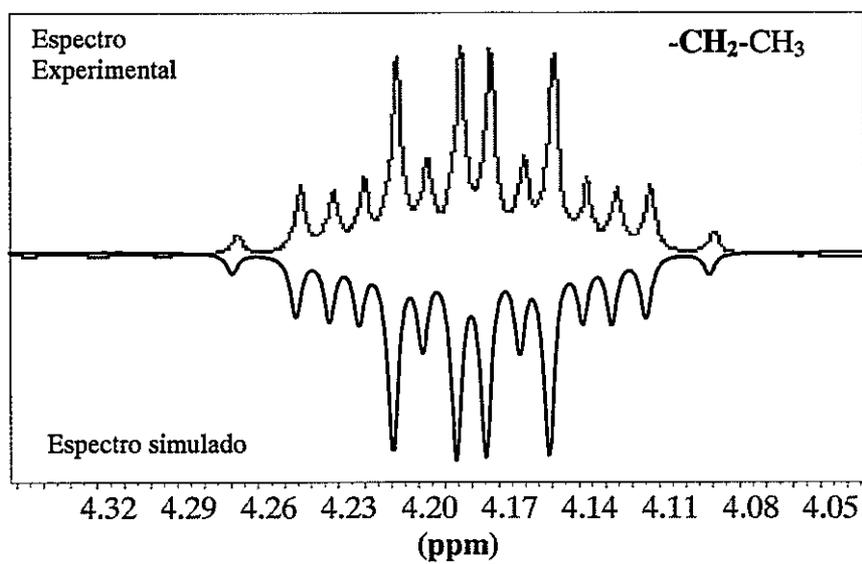
Esquema 3.1.. Esquema de la ruta sintética de 1,4-dihidropiridinas.

Tabla 3.1. Los sustituyentes R, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de los compuestos sintetizados.

Compuestos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R
a	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H
b	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
c	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
d	-CN	-CN	
e	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CN	
f	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	

Es importante destacar que en la síntesis del compuesto **6e** a diferencia de los otros compuestos, el intermediario **4e** de la reacción fue aislado e identificado como 2,4-bis(1-aminoetilideno)-3-(5'-nitro-2'-furyl)-2,4-pentanodinitrilo. Existen dos maneras de facilitar el cierre del anillo dihidropiridínico: a través de un ligero calentamiento de la mezcla de reacción o mediante la adición de gotas de HCl concentrado. En ambos casos el rendimiento de la reacción ha sido el mismo.

Por otro lado, hemos observado que la posición C-4 sobre el anillo de la dihidropiridina constituye un centro pseudo-proquiral en los compuestos **6b**, **6c** y **6f** y un centro quiral en el compuesto **6e**. Esta característica estructural generó una señal múltiple en los espectros  $^1\text{H}$  RMN correspondiente a los protones metilénicos de los grupos etoxicarbonilo presente en las posiciones C-3 y/o C-5 de estos compuestos. Los grupos proquirales, incluyendo protones, son intrínsecamente no equivalentes por el criterio de desplazamiento químico cuando no hay un plano de simetría *s* en las moléculas, es decir, son diastereotópicos.<sup>32-34</sup> La presencia de un acoplamiento *geminal* en los protones metilénicos fue confirmada mediante la simulación de los espectros experimentales (Figura 3.2). El programa Win-Daisy (de Bruker) fue empleado para llevar a cabo el proceso de simulación.



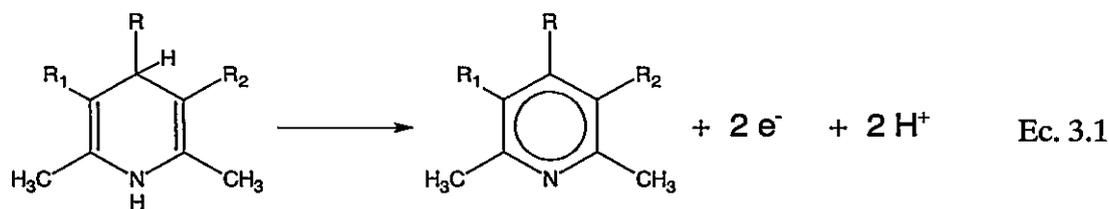
**Figura 3.2.** Simulación de una fracción del espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **6c**.

## 3.2. Oxidación electroquímica de DHPs

Como hemos mencionado en la introducción, la aromatización del anillo dihidropiridínico pone fin a la actividad antagonista de canales de calcio de compuestos del tipo nifedipino (2,6-dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2'-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina). La conversión dihidropiridina/piridina es catalizada por enzimas citocromo P-450 en una reacción que procede en varias etapas de transferencia electrónica.<sup>35,36</sup> Estudios electroquímicos se han llevado a cabo para investigar el proceso de biotransformación de estas drogas.<sup>37,38</sup> En esta línea, hemos estudiado la electro-oxidación de los seis compuestos dihidropiridínicos sintetizados (**Figura 2.1**). Los medios prótico y aprótico fueron empleados para evaluar el comportamiento electroquímico de las dihidropiridinas. Los experimentos llevados a cabo mediante voltamperometría de pulso diferencial, cíclica y de barrido lineal, así como el análisis coulombimétrico nos proporcionaron importantes evidencias que permitieron postular los posibles mecanismos de electro-oxidación de estos compuestos y la influencia de los sustituyentes en este proceso. A continuación exponemos detalladamente los resultados obtenidos.

### 3.2.1. Medio Prótico

La oxidación electroquímica de los compuestos **a-f** fue evaluada mediante voltamperometría de pulso diferencial. En todo el intervalo de pH estudiado (2-11), los voltamperogramas de pulso diferencial registrados presentaron un solo pico de oxidación correspondiente a la formación del derivado piridínico, según la siguiente reacción global:

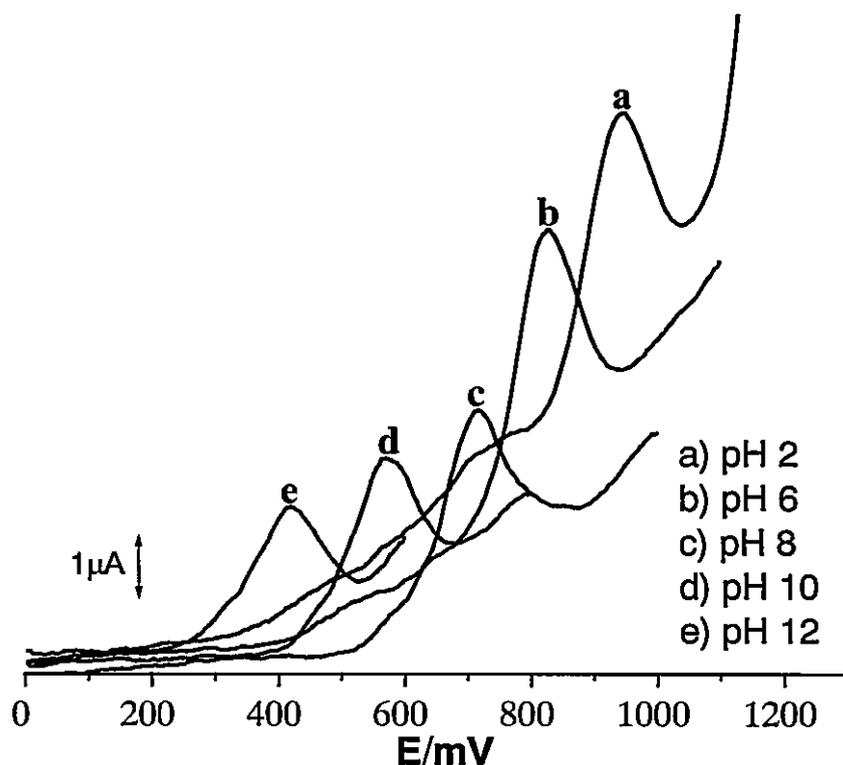


Hemos estudiado la influencia del pH sobre la respuesta electroquímica. En todos los casos, a  $\text{pH} > 4$ , el aumento del pH generó un desplazamiento de la señal hacia potenciales menos positivos. (**Figura 3.3**) En una reacción de oxidación, dependiendo del número de protones ( $p$ ) y electrones ( $e$ ) involucrados en la etapa determinante de la reacción, el potencial ( $E_p$ ) se mueve hacia valores menos positivos con el incremento del pH, a una velocidad constante por unidad de pH. (Ec. 3.2 y 3.3)

$$\text{Procesos reversibles: } E_p = E_{\text{constante}} - (pRT/nF)\text{pH} \quad \text{Ec. 3.2}$$

$$\text{Procesos irreversibles. } E_p = E_{\text{constante}} - (pRT/\alpha nF)\text{pH} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia de carga,  $F$  la constante de Faraday (96485 C),  $T$  la temperatura (298 K) y  $R$  la constante de gases ( $8,31441 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ).



**Figura 3.3.** Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto c a diferentes valores de pH.

Los potenciales de pico de los compuestos **c**, **d** y **e** reflejaron el efecto de los sustituyentes C-3 y C-5 en estas moléculas. (Tabla 3.2.) A pH ácido (= 4), una mayor electroafinidad del grupo nitrilo (-C=N) con respecto al etoxicarbonilo (-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) generó potenciales de oxidación más positivos, el orden de reactividad encontrado fue: **c** > **e** > **d**; sin embargo, a pH básico (> 9) este orden es invertido, lo cual podría deberse a un cambio en el mecanismo de oxidación.

Tabla 3.2. Potenciales de pico de los compuestos **c**, **d** y **e**

Compuestos	C-3	C-5	pH 3 (Ep/mV)	pH 10 (Ep/mV)
<b>c</b>	-CO <sub>2</sub> Et	-CO <sub>2</sub> Et	932	564
<b>d</b>	-CN	-CN	988	468
<b>e</b>	-CN	-CO <sub>2</sub> Et	956	520

Sustituyentes aceptores de electrones, capaces de presentar conjugación por efecto de resonancia tales como -COR, -CO<sub>2</sub>R, -CN, -NO<sub>2</sub>, en las posiciones C-3 y C-5, confieren mayor estabilidad al anillo dihidropiridínico, debido a una transferencia de densidad electrónica hacia estos sustituyentes. La energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) disminuye, y consecuentemente hay una disminución en la reactividad y la basicidad de estos compuestos. Estas aseveraciones tendrán un mayor alcance conforme sigamos analizando los datos experimentales obtenidos.

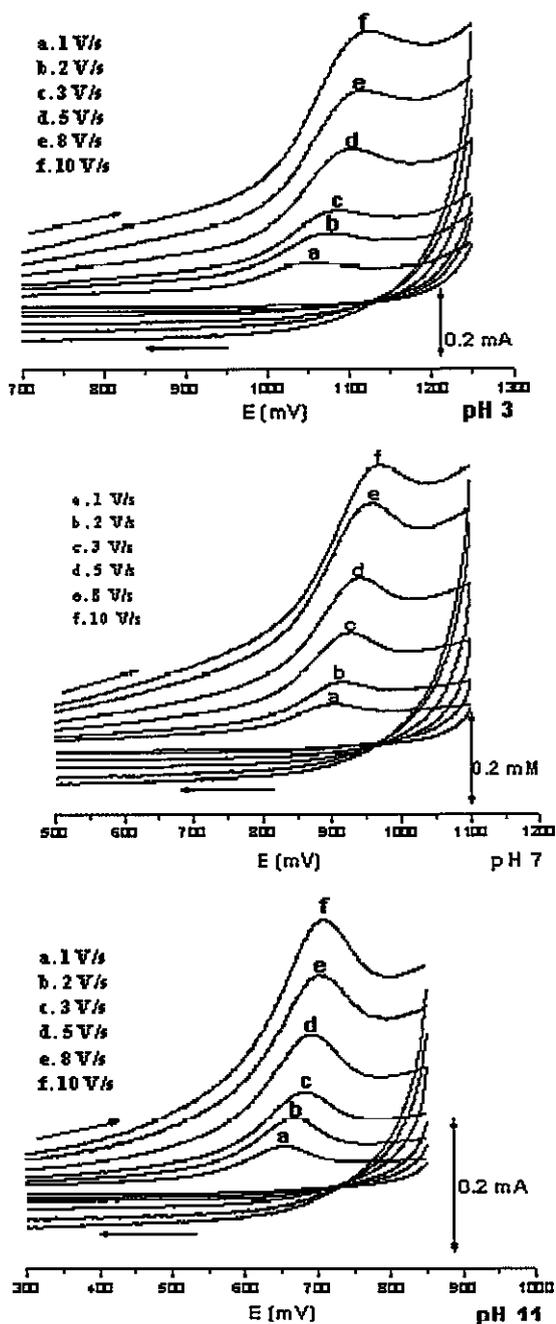


Figura 3.4. Voltamperogramas cíclicos del compuesto c a pH 3, 7 y 11.

Prosiguiendo con el estudio del mecanismo de electro-oxidación de estos compuestos, hemos empleado voltamperometría cíclica. Esta técnica ha demostrado ser muy eficiente para el estudio de mecanismos de reacciones electródicas.<sup>10,11</sup>

Se registraron voltamperogramas cíclicos a pH 3, 7 y 11 (Figura 3.4). En todos los casos un único pico de oxidación irreversible fue observado a diferentes velocidades de barrido (0,1-10 V/s). La única señal registrada corresponde al proceso de formación del derivado piridínico, como lo avala la amplia bibliografía existente al respecto.<sup>14-20</sup> Mediante VC evaluamos la influencia de la velocidad de barrido ( $v$ ) sobre la señal de oxidación. En la Figura 3.5.a, se observa que existe una relación lineal entre el logaritmo de la intensidad de pico ( $\log i_p$ ) y el logaritmo de la velocidad de barrido ( $\log v$ ). Todas las rectas exhibieron pendientes en el rango de 0,73- 0,87. Estos valores estarían indicando una mezcla de difusión con una débil adsorción como fue evaluado previamente por otros autores.<sup>12</sup> A 298 K, en un proceso controlado por difusión  $i_p$  es proporcional a  $v^{1/2}$  (Ec.3.2). Esta relación en términos de logaritmos genera una pendiente de 0,5.<sup>39</sup> ( $\log x^n = n \log x$ )

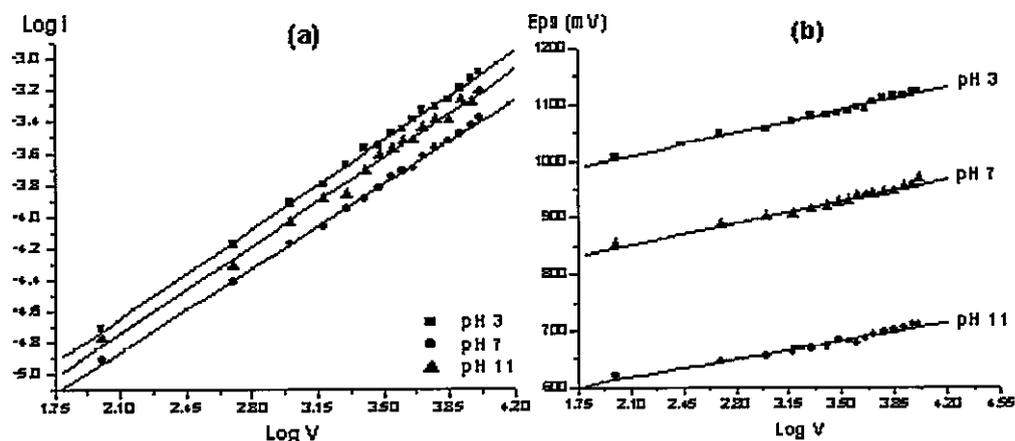


Figura 3.5.a. Evolución de  $\log i_p$  frente a  $\log v$ ; b. Dependencia del potencial de oxidación con el  $\log v$ . (compuesto c)

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} c \quad \text{Ec. 3.4}$$

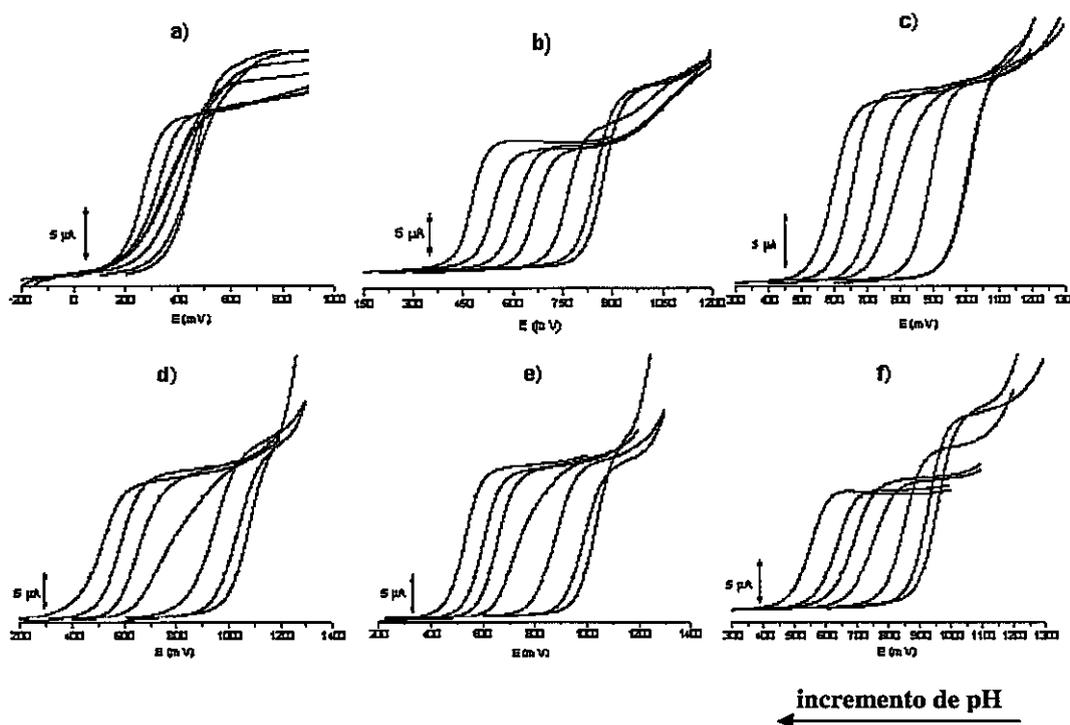
Donde:  $c$  ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) es la concentración de la especie electroactiva,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) el área del electrodo,  $D_0$  ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) el coeficiente de difusión,  $v$  ( $\text{V}/\text{s}$ ) la velocidad de barrido y  $n$  el número de electrones. La intensidad de pico ( $i_p$ ) está expresada en amperes.

También se observó una dependencia del potencial de pico con el  $\log v$ , confirmando el carácter irreversible del proceso electroquímico. Los gráficos de  $E_p$  versus  $\log v$ , (Figura 3.5.b) a  $\text{pH} = 11$ , presentaron las siguientes pendientes: 0,067; 0,044; 0,046; 0,055; 0,048  $\text{V}/\log v$  para los compuestos a, b, c, e y f, respectivamente. Para un proceso irreversible  $\Delta E_p/\Delta \log v = 0.030/\alpha n \text{ V}$ .<sup>61</sup>

Con la finalidad de recabar mayor información acerca del mecanismo de electro-oxidación, se estudió la dependencia de la corriente límite ( $i_{\text{lim}}$ ) con el pH, mediante voltamperometría de barrido lineal con electrodo de disco rotatorio. Esta técnica hidrodinámica proporciona valores de corriente límite con alta precisión, ya que el estado estacionario es alcanzado muy rápidamente y la carga de la doble capa no afecta la medición.<sup>39</sup>

En la **figura 3.6** se presentan los voltamperogramas obtenidos a diferentes valores de pH de los distintos compuestos estudiados. En ella podemos resaltar dos claros efectos producidos por el cambio de pH:

- Por un lado, el desplazamiento de las señales de oxidación hacia potenciales menos positivos al aumentar el pH.
- Por otro lado, un claro efecto sobre el valor de las intensidades de corriente; en concreto, se produce una disminución en la intensidad de la onda en los compuestos **a**, **b** y **f**, al incrementarse el pH. Sin embargo, la intensidad de corriente en los compuestos **c**, **d** y **e** se mantiene invariable con el cambio de pH.



**Figura 3.6.** Evolución de los voltamperogramas de barrido lineal a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 9, 10, 11) de los compuestos a-f.

Como ya se puso de manifiesto, el cambio de pH afectó los valores de los potenciales de oxidación. En la **Figura 3.7** se observa que el proceso de electro-oxidación se mantuvo constante a pH ácidos (pH = 4) y fue dependiente a pH > 4.

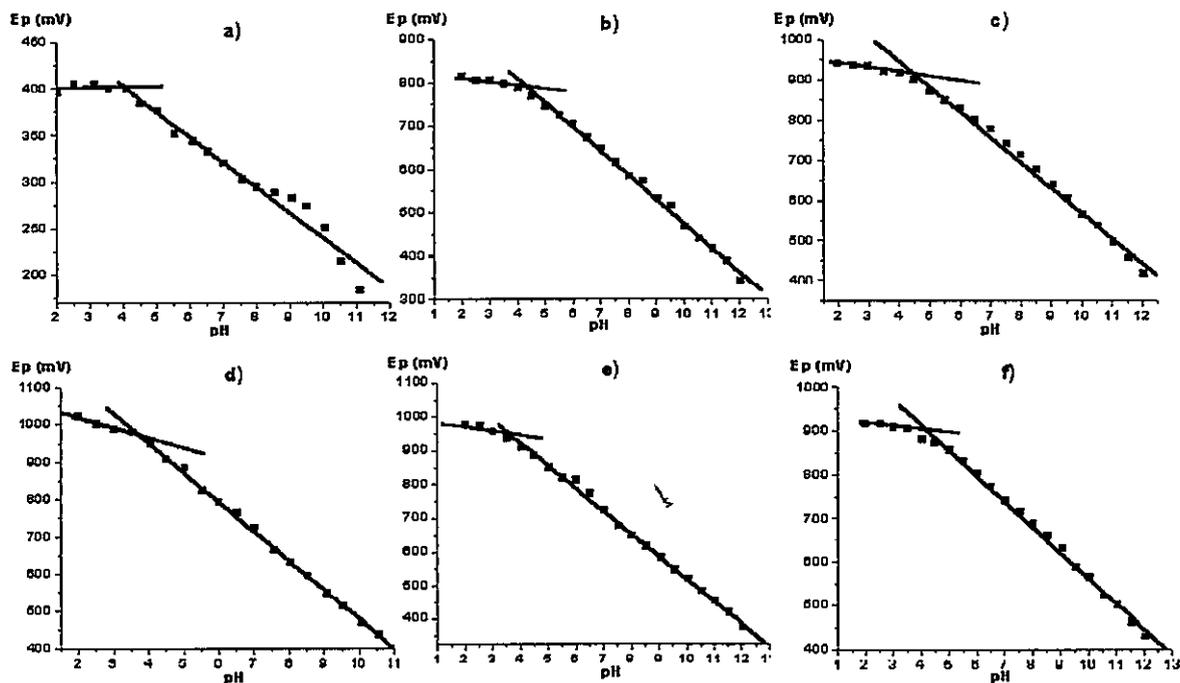


Figura 3.7. Dependencia del potencial de pico con el pH de los compuestos a-f

A  $\text{pH} > 8$ , las pendientes de los gráficos de  $E_p = f(\text{pH})$  para los compuestos a-f fueron: 0,051; 0,060; 0,072; 0,081; 0,067 y 0,064 V/pH, respectivamente, confirmando que iones  $\text{H}^+$  están involucrados en el proceso de oxidación. Del mismo modo las pendientes para los gráficos de  $E_{1/2} = f(\text{pH})$  para los compuestos a-f fueron: 0,049; 0,059; 0,064; 0,078; 0,069 y 0,060 V/pH. El número de protones ( $p$ ) y de electrones ( $n$ ) involucrados en la etapa determinante de la reacción pueden ser calculados mediante la siguiente expresión:

$$\Delta E_{1/2} = -0,059p/\alpha n \Delta \text{pH} \quad \text{Ec. 3.5}$$

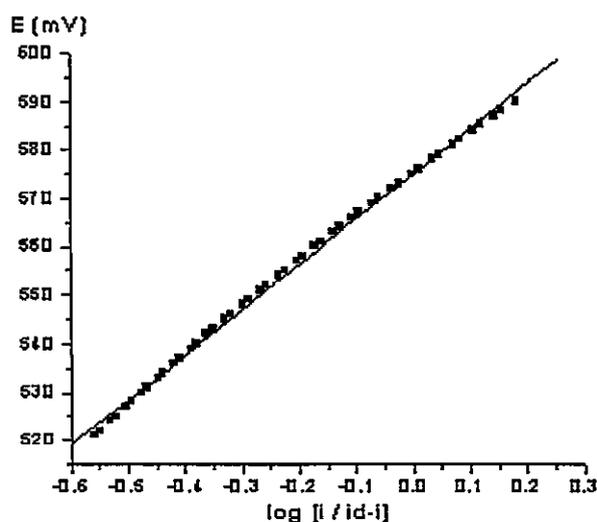
El valor de  $\alpha n$  puede ser calculado mediante la siguiente ecuación:<sup>40</sup>

$$E = E_{1/2} - (0,059/\alpha n) \log [i/(i_d - i)] \quad \text{Ec. 3.6}$$

Un gráfico de  $E$  versus  $\log [i/(id - i)]$ , como el que se muestra en la **figura 3.8**, permite determinar el valor de  $\alpha n$ . Los valores de  $\alpha n$  y  $p$ , a  $\text{pH} = 10$  de los compuestos **a-f** se presentan en la **tabla 3.3**.

**Tabla 3.3.** Valores de  $\alpha n$  y  $p$ , a  $\text{pH} = 10$

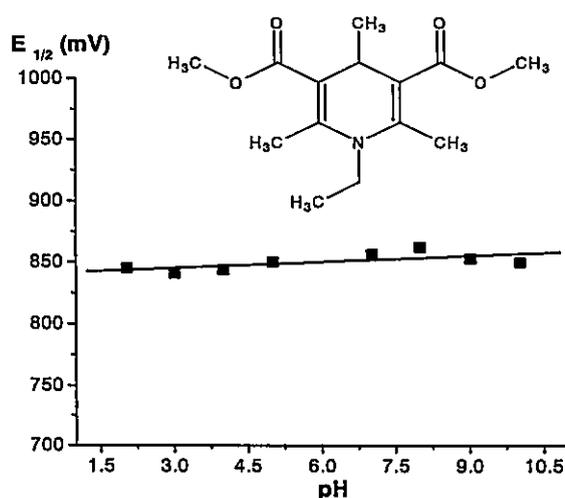
Compuestos	$\alpha n$	$p$
a	0,83	0,7
b	0,68	0,7
c	0,70	0,8
d	0,63	0,8
e	0,77	0,9
f	0,69	0,7



**Figura 3.8.** Gráfico de  $E$  versus  $\log [i/(id - i)]$ , para el compuesto **d**, a  $\text{pH} = 10$ .

A partir de los valores de  $\alpha n$  y  $p$  podemos inferir que un protón y un electrón estarán involucrados en la etapa determinante de la reacción de electro-oxidación de los compuestos **a-f**, a  $\text{pH} > 8$ .

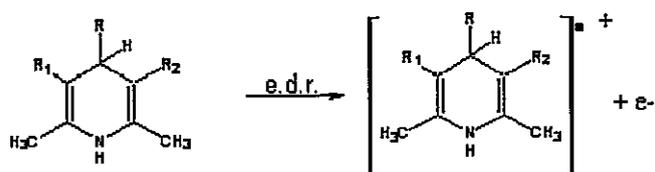
De acuerdo con estos resultados y como ha sido observado por otros autores en compuestos análogos, el mecanismo de electro-oxidación difiere si el medio es ácido o básico.<sup>14,17,41</sup> Esto sugiere que una reacción ácido-base podría estar involucrada en el proceso. Por otro lado, desde el punto de vista sintético, las 1,4-DHPs no son suficientemente básicas para una reacción directa de N-alkilación, pero el anión correspondiente, preparado por la acción de una base fuerte, es un poderoso nucleófilo y reacciona rápidamente con haluros de alquilo. Considerando el carácter débilmente ácido de la dihidropiridina, la abstracción del protón sobre el nitrógeno podría ser el responsable del cambio de mecanismo. Efectivamente, un compuesto N-alkilado como el que se muestra en la **Figura 3.9** presenta un comportamiento distinto a lo observado en los compuestos **a-f**. Los valores de potencial de pico se mantienen invariables con el cambio de pH. Esta evidencia experimental demuestra que el protón en la posición N-1 del anillo de la dihidropiridina afecta considerablemente el mecanismo de oxidación.



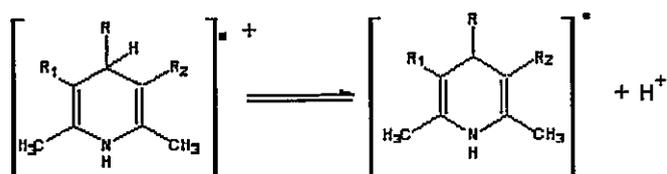
**Figura 3.9.** Evolución del potencial de media onda con el pH de un compuesto N-alkilado.

Este hecho nos indica de que a  $\text{pH} = 4$  el mecanismo de oxidación electroquímica de los compuestos **a-f** no está influenciado por la reacción de abstracción del protón N-1 de la

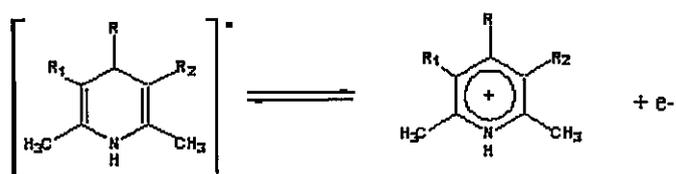
dihidropiridina. Como lo han indicado otros autores, el mecanismo de oxidación en estas condiciones corresponde a una secuencia EQEQ (electroquímico, químico, electroquímico, químico).<sup>16,41</sup> La primera etapa del proceso de electro-oxidación es la transferencia de un electrón, generando un catión radical, esta especie ha sido detectada por espectroscopia EPR por varios investigadores.<sup>15,42</sup> La etapa química contempla la pérdida del protón en la posición 4. La tercera etapa del proceso de oxidación corresponde a la pérdida de un segundo electrón, generando el catión piridinio, el cual en una última etapa química experimenta una reacción de desprotonación, originando el derivado piridínico. El mecanismo que acabamos de describir se expone en el **Esquema 3.2**. En cinética electroquímica frecuentemente se emplea el concepto de cuasi-equilibrio. Esto se refiere a que en una secuencia de reacciones todas las etapas antes y después de la etapa determinante de la reacción (e.d.r.) se encuentran en equilibrio. Esta aproximación a un estado de cuasi-equilibrio se debe a que la velocidad total de la reacción es muy lenta comparada con la velocidad en el cual las otras etapas ocurren, por lo tanto, el equilibrio en estas etapas no es perturbado. Los mecanismos de oxidación y reducción que se postulan en esta tesis están basados en esta aproximación.



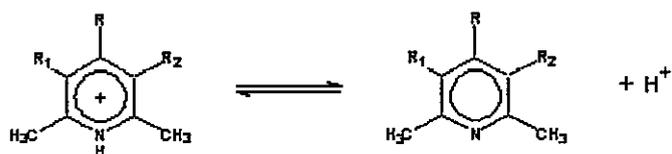
Ec. 3.7



Ec. 3.8



Ec. 3.9



Ec.3.10

**Esquema 3.2.** Mecanismo de electro-oxidación de los compuestos a-f, en medio ácido (pH = 4)

Como ya lo hemos mencionado, a pH = 4 el mayor carácter aceptor de electrones de los sustituyentes en las posiciones C-3 y C-5 influye negativamente en la electro-oxidación, es decir, el potencial es más positivo. Este hecho establece que la etapa de mayor requerimiento energético, determinante de la velocidad de la reacción, es la primera transferencia electrónica. En la **Tabla 3.4** se presentan los potenciales de oxidación de los compuestos a-f a pH 3 y pH 11.

Tabla 3.4. Valores de  $E_{1/2}$  a pH 3 y a pH 11

Compuestos	pH 3 ( $E_{1/2}/mV$ )	pH 11 ( $E_{1/2}/mV$ )
<b>a</b>	445	250
<b>b</b>	850	465
<b>c</b>	979	601
<b>d</b>	1043	510
<b>e</b>	989	534
<b>f</b>	932	572

En

conclusión, a bajos valores de pH (pH = 4), el proceso de oxidación electroquímica de los compuestos **a-f** consiste en un proceso EQEQ, donde la pérdida del primer electrón es la etapa determinante de la velocidad de la reacción.

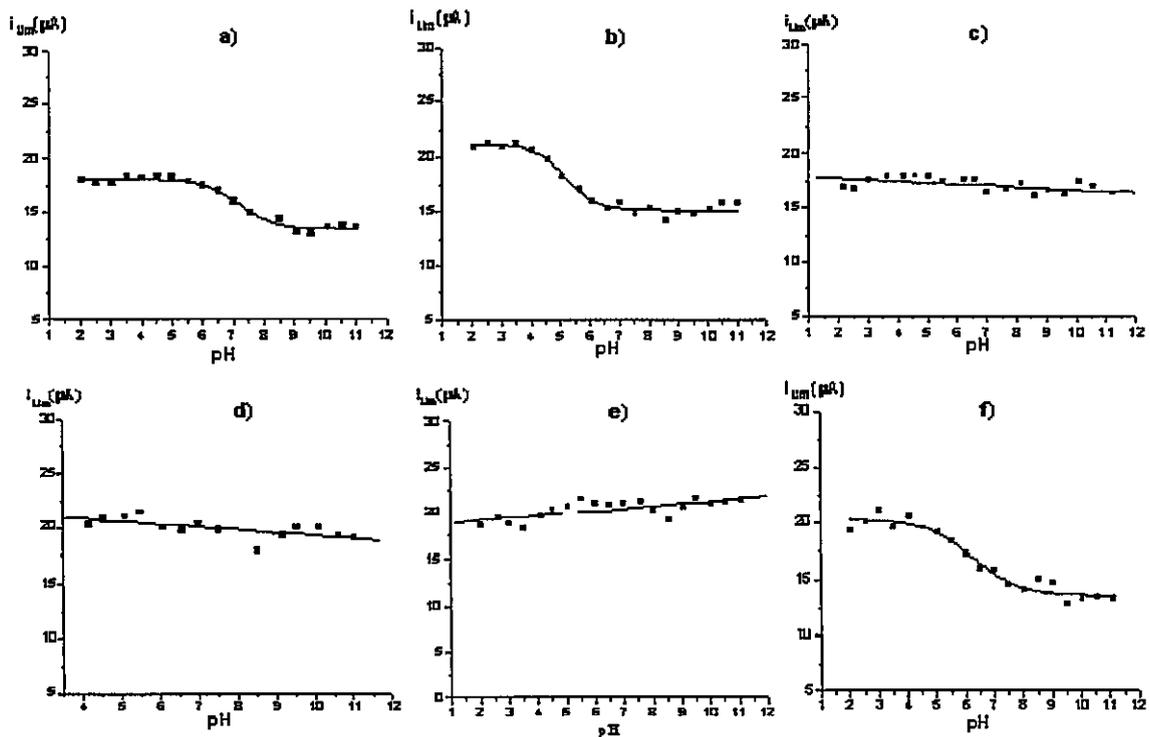
Con respecto al comportamiento electroquímico a pH > 4, podemos analizar las siguientes evidencias experimentales:

- Se produce un desplazamiento de la señal de oxidación hacia potenciales menos positivos al aumentar el pH del medio.
- El orden de facilidad de oxidación en los compuestos **c**, **d** y **e** se invierte a pH básico (pH = 11) **Tabla 3.2**. El mayor poder aceptor de electrones en las posiciones 3 y 5 del anillo de la dihidropiridina favorece la oxidación.
- La presencia del protón en la posición N-1 del anillo de la dihidropiridina es responsable de la dependencia del potencial de oxidación con el pH.
- Los espectros UV-Visible registrados a diferentes valores de pH exhibieron dos bandas de absorción a aproximadamente 240 nm y 350 nm. Estas bandas de absorción no fueron alteradas con el cambio de pH, por lo cual la especie electroactiva debe ser la misma que en medio ácido. Esta observación está de acuerdo con los valores de pKa calculados para este tipo de compuestos, pKa = 19,8 para el compuesto **a**.<sup>43</sup>

- El efecto que produce el pH sobre la intensidad de corriente se puede observar en la **Figura 3.10**. A  $\text{pH} > 6$ , la corriente límite disminuye en los compuestos **a**, **b** y **f**. Según la ecuación de Levich la corriente límite es proporcional a la concentración de la especie electroactiva ( $c$ ), área del electrodo ( $A$ ), coeficiente de difusión ( $D_0$ ), velocidad de rotación ( $\omega$ ), número de electrones ( $n$ ) e inversamente proporcional a la velocidad de barrido ( $v$ ).<sup>44</sup> (Ec. 3.10)

$$i_L = 0,620 nFA D_0^{2/3} \omega^{1/2} v^{-1/6} c \quad \text{Ec. 3.11}$$

Por consiguiente, considerando que las variables  $A$ ,  $c$ ,  $D_0$ ,  $\omega$  y  $v$  son constantes en todo el intervalo de pH estudiado, la disminución de la corriente límite se debe a un cambio en el número de electrones.



**Figura 3.10.** Influencia del pH sobre las intensidades de corriente de los voltamperogramas de barrido lineal de los compuestos a-f.

A partir de antecedentes experimentales similares, Ruiz Montoya y colaboradores<sup>17</sup> proponen que el mecanismo de oxidación del compuesto **a**, a pH > 4, involucra una reacción de dismutación (**DISP 1**). Una reacción de dismutación está termodinámicamente favorecida cuando una reducción (u oxidación) homogénea puede competir con la segunda etapa de transferencia de carga. Existen dos tipos de mecanismos denominados DISP 1 y DISP 2. El proceso se denomina DISP 1 cuando la etapa determinante de la velocidad de la reacción es la primera etapa química y DISP 2 cuando la etapa determinante es la reacción de dismutación propiamente dicha. Estos autores indican que el catión radical de la dihidropiridina, generado en la primera transferencia de carga, sería susceptible de una reacción ácido-base, donde el ión OH<sup>-</sup> del medio, abstrae el protón sobre el nitrógeno de la posición 1, dando lugar a la formación del radical. Esta última especie, altamente reactiva, reacciona con otra molécula del catión radical generado en la primera etapa. Este proceso de dismutación regenera la dihidropiridina por un lado, y genera el derivado piridínico por el otro. En el **Esquema 3.3** se puede apreciar todas las etapas de este mecanismo de oxidación.

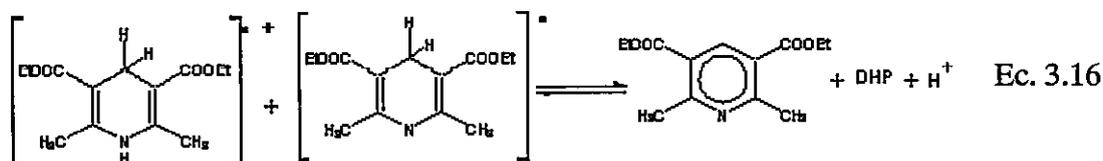
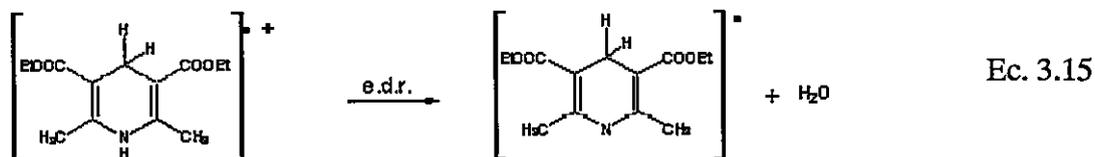
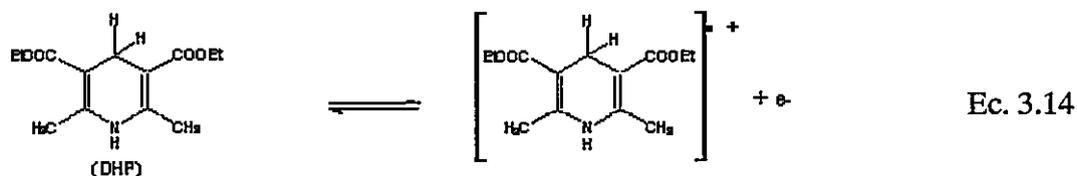
En la primera etapa química del proceso de oxidación, advertimos la abstracción del protón unido al nitrógeno de la dihidropiridina. Con respecto a esta reacción, Cheng y colaboradores<sup>43</sup> han realizado cálculos de energías de disociación de enlaces N-H en derivados dihidropiridínicos. Estos autores han determinado mediante las ecuaciones Ec. 3.12 y Ec. 3.13 que la rotura heterolítica del enlace NH<sup>+</sup> (catión radical dihidropiridínico) es energéticamente más favorable que la del NH (dihidropiridina), 2.4 kcal/mol contra 27 kcal/mol para el compuesto **a**.

$$\Delta G_{\text{het}}(\text{NH}) = -RT \ln K_a = 1,364 \text{pKa} \quad \text{Ec. 3.12}$$

$$\Delta G_{\text{het}}(\text{NH}^{\cdot+}) = 1,364 \text{pKa} + 23,06 [E_{\text{ox}}(\text{N}^{\cdot-}) - E_{\text{ox}}(\text{NH})] \quad \text{Ec. 3.13}$$

$E_{\text{ox}}(\text{N}^{\cdot-})$  y  $E_{\text{ox}}(\text{NH})$  corresponden a los potenciales de oxidación de la especie aniónica y neutra respectivamente (-0,625 y 0,446 V, en dimetilsulfóxido). pKa = 19,8. A partir de estos datos

termodinámicos podemos inferir que la transferencia de un electrón seguido por una reacción de desprotonación es una vía energéticamente favorable para la oxidación de dihidropiridinas.



### Esquema 3.3. Mecanismo de electro-oxidación propuesto para el compuesto a, en medio básico

La reacción de dismutación fue favorecida con respecto a la segunda transferencia electrónica, esto explica la reducción de la intensidad de corriente con el incremento del pH de los compuestos a, b y f. Para confirmar el número de electrones involucrados en el proceso de electro-oxidación se llevaron a cabo experimentos de coulombimetría a potencial controlado. Las disoluciones de los derivados dihidropiridínicos fueron electrolizadas a pH 3 y a pH 11 y sus respectivas cargas fueron registradas en el tiempo. Los resultados del análisis coulombimétrico revelaron que en el proceso de oxidación de los compuestos c, d y e se transfieren dos electrones en todo el rango de pH estudiado. Sin embargo, en los compuestos a, b y f se transfieren dos electrones a pH ácido (pH = 3) y un electrón a pH básico (pH = 11). (Tabla 3.5).

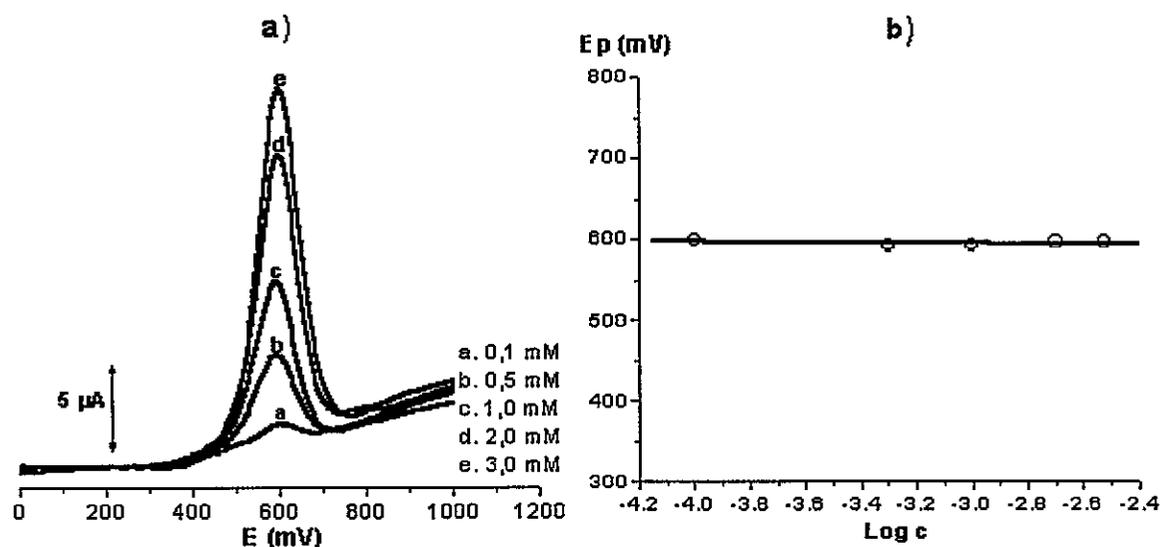
**Tabla 3.5.** Número de electrones calculados por coulombimetría a pH 3 y pH 11

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>
pH 3	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
pH 11	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	.....	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1

A pesar de la diferencia existente en medio ácido y básico en el número de electrones transferidos, se ha corroborado mediante Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) que el único producto de la oxidación electroquímica a pH 3 y pH 11 de los compuestos estudiados, es el derivado piridínico.<sup>45</sup> Los compuestos a-f fueron sometidos a electrolisis a potencial controlado. Las disoluciones inicial y final fueron sometidas a análisis por CG-EM. En el Apéndice B presentamos los espectros de masas de los compuestos dihidropiridínicos y de los derivados piridínicos, respectivamente. El pico fundamental o pico base (PB), el ión molecular y algunos otros iones fueron identificados. Algunas conclusiones sobre las características de los espectros de masas fueron las siguientes:

- En las disoluciones electrolizadas se encontró el fragmento correspondiente al derivado piridínico, producto de la electro-oxidación.
- La aromatización del anillo de la dihidropiridina permitió que el sustituyente en la posición 4 fuera mantenido, en contraposición con lo que ocurrió con el derivado dihidropiridínico.
- En las formas oxidadas de los compuestos c y f el grupo nitro fue susceptible de fragmentación.

Finalmente, en respecto a la etapa determinante de la velocidad de la reacción, hemos mencionado que ésta determina si el proceso corresponde a un mecanismo DISP 1 o DISP 2. Una característica distintiva entre ambos procesos consiste en la dependencia del potencial de oxidación con la concentración de la especie electroactiva.<sup>27</sup> En los compuestos estudiados, el cambio de concentración no afecta los valores de los potenciales de oxidación,  $dE_p/d\log c = 0$ , como se indica en la **Figura 3.11**. Este hecho descarta la posibilidad de que una reacción de dismutación de segundo orden sea la etapa determinante de la velocidad (DISP 2).



**Figura 3.11. a.** Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto f a diferentes concentraciones (pH 10). **b.** Gráfico de potencial de pico *versus* logaritmo de la concentración.

Además, hemos visto que el aumento en la concentración del ión OH<sup>-</sup> en el medio facilita la oxidación de estos compuestos. Este efecto se ve reflejado en los potenciales de oxidación cuyos valores son desplazados hacia potenciales menos positivos. Los números de electrones calculados a partir de la curva de carga en función del tiempo a pH 3, 7 y 11, establecen una transición de dos electrones (EQEQ) a un electrón (DISP 1) en el proceso de electrooxidación del compuesto b. (**Figura 3.12**)

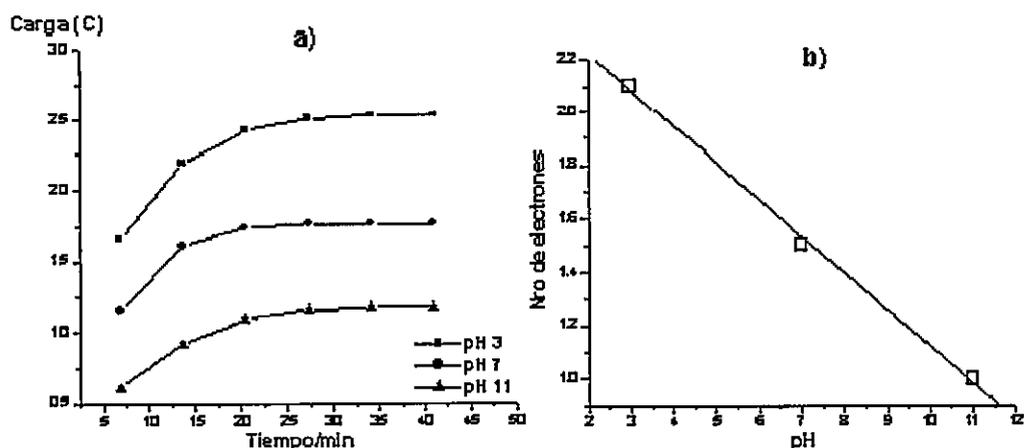


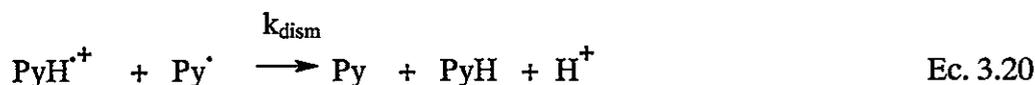
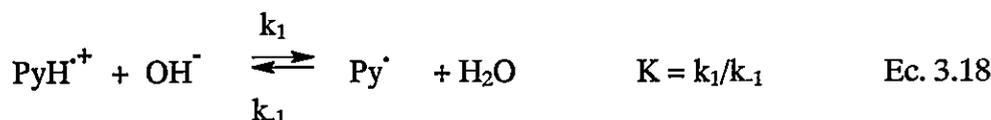
Figura 3.12. a. Curva Carga-Tiempo del compuesto **b**, a pH 3, 7 y 11; b. Número de electrones calculados *versus* pH.

En resumen, el mecanismo DISP 1 se ajusta muy bien a todas las evidencias experimentales observadas sobre el proceso de electro-oxidación de los compuestos **a**, **b** y **f** a pH > 4.

Con respecto al mecanismo de electro-oxidación de los compuestos **c**, **d**, y **e** debemos considerar algunos aspectos teóricos que nos permitan explicar la razón que justifique el comportamiento invariable de la intensidad de corriente con el cambio de pH en estos compuestos.<sup>27</sup> Como fue mencionado, un proceso de dismutación está favorecido cuando una reacción homogénea puede competir con la segunda transferencia heterogénea de carga. (Esquema 3.4)

La constante de equilibrio,  $K$ , para la primera etapa química y el parámetro cinético,  $k_{\text{dism}}$ , fueron definidos para explicar que los mecanismos EQE, DISP 1 y DISP 2 son casos límites de un mismo proceso general, donde un mecanismo DISP 1 estará favorecido cuando la reacción de dismutación (Ec. 3.20) sea más rápida que la deprotonación del catión radical dihidropiridínico ( $\text{PyH}^{+\cdot}$ ), esto es, a altos valores del parámetro cinético  $k_{\text{dism}}$ . Consecuentemente, esto impide la segunda transferencia del electrón en la superficie del electrodo. Por el contrario, el mecanismo EQE se presenta cuando hay bajos valores de  $k_{\text{dism}}$  y la constante de equilibrio no es tan baja. La reacción en la ecuación 3.20 es mucho más lenta

que la Ec. 3.18 ( $k_{\text{dism}} < k_1$ ). Esto permite la reacción de oxidación heterogénea de la especie  $\text{Py}^\cdot$  (Ec. 3.19). Sin embargo, cuando bajos valores de  $k_{\text{dism}}$  son acompañados además de valores de  $K$  suficientemente bajos, un mecanismo DISP 2 está favorecido. Esta última transición puede ser explicada considerando que un bajo valor de  $K$  puede deberse a una disminución de  $k_1$ , lo cual incrementa la distancia de  $\text{Py}^\cdot$  de la superficie del electrodo. Por consiguiente, una segunda transferencia electrónica heterogénea estará menos favorecida comparada con la reacción de dismutación, a pesar de la lentitud de esta reacción química, lo



**Esquema 3.4.** Proceso global de la reacción de oxidación de las dihidropiridinas en medio básico.

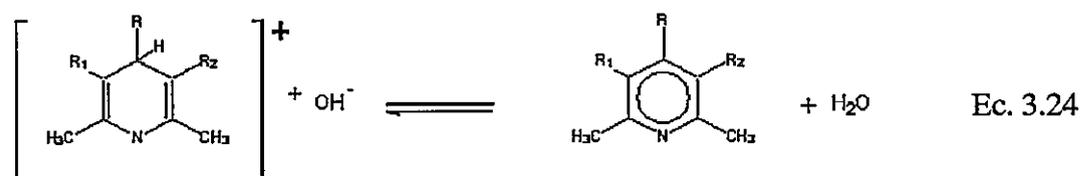
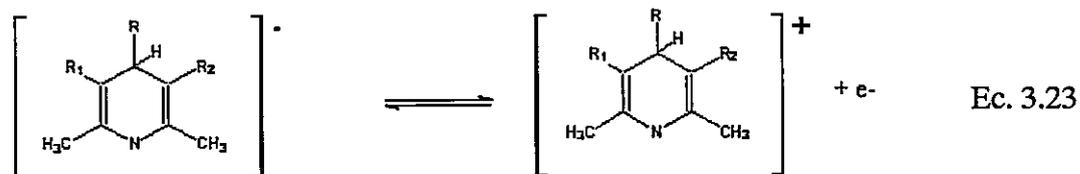
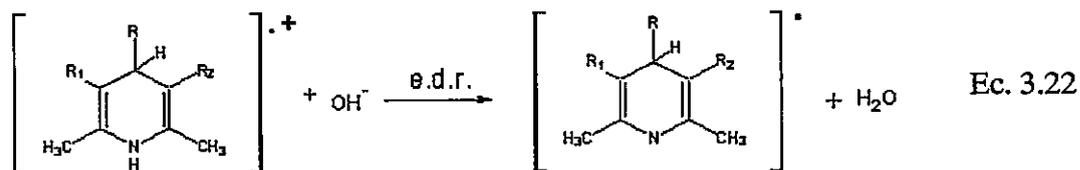
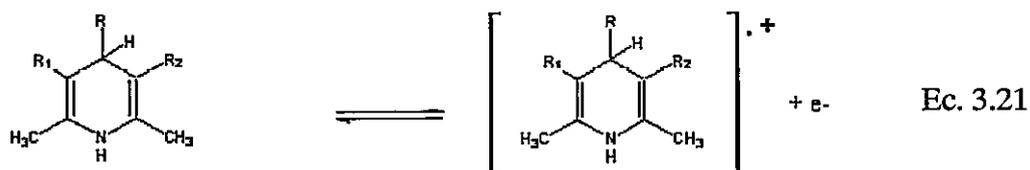
que la convierte en la etapa determinante de la reacción global.

Teniendo en cuenta estos criterios podríamos establecer que los compuestos **c**, **d** y **e** siguen un proceso EQEQ. Esto explica que en todo el rango de pH estudiado se transfieran 2 electrones. Desde el punto de vista estructural, estos compuestos presentan un grupo nitrofurilo en la posición 4, el que sería responsable del cambio de mecanismo de electro-oxidación con respecto a los otros compuestos estudiados. La presencia del oxígeno crea una distribución asimétrica de la densidad de carga en el heterociclo, que a su vez es reforzada por la presencia del grupo nitro. Por lo tanto, el grupo nitrofurilo estaría ejerciendo un mayor efecto aceptor de electrones sobre el anillo de la dihidropiridina, ocasionando una disminución de la densidad electrónica sobre el nitrógeno, lo que produce un debilitamiento de la unión N-H, facilitando

la desprotonación del catión radical formado. Es importante destacar que, frecuentemente existe una correlación entre la velocidad de abstracción de un protón (acidez cinética) y la estabilidad termodinámica del anión formado (acidez termodinámica), lo que se traduce en un aumento de  $k_1$  y una disminución de  $k_{-1}$ , con el resultado neto de un aumento de  $K$ . Un aumento en la constante de equilibrio,  $K$ , con respecto a  $k_{\text{dism}}$ , permite que se produzca la segunda transferencia electrónica en la superficie del electrodo. En el **esquema 3.5** se resume el mecanismo de oxidación propuesto.

Con respecto al comportamiento electroquímico de los compuestos estudiados en medio prótico podemos presentar las siguientes conclusiones:

- El mecanismo de electro-oxidación de los compuestos **a-f** difiere si el medio es ácido o básico. El protón en la posición 1 del anillo de la dihidropiridina es el responsable de dicho cambio.
- En medio ácido ( $\text{pH} < 4$ ), un mecanismo de oxidación EQEQ fue encontrado para todos los casos. Donde la primera transferencia electrónica sería la etapa determinante de la velocidad de la reacción.
- A  $\text{pH} > 4$ , el mayor carácter aceptor de electrones del grupo nitrofurilo en la posición 4 favoreció el mecanismo EQEQ en los compuestos **c**, **d** y **e**. Sin embargo, un proceso DISP 1 fue descrito para los compuestos **a**, **b** y **f**. La etapa química posterior a la primera transferencia electrónica sería la etapa determinante de la velocidad de la electro-oxidación.
- Por último, hemos determinado mediante CG-EM que independientemente del mecanismo involucrado, el único producto del proceso de electro-oxidación es el derivado piridínico.



**Esquema 3.5.** Mecanismo de electro-oxidación de los compuestos c, d y e a pH > 4.

### 3.2.2. Medio Aprótico

El comportamiento electroquímico en 100% de DMF y 0,1 M de HFPTBA fue evaluado mediante experimentos voltamperométricos y coulombimétricos. Se emplearon voltamperometría cíclica, voltamperometría de barrido lineal con electrodo de disco rotatorio y voltamperometría de pulso diferencial. Mediante, esta última técnica se obtuvo un sólo pico de oxidación bien definido para todos los compuestos estudiados. (Figura 3.13)

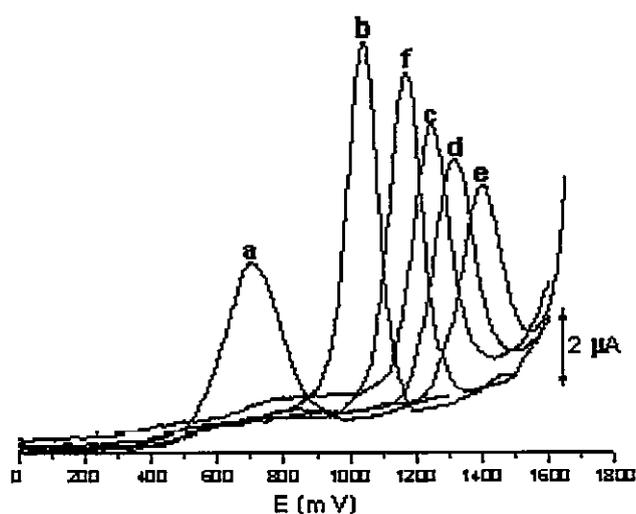
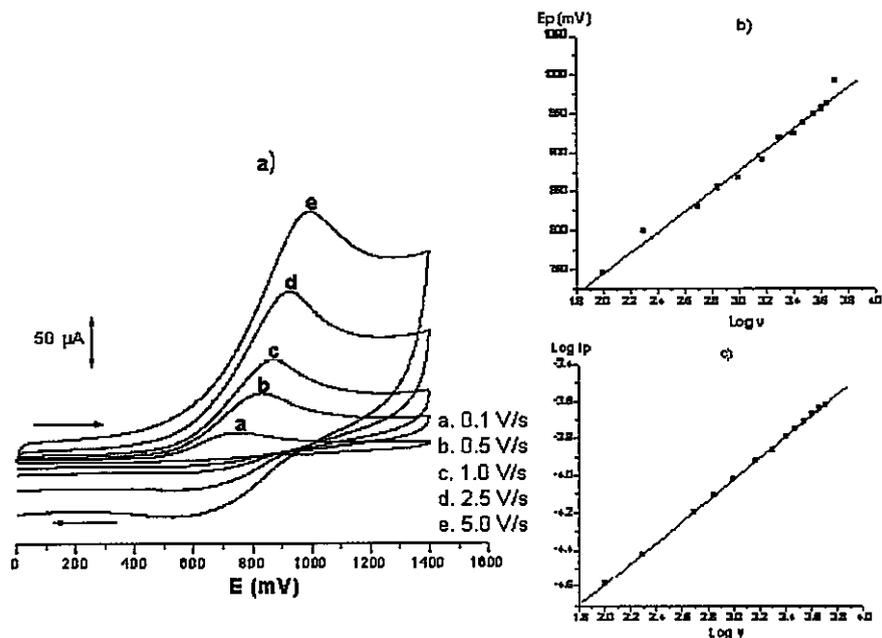


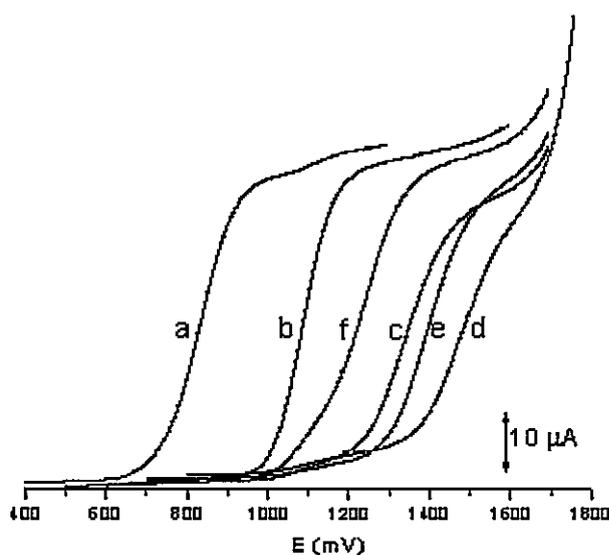
Figura 3.13. Voltamperogramas de pulso diferencial de los compuestos a-f

Como en VPD, los voltamperogramas cíclicos presentaron un sólo pico irreversible a diferentes velocidades de barrido (0,1 – 5 V/s). En todos los casos, los gráficos de  $\log i_p$  versus  $\log v$  exhibieron pendientes cercanas a 0,5, lo cual indica que el proceso electrodo es controlado por difusión. Los valores observados, 0,52-0,60, fueron inferiores a los registrados en el medio prótico. Igualmente, los valores de potenciales de pico fueron dependientes de la velocidad de barrido. Los valores de las pendientes del gráfico de  $E_p$  versus  $\log v$  fueron: 0,132; 0,073; 0,089; 0,112; 0,105 y 0,083 para los compuestos a-f, respectivamente. (Figura 3.14)



**Figura 3.14.** a) Voltamperogramas cíclicos del compuesto **a**, a diferentes velocidades de barrido. b) Evolución del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad. c) Gráfico de  $\log i_p - \log v$

Asimismo, en la **Figura 3.15**, podemos observar que los voltamperogramas de barrido lineal presentan una única onda de oxidación que corresponde a un proceso de transferencia de dos electrones según el análisis coulombimétrico. (**Tabla 3.6**)



**Figura 3.15.** Voltamperogramas de barrido lineal de los compuestos **a-f** (a una velocidad de rotación de 3000 rpm).

Con respecto a los potenciales de media onda, es importante destacar que presentaron valores más positivos que los encontrados en el medio prótico. Además, el orden de reactividad es similar al observado a pH ácido.

**Tabla 3.6.** Valores de  $E_{1/2}$  y Nro de electrones determinados

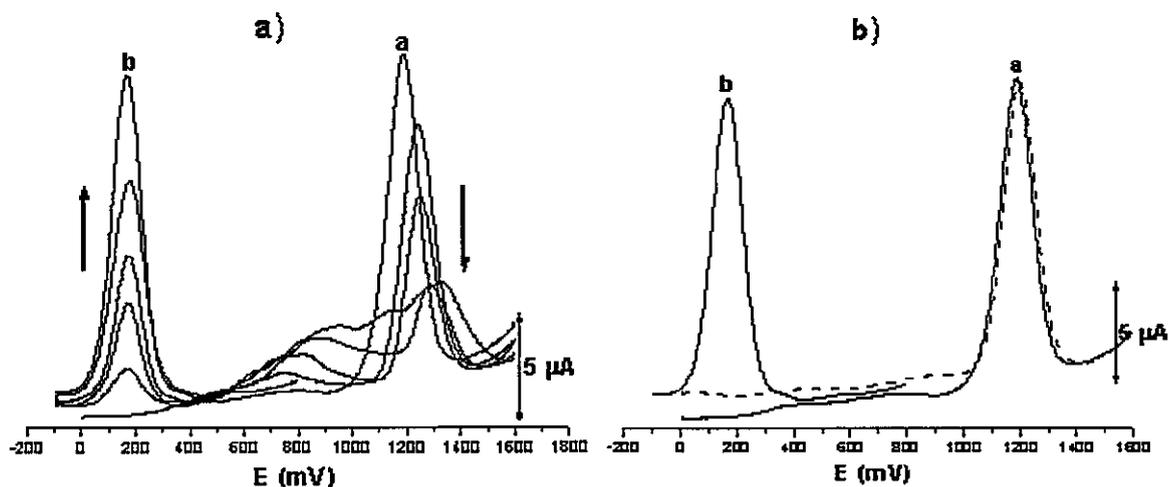
Compuestos	$E_{1/2}$ (mV)	Nro de electrones
a	827	$1,9 \pm 0,1$
b	1088	$2,1 \pm 0,1$
c	1343	$2,0 \pm 0,1$
d	1434	$2,1 \pm 0,2$
e	1387	$1,9 \pm 0,1$
f	1224	$2,0 \pm 0,1$

Las investigaciones más recientes al respecto, sugieren que las dihidropiridinas experimentan un mecanismo de electro-oxidación EQEQ en medio aprótico. Este proceso es el mismo que fue descrito en medio prótico a pH ácido, esto explica la similitud en el orden de reactividad.

Con respecto a la mayor facilidad de oxidación de los compuestos estudiados en medio prótico es importante señalar que en una reacción el efecto del disolvente puede modificar la energía tanto de los reactivos como del estado de transición. Un disolvente prótico a diferencia de un disolvente aprótico, tiene la capacidad de generar una fuerte solvatación por puentes de hidrógeno. Nosotros suponemos que esta diferencia en el efecto de solvatación genera cambios en la energía de activación afectando la energética de la reacción.

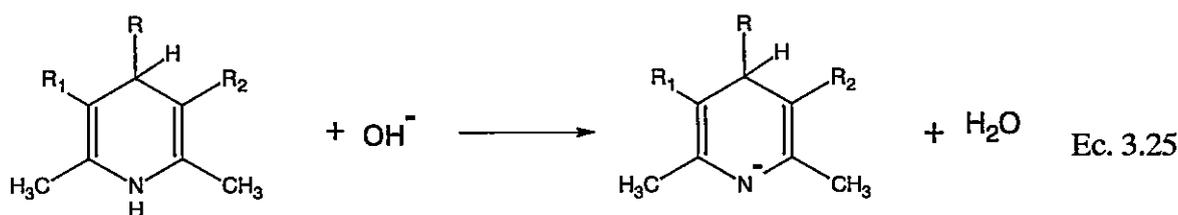
Como será mencionado en la parte de reducción, en medio aprótico el anión radical nitro actúa como base de Brönstead abstrayendo el protón de la posición N-1 del anillo dihidropiridínico, por lo cual la adición de una base fuerte en la disolución nos permitiría obtener el nitración dihidropiridínico en este medio. Para investigar el comportamiento electroquímico de esta

especie, empleamos hidróxido de tetrabutilamonio y ácido perclórico. En la **figura 3.16.a**, podemos observar que la adición creciente de la base disminuye la señal **a**, correspondiente a la especie neutra en la misma proporción que una nueva señal **b**, de la especie aniónica crece. Con la adición de la base toda la dihidropiridina es transformada a anión dihidropiridínico. En todos los compuestos estudiados, excepto para el compuesto **d**, esta reacción se revierte con la adición de ácido, como puede verse en la **figura 3.16.b**, el pico de oxidación en líneas punteadas corresponde a la restitución de la especie neutra.



**Figura 3.16.** Voltamperogramas de pulso diferencial del compuesto **f**. **a)** Adición de concentraciones crecientes de hidróxido de tetrabutilamonio. **b)** Completa transformación y restitución de la especie neutra.

Por lo general, si un equilibrio ácido-base precede la primera transferencia electrónica la base conjugada siempre será más fácilmente oxidada que el ácido conjugado.<sup>26</sup> Esto ha sido observado en las dihidropiridinas estudiadas (Ec. 3.25), donde el anión dihidropiridínico se oxida a potenciales mucho más negativos que la dihidropiridina. En la **tabla 3.7** se presentan los potenciales de oxidación.



**Tabla 3.7.** Diferencia de potenciales de oxidación entre la dihidropiridina y el anión dihidropiridínico

Compuestos	$E_{\text{ox}}(\text{NH})/\text{V}$	$E_{\text{ox}}(\text{N}^-)/\text{V}$	$E_{\text{ox}}(\text{N}^-) - E_{\text{ox}}(\text{NH})$
<b>a</b>	0,716	-0,144	- 0,860
<b>b</b>	1,044	0,020	- 1,024
<b>c</b>	1,276	0,228	- 1,048
<b>d</b>	1,460	0,432	- 1,028
<b>e</b>	1,368	0,380	- 0,988
<b>f</b>	1,188	0,168	- 1,020

Como hemos visto, la diferencia de los potenciales de oxidación de las especies aniónica y neutra de la dihidropiridina es un importante parámetro que permite estimar la energía necesaria para la disociación heterolítica del enlace  $\text{NH}^+$ , aplicando la Ec. 3.13  $\{\Delta G_{\text{het}}(\text{NH}^+) = 1,364\text{pKa} + 23,06[E_{\text{ox}}(\text{N}^-) - E_{\text{ox}}(\text{NH})]\}$ .

Con respecto al comportamiento electroquímico de los compuestos a-f en medio aprótico podemos resumir que el mecanismo de electro-oxidación corresponde a un proceso EQEQ y que la adición de una base da lugar a la formación del nitración dihidropiridínico, cuyo potencial de oxidación es desplazado hacia valores menos positivos que la dihidropiridina de la cual procede.

### 3.3. Electro-reducción de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs

Debemos tener presente que los parámetros electroquímicos no corresponden a una correlación absoluta con los datos de actividad biológica, debido a la enorme complejidad de la química biomédica. Muchos otros importantes factores deben, además, ser considerados con respecto a la actividad de la droga *in vivo*, entre ellos, la estereoquímica, la difusión, la solubilidad, el metabolismo, la permeabilidad de membrana, las interacciones enzimáticas, entre otros. Sin embargo, hay que reconocer el importante aporte de la electroquímica en la elucidación de procesos biológicos que involucran transferencias electrónicas. Hay mucha similitud entre las reacciones de transferencia electrónica electroquímica y biológica. El empleo de técnicas electroquímicas ha permitido esclarecer el mecanismo de acción de ciertas drogas. Entre ellas, los derivados nitroaromáticos, que como ya fue mencionado constituyen una importante clase de compuestos empleados extensivamente en el tratamiento de infecciones anaeróbicas.<sup>6,7,17,46</sup> Hay una buena evidencia de que algunas propiedades electroquímicas de nitro compuestos pueden ser correlacionadas con su efecto farmacológico.<sup>8,36</sup> A continuación exponemos los resultados de la electro-reducción de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, en medio prótico, mixto y aprótico.

#### 3.3.1. Medio Prótico

El proceso de electro-reducción fue estudiado por polarografía de pulso diferencial y polarografía TAST. Se registraron polarogramas en el intervalo de pH (2-12), a fin de obtener información acerca de la influencia del pH en la respuesta electroquímica. (Figura 3.17). Los tres compuestos presentaron una señal de reducción bien definida (I) correspondiente a la reducción del grupo nitro presente en la molécula, según la siguiente reacción global:

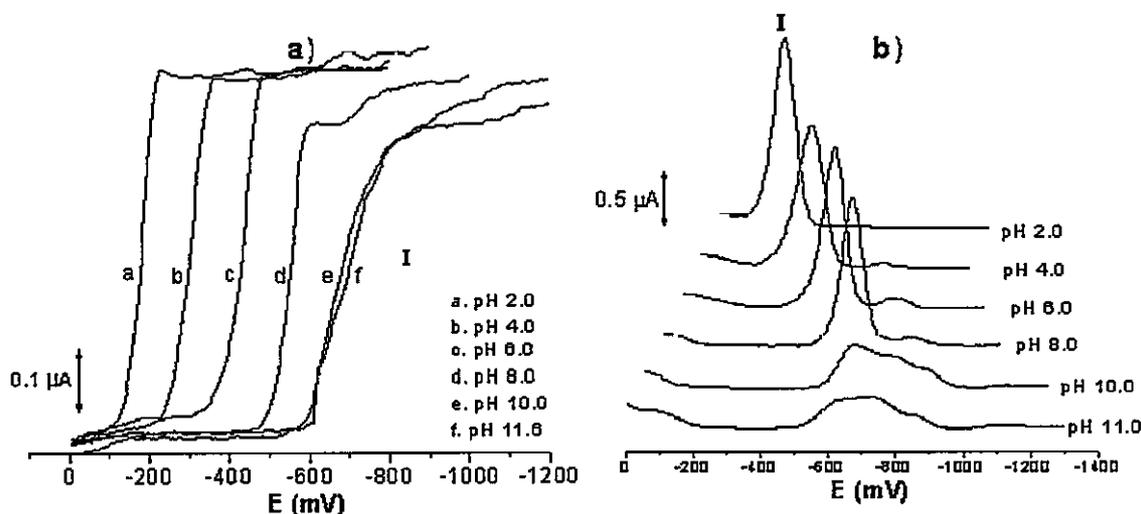


Los polarogramas de FDHP2, a pH ácido, pH < 5, presentaron una segunda señal de reducción de menor intensidad y a potenciales más negativos. Esta segunda señal, dependiente del pH, puede ser atribuida a la reducción de la hidroxilamina mediante la siguiente reacción:<sup>19,30</sup>





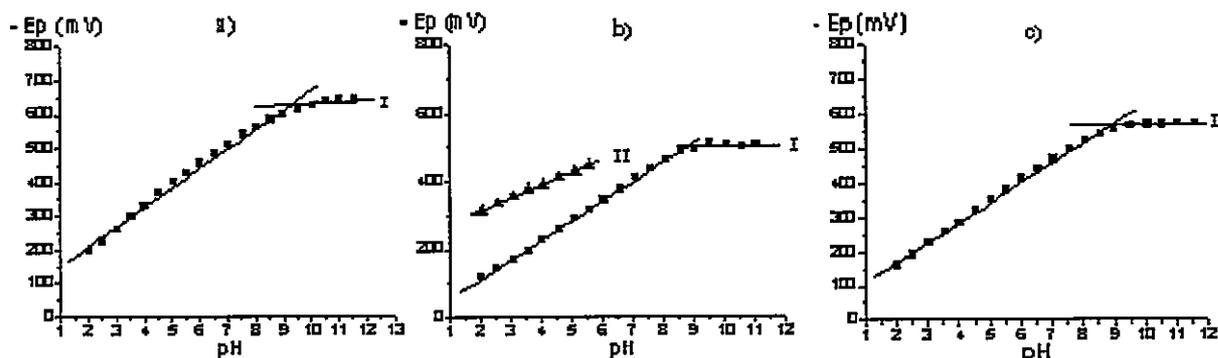
Ec. 3.27



**Figura 3.17.** a) Polarogramas TAST y b) polarogramas de pulso diferencial del compuesto FDHP1, a distintos valores de pH.

Es importante destacar que aunque las señales observadas en los polarogramas TAST y de pulso diferencial sean equivalentes, estos últimos, por su mayor resolución, nos permiten advertir que a  $\text{pH} = 10$ , la señal se ensancha insinuando una posible separación de picos. (Figura 3.17.b)

El incremento del pH generó un desplazamiento de las ondas polarográficas hacia valores más negativos, lo cual indica que iones  $\text{H}^+$  están involucrados en el proceso de reducción (Ec. 3.2 y Ec. 3.3). Sin embargo, a pH más básico,  $\text{pH} = 10$ , tienden a mantenerse independientes con respecto al cambio de pH. Este comportamiento está representado en la figura 3.18, donde el gráfico  $E_p$  versus pH reveló la presencia de dos segmentos lineales.



**Figura 3.18.** Dependencia del potencial de pico con el pH, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.

Las pendientes encontradas en el primer segmento del gráfico  $E_p = f(\text{pH})$ , para FDHP1, FDHP2 y FDHP3, fueron: 0,060; 0,058 y 0,059 V/pH, respectivamente. De la misma manera hemos encontrado valores de 0,062; 0,057 y 0,061 V/pH en los gráficos de  $E_{1/2}$  versus pH. Como habíamos mencionado en la sección 3.2.1, los valores de  $\alpha n$  pueden ser estimados mediante la siguiente expresión:

$$E = E_{1/2} - (0,059/\alpha n) \log [i/(i_d - i)] \quad \text{Ec. 3.28}$$

$$E/\log [i/(i_d - i)] = 0,059/\alpha n \quad \text{Ec. 3.29}$$

Posteriormente, la ecuación 3.30 nos permitió determinar el número de protones (p) involucrados en la etapa determinante de la velocidad de la reacción. (Figura 3.19).

$$\Delta E_{1/2} = - 0,059p/\alpha n \Delta \text{pH} \quad \text{Ec. 3.30}$$

En la **tabla 3.8** presentamos los valores de  $\alpha n$  y p a pH = 2, 4 y 6 de los compuestos estudiados.

Estos valores sugieren que dos electrones y un protón estarían involucrados en la etapa determinante de la velocidad de la reacción. El aumento de la basicidad del medio afecta en forma negativa la reacción de protonación, desplazando los potenciales hacia valores más negativos.

Tabla 3.8. Valores de  $\alpha n$  y  $p$  calculados a pH 2, 4 y 6

Compuestos	pH 2		pH 4		pH 6	
	$\alpha n$	$p$	$\alpha n$	$p$	$\alpha n$	$p$
FDHP1	1.1	1.1	0.9	0.9	0.8	0.8
FDHP2	1.3	1.2	1.2	1.1	0.8	0.8
FDHP3	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0

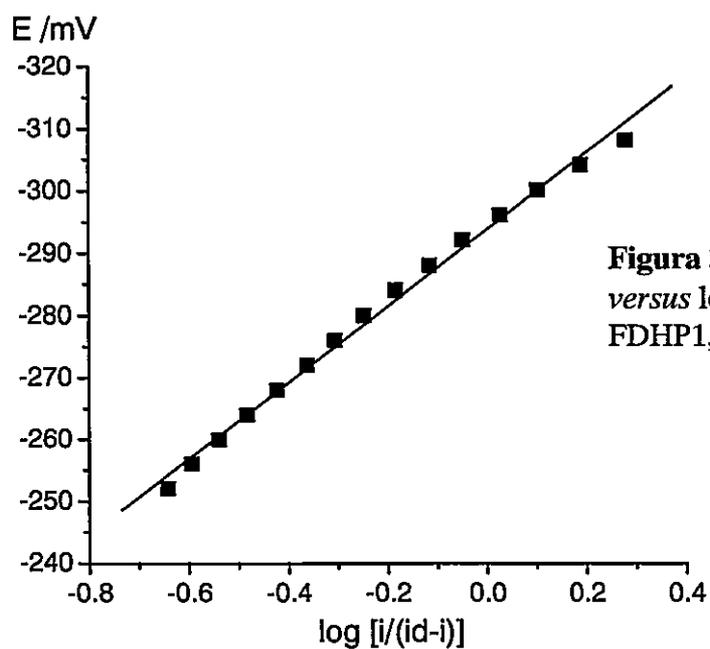


Figura 3.19. Gráfico de E versus  $\log [i/(id-i)]$  para FDHP1, a pH = 4

Por otro lado, la corriente límite determinado por polarografía TAST se mantuvo prácticamente independiente con el cambio de pH, lo cual indica que el mismo número de electrones es transferidos en el proceso de electro-reducción en el intervalo de pH estudiado (2-12). (Figura 3.20) La ecuación para la corriente límite está relacionada con el tiempo de gota en segundos ( $t$ ), la velocidad del flujo de mercurio a través del capilar en mg/s ( $m$ ), el coeficiente de difusión del analito en  $\text{cm}^2/\text{s}$  ( $D$ ), la concentración de la especie electroactiva en  $\text{mol}/\text{cm}^3$  ( $c$ ) y el número de electrones ( $n$ ). (Ec. 3.31)

$$i_{\text{Lim}} = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} c \quad \text{Ec. 3.31}$$

La presencia en los polarogramas de una única señal de reducción del grupo nitro hasta la hidroxilamina por transferencia de 4 electrones y 4 protones indica que la primera transferencia electrónica estaría ocurriendo a potenciales de reducción más negativos o muy similares que las transferencias consecutivas.

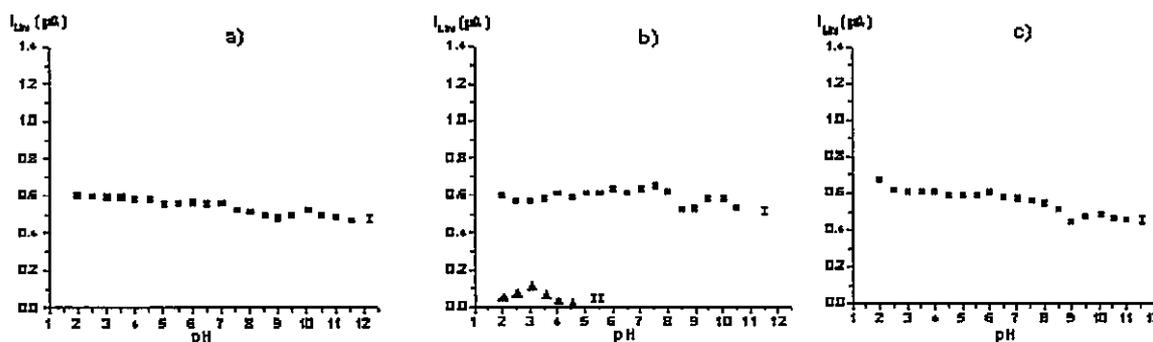


Figura 3.20. Influencia del pH sobre la corriente límite, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.

En la tabla 3.9, podemos observar que en todo el intervalo de pH estudiado, el orden de reactividad se mantiene invariable:  $\text{FDHP2} > \text{FDHP3} > \text{FDHP1}$ . El anillo de la dihidropiridina ejerce un efecto dador sobre el grupo nitrofurilo. Sustituyentes aceptores de electrones en las posiciones 3 y 5 disminuyen este carácter, ejerciendo un efecto favorable en la reducción del grupo nitro. Esto justifica el orden de reactividad encontrado. Además, hemos determinado mediante análisis coulombimétrico a pH 7, que efectivamente el número total de electrones transferidos en el proceso de reducción del grupo nitro es 4.

Tabla 3.9. Potenciales de media onda y número de electrones

Compuestos	$-E_{1/2}$ (mV)	$-E_{1/2}$ (mV)	$-E_{1/2}$ (mV)	Nro de electrones pH 7
	pH 3	pH 7	pH 10	
FDHP1	240	492	672	$4.1 \pm 0.3$
FDHP2	160	392	540	$4.1 \pm 0.3$
FDHP3	204	452	648	$4.0 \pm 0.1$

Wardman señala que el potencial de reducción del 2-nitrofurano (Figura 3.21) en medio acuoso, a pH 7, corresponde a  $-330$  mV (contra el electrodo normal de hidrógeno, ENH)<sup>11</sup> Para determinar la magnitud real del efecto sustituyente del anillo dihidropiridínico sobre el potencial de reducción del nitrofurano hemos convertido este valor a escala de Ag/AgCl (en KCl saturado). El potencial calculado tiene un valor de  $-133$  mV ( $E^- (E_{1/2} + 197 \text{ mV})$ ).<sup>39</sup>

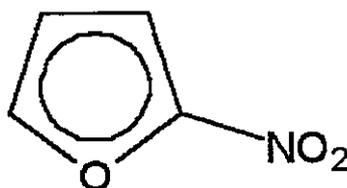


Figura 3.21. Estructura química del 2-nitrofurano

Podemos apreciar, a partir de los potenciales de reducción de FDHP1, FDHP2 y FDHP3,  $-492$ ,  $-392$  y  $-452$ , respectivamente, que la presencia del grupo dihidropiridínico genera, en este mismo orden, un desplazamiento de  $359$ ,  $259$  y  $319$  mV hacia valores más negativos. Es importante destacar, que estudios mediante difracción de Rayos X han permitido tener una mejor visión de la estructura química de este tipo de compuestos.<sup>48</sup> Se ha establecido que la dihidropiridina adopta una forma de bote plano, y que el sustituyente en la posición C-4 se encuentra en forma aproximadamente perpendicular a dicho plano. De acuerdo con esta conformación, el efecto de sustituyente que estamos evaluando se debe esencialmente al efecto inductivo,<sup>49</sup> por lo que pudimos establecer una relación lineal de  $\sigma_I$  (constante que mide

el efecto inductivo de los sustituyentes) con los desplazamientos de los potenciales. (Figura 3.22)

Esto confirma el efecto dador que ejerce el anillo dihidropiridínico sobre el nitrofurilo, efecto que a su vez se ve disminuido por la presencia de grupos fuertemente aceptores de electrones en las posiciones C-3 y C-5.

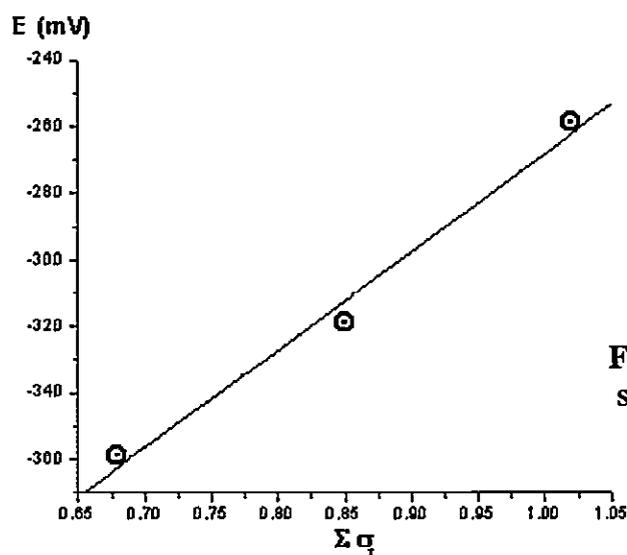
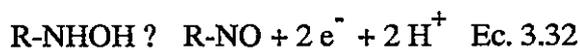


Figura 3.22. Efecto de sustituyente sobre los potenciales de reducción

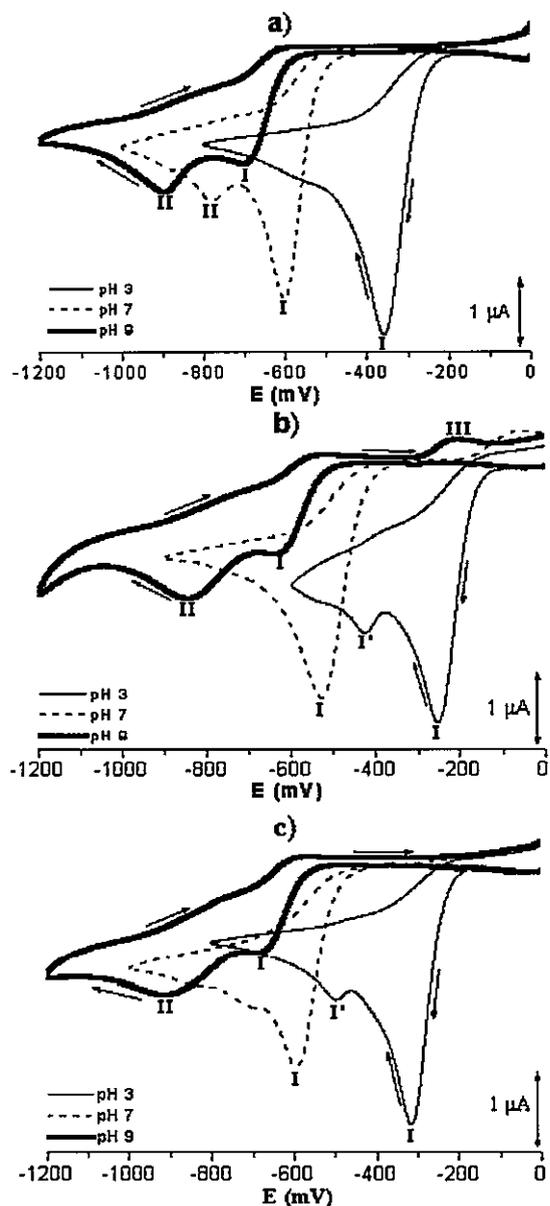
Por otro lado, en el laboratorio de bioelectroquímica se han determinado los potenciales de reducción de 4-nitrofenil-1,4-dihidropiridinas comerciales (Nifedipino, Nisoldipino, Nicardipino y otros).<sup>50</sup> Se observaron potenciales en el intervalo de -694 y -928 mV para estos compuestos (pH = 7, contra un electrodo de Ag/AgCl en KCl saturado). Estos valores han sido fuertemente influenciados por los diferentes sustituyentes ésteres en las posiciones C-3 y C-5 del anillo dihidropiridínico, pero sobre todo por la posición del grupo nitro en el anillo aromático. Donde los meta-nitro derivados presentaron potenciales menos negativos con respecto a los orto-nitro derivados. Como podemos apreciar, la presencia del grupo furilo con relación al fenilo favoreció la electro-reducción del grupo nitro en derivados dihidropiridínicos. Existe una diferencia superior a 200 mV en los potenciales de reducción entre ambos sustituyentes.

Para recabar mayor información sobre la electro-reducción de estos compuestos, se llevaron a cabo experimentos mediante voltamperometría cíclica. Un pico principal (I) irreversible correspondiente a la reducción del grupo nitro a la hidroxilamina fue observado a pH 3 y 7. (Figura 3.23). FDHP2, a pH 7, en el barrido de vuelta, presentó una señal de oxidación (III) que, según fuentes bibliográficas,<sup>51</sup> corresponde a la oxidación de la hidroxilamina formada, mediante la siguiente ecuación:



Los voltamperogramas cíclicos de FDHP2 y FDHP3, a pH 3, exhibieron una segunda señal de reducción de menor intensidad (I'), a valores más negativos, que corresponde según lo expusimos en la Ec. 3.27 a la reducción de la hidroxilamina a la amina derivada.

Los potenciales de pico en los voltamperogramas cíclicos, al igual que los polarogramas TAST y de pulso diferencial, fueron desplazados a valores más negativos con el incremento del pH, pero, este desplazamiento también va acompañado de un desdoblamiento de la señal, como se observa en los voltamperogramas a pH 9.



**Figura 3.23.** Voltamperogramas cíclicos de los compuestos a) FDHP1, b) FDHP2, c) FDHP3, a pHs 3, 7 y 9 (0.1 V/s)

También, se estudió la influencia de la velocidad de barrido en las intensidades de corriente y en los potenciales de pico. Se registraron voltamperogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido (0,1-10 V/s) a pH 3, 7 y 9.

A pH 3 y 7, se observó que existe una relación lineal entre el logaritmo de la intensidad de pico ( $\log i_p$ ) y el logaritmo de la velocidad de barrido ( $\log v$ ). (Figura 3.24.a)

Todas las rectas exhibieron pendientes en el intervalo de 0,44- 0,59, lo cual indica que el proceso es controlado por difusión. También se encontró una dependencia del potencial de pico con  $\log v$ . (Figura 3.24.b) Esta última observación es una característica de procesos irreversibles. Las pendientes de los gráficos  $E_p$  versus  $\log v$ , a pH = 3, presentaron los siguientes valores: 0,069; 0,055 y 0,070, para los compuestos FDHP1, FDHP2 y FDHP3, respectivamente.

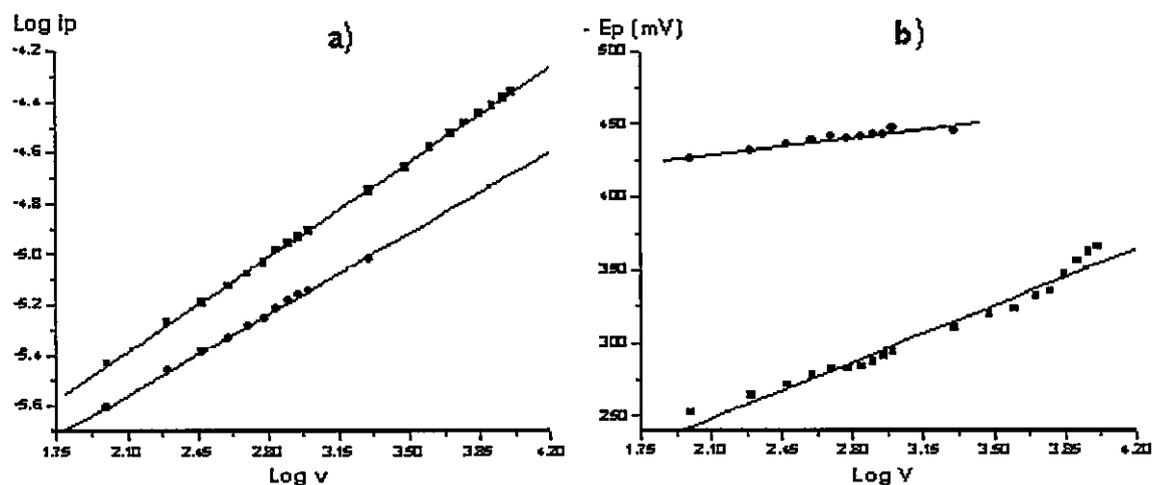
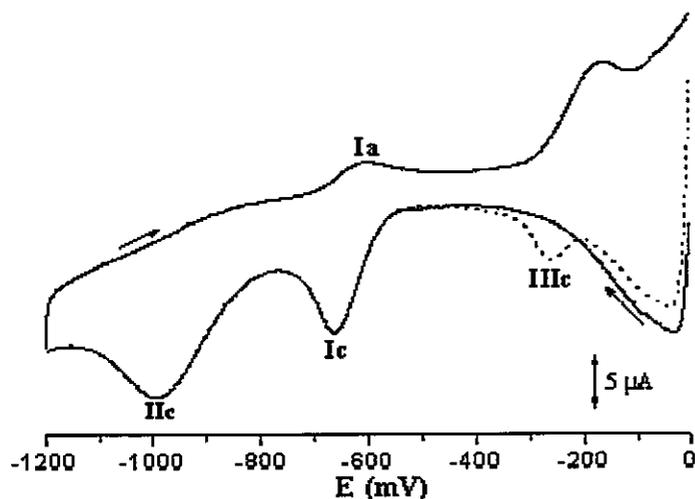


Figura 3.24.a) Evolución de  $\log i_p$  frente a  $\log v$ ; b) Dependencia del potencial de reducción con  $\log v$ . (FDHP2, pH 3)

A pH 9, la situación es un poco más compleja. El desdoblamiento de la señal principal se acentúa con el incremento de la velocidad de barrido, se observa una mayor separación de las señales  $I_c$  y  $I_{lc}$  de la Figura 3.25, y por lo mismo, la primera señal presenta un pico de oxidación en el barrido de vuelta ( $I_a$ ). Además, los voltamperogramas de FDHP3 en un segundo barrido a altas velocidades presentó una señal de reducción ( $IIIc$ ) a valores cercanos

a  $-250$  mV(IIIc), la cual es atribuida a la reducción del nitroso derivado a la hidroxilamina mediante la transferencia de 2 electrones y 2 protones, es el sentido inverso de la reacción presentada en la ecuación 3.32.<sup>51,52</sup>

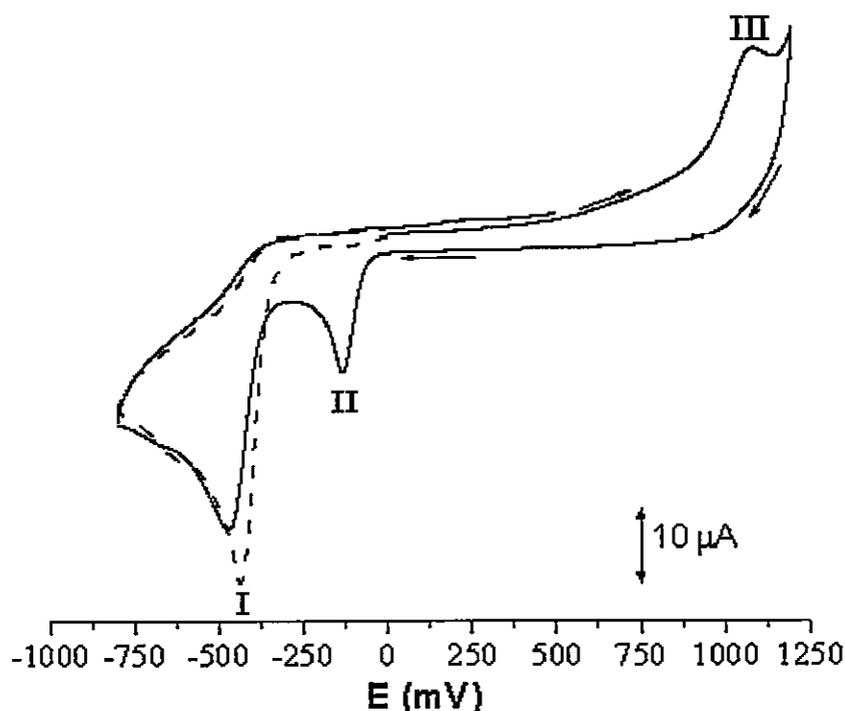


**Figura 3.25.** Voltamperograma cíclico de FDHP3 a pH 9 (10V/s)

En los tres compuestos, los gráficos de  $\log i_p$  versus  $\log v$  exhibieron pendientes cercanas a 0,5 para los picos de reducción I y II, valores en el intervalo de 0,48 a 0,53. Sin embargo, es posible advertir una fuerte adsorción a partir de los valores de las pendientes de los picos de oxidación y de la señal IIIc (FDHP3), 0,80-1,11. Por otro lado, únicamente el potencial del pico IIc presenta dependencia con  $\log v$ . Esto indica que el par redox Ic/Ia es reversible y que la señal IIc es irreversible. Las señales Ic/Ia corresponderían a la formación del anión radical nitro, por transferencia reversible de un electrón, y la señal IIc, a la posterior reducción del anión radical nitro hasta la hidroxilamina correspondiente. Este mecanismo será expuesto con mayor detenimiento, cuando abordemos el proceso de electro-reducción del grupo nitro en medio mixto y medio aprótico.

Para complementar la caracterización electroquímica en medio prótico registramos voltamperogramas cíclicos a pH 3, empleando un electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo. (Figura 3.26). La amplia ventana de potencial de este electrodo (1,3 a  $-0,8$  V aproximadamente)<sup>53</sup> nos ha permitido observar las señales correspondientes a la oxidación del anillo dihidropiridínico y a la reducción del grupo nitro en un solo voltamperograma. Un barrido hacia potenciales positivos nos permite observar la señal de oxidación del fragmento

dihidropiridínico a la piridina (I). Sin embargo, el barrido de vuelta y en sentido de la reducción, pone en evidencia dos señales correspondientes a la reducción del grupo nitro. Cuando el voltamperograma es registrado sólo hacia potenciales negativos (líneas segmentadas), una única señal de reducción se observa (III), esto indica que la señal II corresponde a la reducción del grupo nitro del derivado piridínico, previamente formado.



**Figura 3.26.** Voltamperogramas cíclicos de FDHP2, a pH 3, 0.1 V/s.

Este experimento no sólo demuestra la versatilidad de la técnica para estudiar simultáneamente procesos de oxidación y reducción, sino que, además, pone en evidencia que la reducción del grupo nitro del derivado piridínico ocurre a potenciales menos negativos. Existe una diferencia de aproximadamente 300 mV con respecto al derivado dihidropiridínico. La aromatización de la dihidropiridina cambia la conformación de la molécula. La piridina a diferencia de la dihidropiridina presenta una estructura plana. Tienen una energía de estabilización por resonancia de 21 kcal/mol. Asimismo, la aromatización en la piridina permite una mayor deslocalización de la densidad electrónica sobre el átomo de nitrógeno electronegativo, ocasionando una deficiencia en los átomos de carbono del anillo. Este último

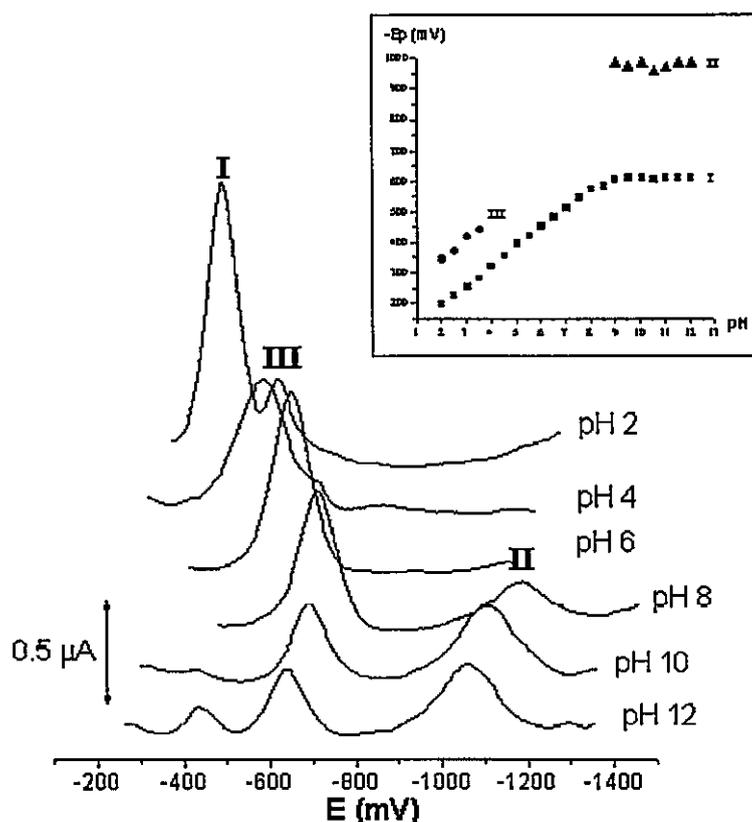
hecho se ve reflejado en su momento dipolar (2,26 D), que es apreciablemente mayor que el de la piperidina (1,17 D).<sup>54</sup> Además, otro factor importante es el cambio de hibridación del carbono en la posición C-4 del anillo, el carácter  $sp^2$  presenta mayor electronegatividad que el  $sp^3$ . Los orbitales s tienen una electronegatividad de 29,9 eV, mientras que los orbitales p tienen una electronegatividad de sólo 11,6 eV. Esto se atribuye a una mejor penetración del resto electrónico por los electrones 2s, mucho mayor que los 2p. Por lo tanto las electronegatividades varían con el tipo de híbrido, esto es, el carácter relativo s o p del mismo.

Con respecto al comportamiento electroquímico de FDHP1, FDHP2 y FDH3 en medio prótico, podemos concluir que a  $pH = 10$ , la conversión de nitro/hidroxilamina por transferencia de 4 protones y 4 electrones generó una única señal de reducción. Mediante voltamperometría cíclica determinamos el carácter irreversible de esta señal. En algunos casos, a  $pH < 4$ , la hidroxilamina se redujo hasta la amina correspondiente a potenciales más negativos. Tanto la formación de la hidroxilamina como de la amina fueron dependientes del cambio de pH.

Aunque, a  $pH = 9$ , a altas velocidades de barrido, los voltamperogramas cíclicos insinuaron la presencia del par redox del anión radical nitro ( $RNO_2/RNO_2^-$ ), este sistema no es el más adecuado para realizar un estudio exhaustivo del mismo.

### 3.3.2. Medio Mixto

El comportamiento electroquímico en medio mixto fue evaluado mediante técnicas polarográficas (PPD y PT), voltamperométricas (VC) y coulombimétricas. Los polarogramas de pulso diferencial presentaron un solo pico de reducción principal en el intervalo de pH 2 a 8, en los compuestos estudiados. Como fue observado en el medio prótico, esta señal correspondiente a la reducción del grupo nitro mediante la ecuación 3.26, es desplazada hacia valores más negativos con el incremento del pH. FDHP2 y FDHP3 presentaron una segunda señal de menor intensidad, muy próxima a la señal principal, la cual correspondería a la reducción de la hidroxilamina a la amina derivada. A pH básico, pH > 8, se observa la presencia de dos señales, cuyos potenciales de pico se mantienen independientes con el cambio de pH. (Figura 3.27)

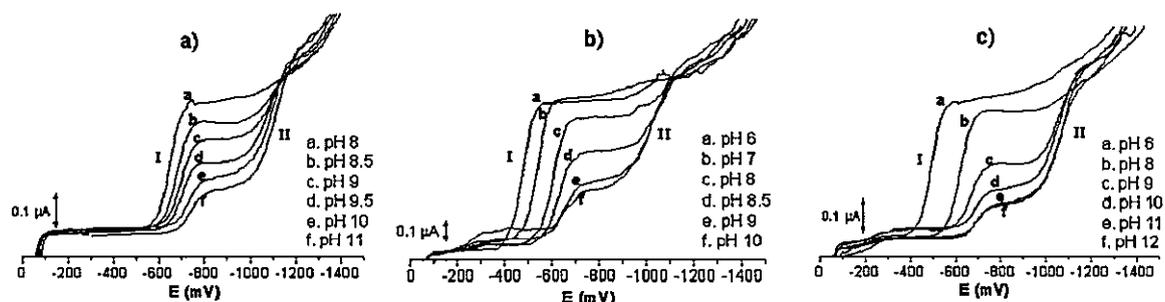


**Figura 3.27.** Polarogramas de pulso diferencial de FDHP2 a diferentes valores de pH. En recuadro: Evolución de los potenciales de pico con el pH.

Como fue mencionado en la sección 3.3.1, el gráfico del potencial de pico en función del pH de la señal principal presenta dos segmentos lineales, cuyas pendientes corresponden a  $dE_p/dpH = 0.060$ ,  $0.064$  y  $0.064$  V/pH y  $dE_p/dpH \approx 0$ , para FDHP1, FDHP2 y FDHP3, respectivamente.

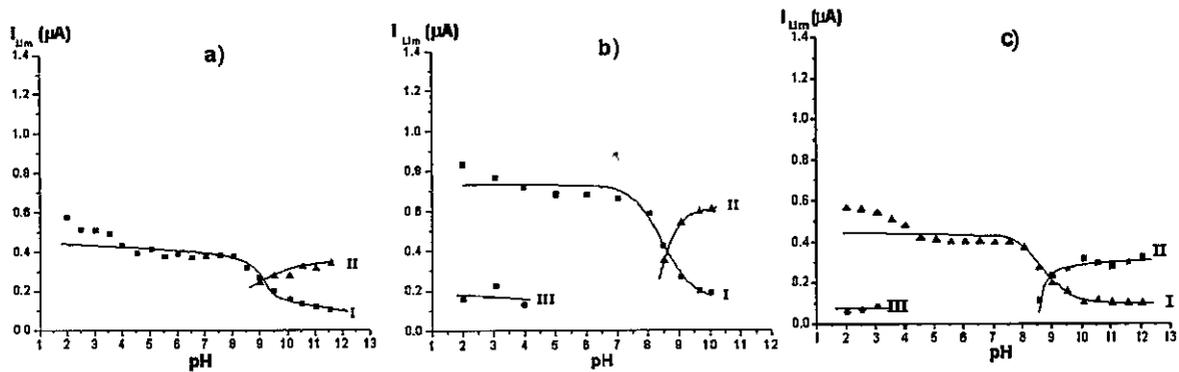
El efecto del pH sobre la corriente fue evaluado empleando polarografía TAST. La principal ventaja de esta técnica para estudios que involucran medidas de corriente con respecto a la polarografía de pulso diferencial radica en que la corriente límite obtenida mediante PT, depende únicamente del número de electrones transferidos, de la concentración de la especie electroactiva, del coeficiente de difusión y del tamaño del electrodo, como se expresa en la ecuación de Ilkovic. (Ec. 3.31) Sin embargo, la corriente de pico en PPD depende de todos estos factores, pero adicionalmente, depende de la constante de velocidad del proceso del electrodo y del coeficiente de transferencia. Esta mayor complejidad deriva en una mayor dificultad para interpretar los efectos de cambios de pH sobre las corrientes de pico.<sup>55</sup>

Los polarogramas TAST que se muestran en la figura 3.28, demuestran claramente que la misma señal principal, observada en medio acuoso, correspondiente a la transferencia de 4 electrones, se desdobra a pH básico.



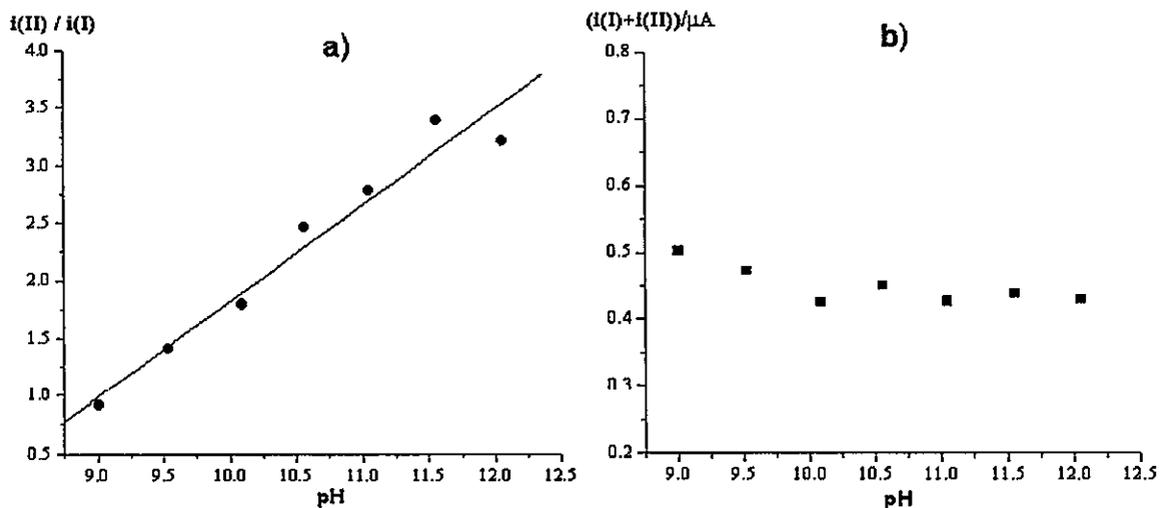
**Figura 3.28.** Polarogramas TAST a diferentes valores de pH de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

El desdoblamiento de la señal ocurre a valores de  $pH > 8$ , donde la altura de la onda (I) decrece con el incremento del pH, en forma de una curva de disociación. Paralelamente, a potenciales más negativos una segunda onda (II) crece. (Figura 3.29)



**Figura 3.29.** Dependencia de la corriente límite con el pH de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

A valores de pH suficientemente altos, la altura de la primera onda se reduce a un valor correspondiente a la reducción de un electrón, mientras que la segunda onda alcanza un valor equivalente a la transferencia de 3 electrones, como lo demuestra la relación entre las corrientes límites de ambas señales,  $i(\text{II})/i(\text{I})$ . (Figura 3.30.a)



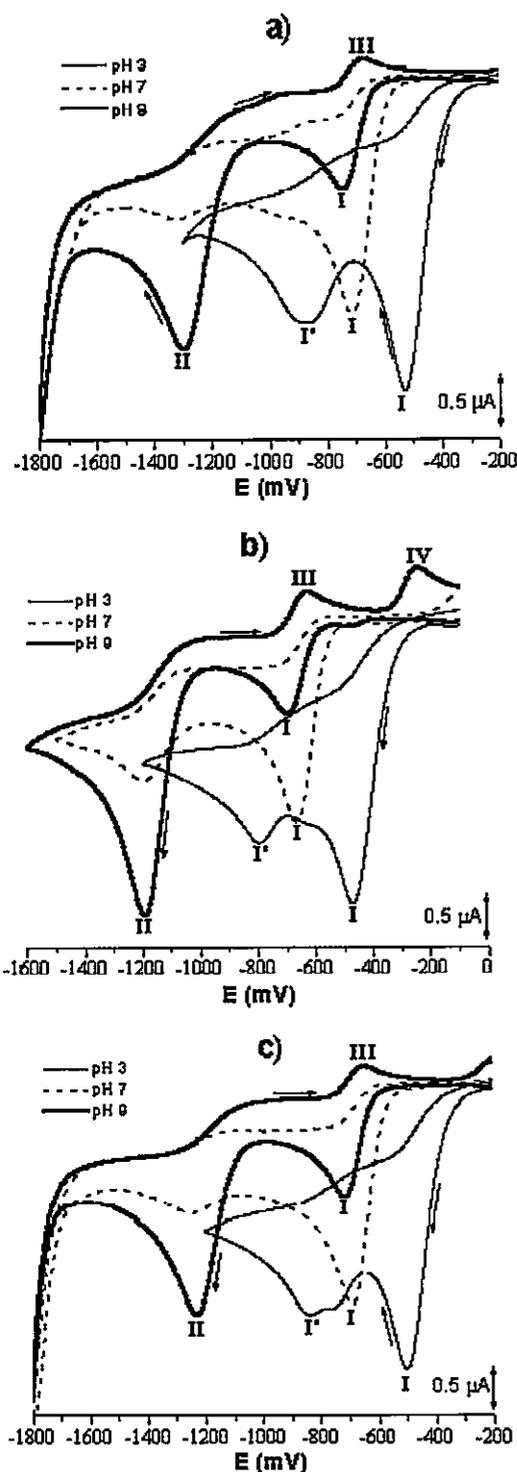
**Figura 3.30.** a) Incremento en la relación  $i(\text{II})/i(\text{I})$  con el aumento del pH y b) Dependencia de la sumatoria de  $i_{\text{Lim}}$  de las ondas I y II con el pH, del compuesto FDHP1

La suma de las intensidades de corriente de las ondas I y II queda constante como se puede apreciar en la **Figura 3.30.b**. El proceso global corresponde a la transferencia de cuatro electrones.

Con respecto al orden de reactividad en este medio, es el mismo que fue encontrado en medio acuoso, los potenciales de media onda a pH 3, 7 y 10 se exponen en la **tabla 3.10**. Además, se pudo determinar mediante coulombimetría, a pH 7, que el número de electrones totales transferidos en el proceso de electro-reducción es 4.

**Tabla 3.10.** Potenciales de media onda y número de electrones transferidos a pH 7

<b>Compuestos</b>	$-E_{1/2}$ (mV) pH 3	$-E_{1/2}$ (mV) pH 7	$-E_{1/2}$ (mV) pH 10	Nro de electrones pH 7
FDHP1	330	574	720	$3.8 \pm 0.2$
FDHP2	248	504	652	$4.2 \pm 0.2$
FDHP3	306	554	690	$3.9 \pm 0.2$



**Figura 3.31.** Voltamperogramas cíclicos de los compuestos: a) FDHP1, b) FDHP2, c) FDHP3, a pHs 3, 7 y 9 (0.1 V/s)

Los experimentos llevados a cabo empleando voltamperometría cíclica revelaron que la mayor diferencia con respecto al medio acuoso se presenta en los voltamperogramas a pH 9, donde es posible observar la presencia del par redox reversible del anión radical nitro (I/III), la cual no existía o no se encontraba bien resuelta en el medio prótico. (Figura 3.31)

La segunda señal de reducción irreversible (II), que aparece a potenciales más negativos, se debe a la posterior reducción del anión radical nitro para formar el derivado hidroxilamínico.

De esta observación podemos inferir que el medio mixto es adecuado para realizar caracterizaciones cinéticas del anión radical nitro, que como ya fue mencionado constituye uno de los objetivos principales en el desarrollo de esta tesis, y cuyo análisis será abordado en la siguiente sección.

El análisis logarítmico de la corriente de reducción y de la velocidad de barrido (0.1-10V/s) presentó una relación lineal entre ambos parámetros. Las pendientes encontradas fueron 0,38 a 0,47, a pH 3; 0,39 a 0,54, a pH 7 y de 0,45 a 0,50, a pH 9.

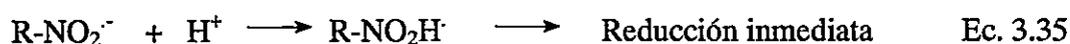
Con respecto al mecanismo de electro-

reducción de nitro derivados, Tocher y Edwards indican que la primera señal de reducción corresponde a una reducción monoelectrónica con formación del anión radical nitro en un proceso reversible, según la ecuación 3.33 y atribuyen la segunda señal a la posterior reducción del anión radical nitro a la hidroxilamina.<sup>21</sup> (Ec.3.34)



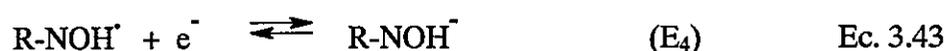
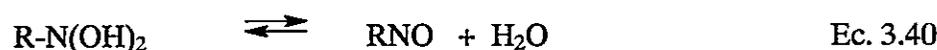
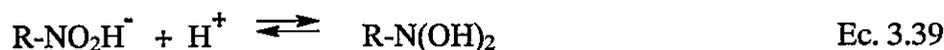
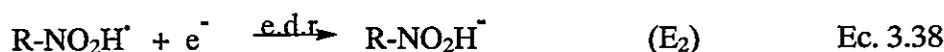
De este modo, a pH básico, el proceso de reducción del grupo nitro, consta de dos secuencias de transferencia electrónica claramente diferenciadas, cuyos potenciales de reducción se mantienen independientes al cambio de pH. Sin embargo, a  $2 < \text{pH} < 8$ , hemos observado una sola señal correspondiente a la reducción del grupo nitro al derivado hidroxilamínico por transferencia de 4 protones y 4 electrones, además, los potenciales son desplazados hacia valores más negativos con el incremento del pH.

Este cambio en la respuesta electroquímica por efecto del pH puede ser explicado considerando que, a bajos valores de pH, la reacción de protonación del anión radical nitro es favorecida, así, después de la formación del radical nitro, éste inmediatamente sufre la transferencia de los otros electrones, generando la hidroxilamina correspondiente y por lo tanto sólo es posible observar una única señal de reducción para este proceso. (Ec. 3.35)

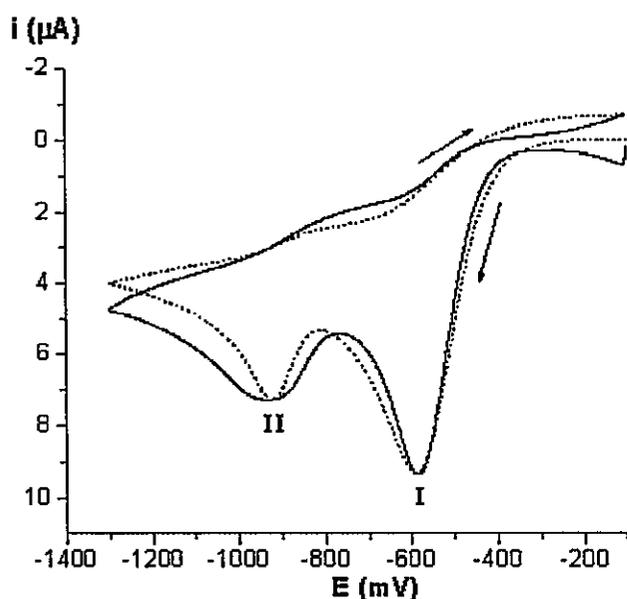


A pH básico, la velocidad de la reacción de protonación del anión radical nitro es prácticamente despreciable.<sup>18,56</sup> La velocidad de transferencia del segundo electrón al anión radical nitro decrece lo suficientemente para producir una onda separada a potenciales más negativos. Esto permite que la formación de la hidroxilamina ocurra en una etapa de un electrón seguido por un proceso de tres electrones a potenciales más negativos.

Sobre la base de estas aseveraciones hemos postulado un mecanismo para la electroreducción de los compuestos FDHP1, FDHP2 y FDHP3, a  $2 < \text{pH} < 9$ . La reacción global de la reducción nitro/hidroxilamina de la ecuación 3.26 se desglosa en una secuencia de 9 etapas de transferencia de electrones y protones.



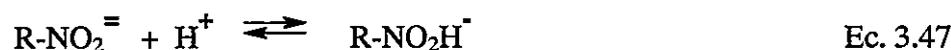
La secuencia EQEQEQEQEQ fue empleada para realizar la simulación de la señal I del voltamperograma cíclico en la **figura 3.32**. La simulación se efectuó mediante el programa DIGISIM<sup>®</sup>.



**Figura 3.32.** Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental (—) del compuesto FDHP1, a pH 3.

El proceso de simulación nos permitió determinar que la secuencia de reacciones propuesta fue capaz de generar la señal de reducción I similar a la experimental, indicando que el mecanismo sugerido constituye una alternativa probable para describir el proceso de electro-reducción. Las acotaciones más resaltantes con respecto al proceso de simulación se refieren a que las dos últimas transferencias electrónicas ( $E_3 \approx E_4 \approx -0,100 \text{ V}$ ) ocurren a potenciales menos negativos que las dos primeras ( $E_1 \approx -0,210 \text{ V}$  y  $E_2 \approx -0,250$ ). Como fue mencionado, este hecho explica la presencia de una única señal de reducción (I) correspondiente a la transferencia de 4 electrones. La dependencia del potencial de reducción con el pH se puede explicar considerando la segunda transferencia electrónica como la etapa determinante de la reacción. La reacción de protonación del anión radical nitro (Ec. 3.37), previa a la e.d.r, es la responsable del desplazamiento de los potenciales de reducción hacia valores más negativos con el incremento del pH.

Evidentemente, el desdoblamiento de la única señal de la electro-reducción del grupo nitro a  $\text{pH} > 9$  se debe a un cambio en el mecanismo.



Siguiendo el mismo procedimiento descrito arriba, hemos realizado la simulación de un voltamperograma cíclico a pH = 9. (Figura 3.33) Empleando la secuencia EEOQEQEQ (Ec. 3.45- Ec. 3.52) obtuvimos un voltamperograma cíclico muy similar al experimental.

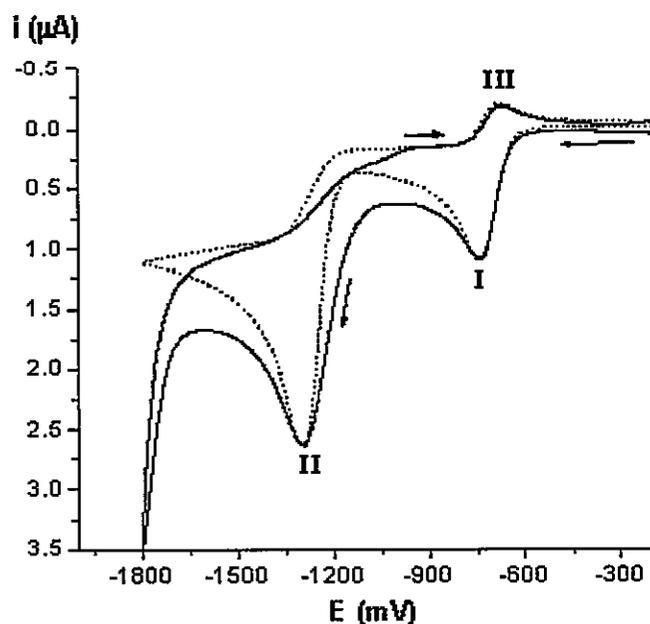


Figura 3.33. Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental (—) del compuesto FDHP1, a pH 9.

Un importante cambio en el mecanismo de electro-reducción constituye la ausencia de la reacción de protonación del anión radical nitro, la cual se hace despreciable debido a la escasez de iones  $H^+$  en el medio, esto explica porque a  $pH > 9$   $dE_p/dpH = 0$ . El anión radical nitro se reduce a dianión nitro (Ec. 3.46). Esta segunda transferencia electrónica, por tratarse de la reducción de una especie cargada negativamente, ocurre a un potencial más negativo ( $E_1 = -0,758$  V,  $E_2 = -1,135$  V).  $E_2$  es aproximadamente 370 mV más negativo que  $E_1$ . Esta diferencia entre los potenciales de reducción es suficiente para generar una separación en las señales voltamperométricas. Donde la primera señal, como ya fue mencionado, corresponde a la formación del anión radical nitro por transferencia de un electrón y la segunda a la posterior reducción del anión radical nitro hasta la hidroxilamina. Como veremos en la siguiente sección, la primera transferencia electrónica (Ec. 3.45) va acompañada de una reacción de dismutación que da cuenta del decaimiento del anión radical nitro. Esta reacción así como la protonación del anión radical nitro influyen considerablemente sobre la intensidad de la señal de oxidación del anión radical nitro, III, en el barrido inverso. Por lo

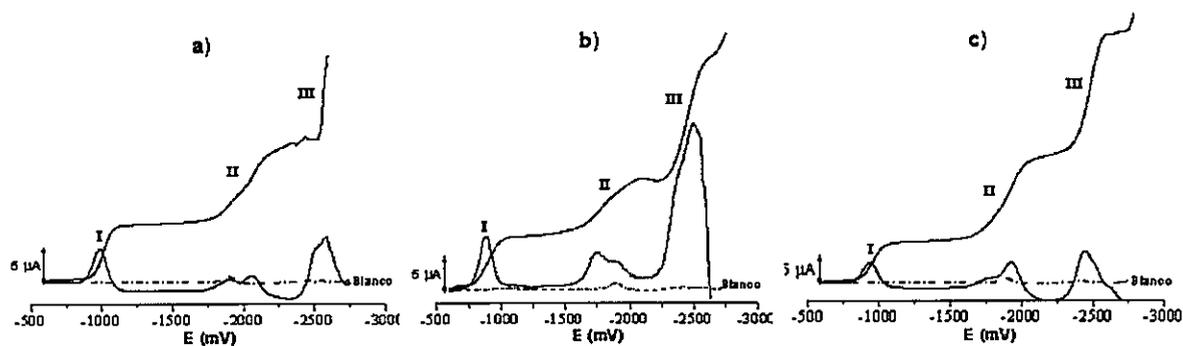
cual tuvieron que ser considerados en la simulación del voltamperograma cíclico. El decaimiento del anión radical nitro será abordado con mayor detenimiento en la sección 3.4.

En resumen, en medio mixto, a  $\text{pH} < 9$ , se observó una sola señal correspondiente a la reducción del grupo nitro a la hidroxilamina por la transferencia de 4 electrones y 4 protones. Sin embargo, a  $\text{pH}$  más básico, se observaron dos señales de reducción: la primera que da cuenta de la formación del anión radical nitro por la transferencia reversible de un electrón y la segunda, que se observa a potenciales más negativos, correspondiente a la reducción del anión radical nitro, para formar el derivado hidroxilamínico.

### 3.3.3. Medio Aprótico

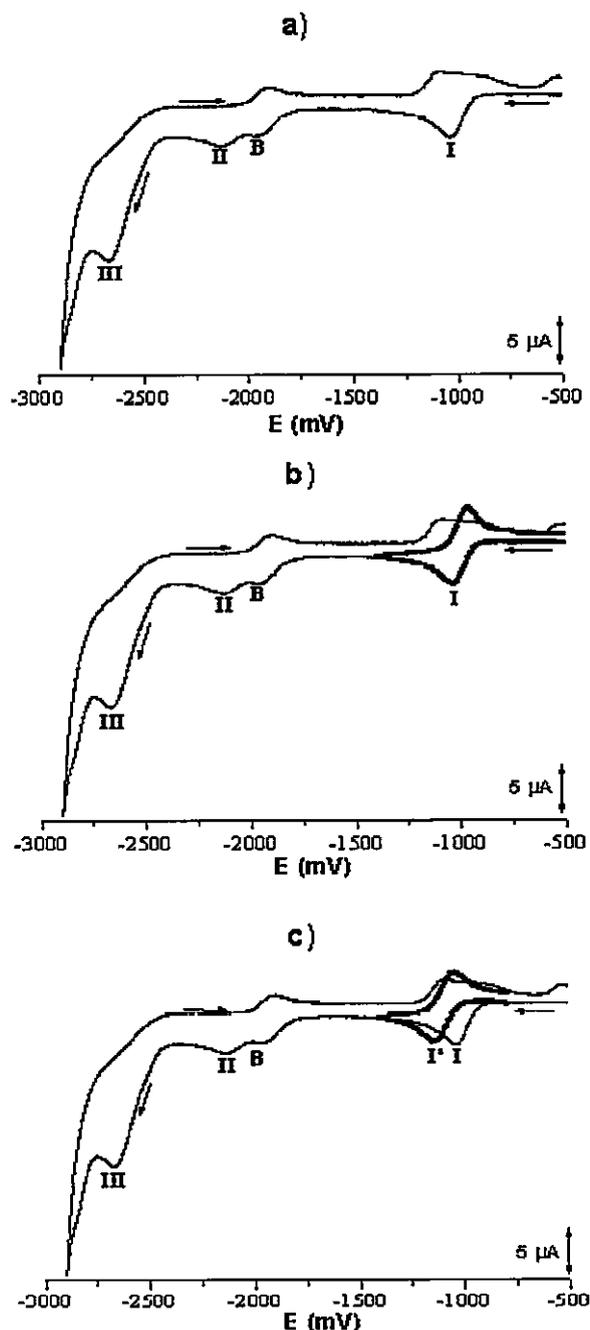
Los experimentos llevados a cabo en medio aprótico son buenos modelos de procesos biológicos en el entorno de las membranas celulares, las cuales están constituidas en una alta proporción de una bicapa lipídica, donde tienen lugar procesos de peroxidación mediados por radicales libres. Estos últimos son inestables en medio acuoso, debido a que experimentan rápidos procesos de dismutación.

El comportamiento electroquímico de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, en medio aprótico, fue evaluado mediante polarografía TAST y de pulso diferencial. En estas condiciones los polarogramas presentaron tres señales de reducción como puede observarse en la **Figura 3.34**. La primera señal es atribuida a la reducción monoeléctronica del grupo nitro, generando el anión radical.



**Figura 3.34.** Polarogramas TAST y de pulso diferencial de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

Con el fin de obtener mayor información con respecto al proceso electroquímico en este



**Figura 3.35.** Voltamperogramas cíclicos de FDHP1 en medio aprótico.

medio, se llevaron a cabo experimentos mediante voltamperometría cíclica. Un barrido con una ventana de potencial de -500 a -3000 mV reveló la presencia del par redox reversible (**I**) y dos picos irreversibles (**II** y **III**), como se observa en la **Figura 3.35.a**. El par redox **B** corresponde a la reducción de trazas de impurezas contenidas en el electrolito soporte.

Se puede apreciar que el pico **I** presenta una señal de oxidación bastante ensanchada en el barrido de vuelta, la presencia del par redox del anión radical nitro ( $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$ ) no se puede establecer con claridad. Sin embargo, al realizar un barrido con una ventana de potencial más pequeña, para aislar esta señal, se observa un par redox reversible bien definido. (**Figura 3.35.b**). Este hecho pone de manifiesto que el pico de oxidación involucra no sólo al anión radical nitro, sino que, además, incluye la oxidación de otra especie involucrada en el proceso de reducción. Esta especie es el anión radical nitro del anión dihidropiridínico, cuya formación es posible debido al carácter débilmente ácido del anillo dihidropiridínico y la ausencia de protones en el medio. Este hecho fue confirmado, generando la especie aniónica por adición de

base, la cual presenta, en el voltamperograma cíclico, una señal reversible (I') muy próxima a la señal correspondiente a la reducción de la especie neutra. (Figura 3.35.c)

Una reacción intermolecular del tipo ácido-base, entre el anión radical nitro y el protón dihidropiridínico, puede generar el radical nitro,  $\text{RNO}_2\text{H}^\cdot$ , que a su vez es reducido a potenciales más negativos, pico II.

Baumane y colaboradores<sup>57</sup> han determinado, estudiando el comportamiento electroquímico de 4-nitrofenil-1,4-DHPs en medio aprótico, que el pico III, puede deberse a la reducción del anión radical nitro hasta la hidroxilamina correspondiente, o si la concentración de protones es insuficiente al derivado dianión nitroso, donde el electrolito soporte, perclorato de tetrabutilamonio, podría estar involucrado en el proceso. (Ec. 3.53)



De todo lo expuesto en esta sección podemos concluir que la respuesta electroquímica de los compuestos estudiados es fuertemente dependiente del medio electrolítico. Diferentes comportamientos hemos observado en medio prótico, mixto y aprótico. En estos dos últimos sistemas de disolventes, fue posible observar la señal correspondiente a la reducción monoelectrónica del grupo nitro, este proceso será estudiado más adelante.

### 3.4. Estudio de estabilidad e interacción del anión radical nitro

El mecanismo de acción de ciertas drogas nitroaromáticas, comercialmente empleadas como antibacterianas y antiprotozoarias, tales como metronidazol, nifurtimox, nitrofurantoina, entre otros, está relacionado a la generación de especies radicalarias reactivas producto de la reducción metabólica del grupo nitro presente en sus moléculas. En los mamíferos, la interacción de varios compuestos bioquímicos y enzimas, entre ellos  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión reducido (GSH), superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa previenen los efectos tóxicos mediados por radicales libres (peroxidación de lípidos, alteraciones enzimáticas, daños en membrana, entre otros). Sin embargo, algunos parásitos entre ellos el *Trypanosoma cruzi* poseen un mecanismo de defensa ineficiente contra daños por injuria de radicales. Por ejemplo, la enzima glutatión reductasa se encuentra en menor concentración en cepas de *T. cruzi* que en hígado de rata, además, requiere la presencia de un cofactor (denominado tripanotión) para ejercer su acción enzimática. Asimismo, la presencia de  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico no ha sido reportada. Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa dependiente de selenio también están ausentes.

El nifurtimox y el benznidazol son conocidos por su acción tripanocida mediada por generación del anión radical nitro, producido por acción de la enzima NADPH (NADH)-citocromo c reductasa presente en el parásito.<sup>46,75</sup> El anión radical nitro generado por la reducción intracelular del nifurtimox puede activar oxígeno molecular produciendo anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el que a su vez puede producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) espontáneamente o por acción de la enzima superóxido dismutasa. La interacción de  $O_2^{\cdot-}$  con  $H_2O_2$  conduce a la formación de radical hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ), una de las especies radicalarias más reactiva y dañina. Por otro lado, la acción tripanocida del benznidazol no implica la activación de un ciclaje redox, sino la interacción del anión radical nitro y/o de su forma protonada con macromoléculas (proteínas de membranas, ADN).

Tal como fue expresado en la introducción, la actividad citotóxica de los compuestos nitro derivados está relacionada con su afinidad electrónica y particularmente a su habilidad de generar el anión radical nitro. Generalmente, en una serie homóloga el compuesto con

potencial de reducción menos negativo, esto es, el que se reduce más fácilmente, es el más tóxico. Por lo cual, los datos electroquímicos tales como el potencial de reducción, la estabilidad del anión radical nitro y su interacción con otras moléculas de interés biológico son importantes parámetros que darían cuenta de la potencial toxicidad de un compuesto nitro derivado. A continuación, presentamos los resultados concernientes a la formación y estabilidad del anión radical nitro de FDHP1, FDHP2 y FDHP3 en medio mixto y medio aprótico.

### 3.4.1 Estudio de estabilidad del anión radical nitro

#### 3.4.1.1. Medio Mixto

En esta sección estudiaremos el proceso de formación del anión radical nitro derivado de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, mediante la reducción de una disolución conteniendo 1 mM del compuesto en cuestión. Como se ha puesto de manifiesto previamente, en medio mixto, a  $\text{pH} \geq 9$ , es posible generar selectivamente el par redox del anión radical ( $\text{Ic/Ia}$ ), para realizar estudios electroquímicos conducentes a determinar el tipo de proceso electródico y establecer la estabilidad del anión radical nitro. (Figura 3.36)

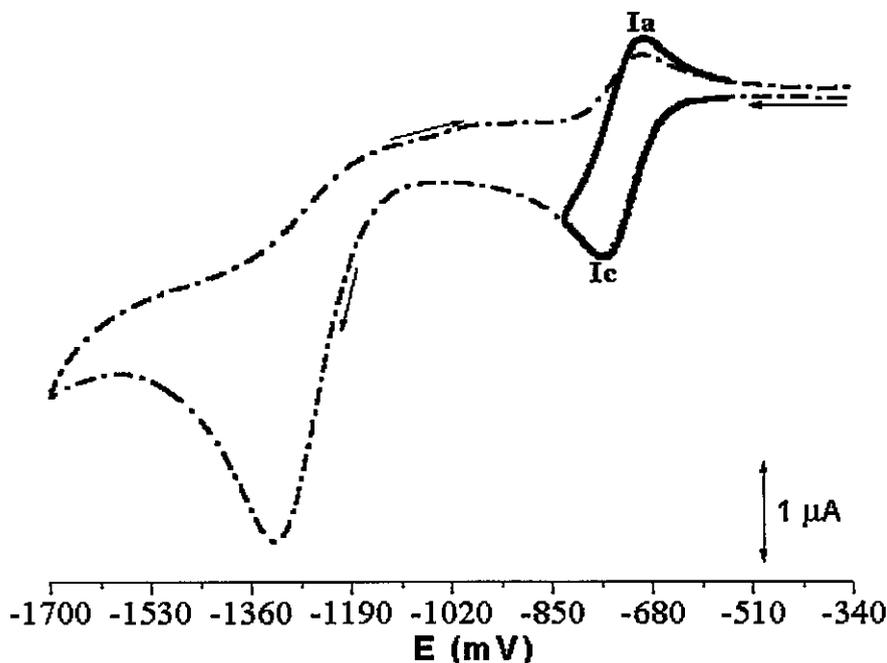
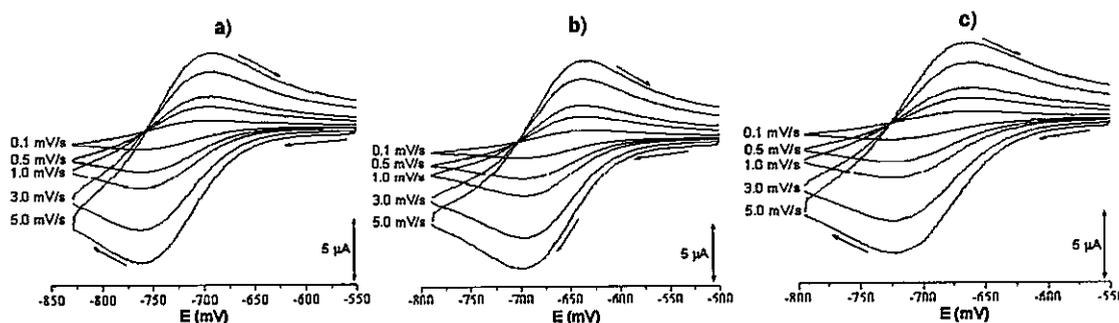


Figura 3.36. Voltamperogramas cíclicos de FDHP1, a pH 9

Para tal efecto, se realizaron barridos con una ventana de potencial más pequeña, el par redox  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$  fue aislado, de manera que la segunda señal no causara ninguna



**Figura 3.37.** Voltamperogramas cíclicos, a diferentes velocidades de barrido, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

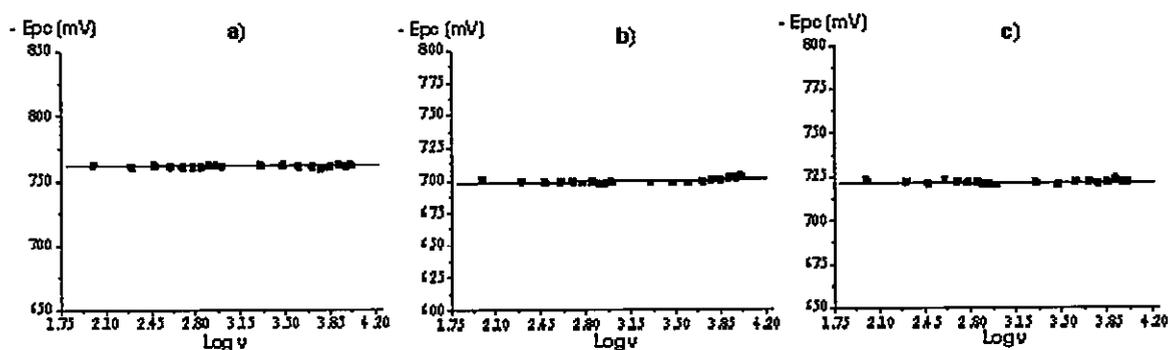
influencia. El potencial de inversión fue seleccionado de tal modo de aplicar correctamente el método de Olmstead y Nicholson.<sup>23</sup> Se registraron voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido (0,1 –10 V/s). (Figura 3.37)

Los valores de  $\Delta E_p$ , determinados a partir de estos voltamperogramas, guardan estrecha relación con el valor teórico de 59 mV, estipulado para la transferencia de un electrón en forma reversible. Asimismo, hemos determinado mediante coulombimetría el número de electrones transferidos en este proceso. Todos estos datos se exponen en la **Tabla 3.11**

**Tabla 3.11.** Valores de  $\Delta E_p$  y número de electrones determinado

Compuestos	$\Delta E_p/\text{mV}$	Nro de electrones
FDHP1	$66 \pm 3$	$1.4 \pm 0.1$
FDHP2	$62 \pm 3$	$1.3 \pm 0.1$
FDHP3	$61 \pm 2$	$1.3 \pm 0.1$

Otra prueba sobre la reversibilidad del proceso de transferencia electrónica consiste en la dependencia del potencial de pico con la velocidad de barrido, como se puede observar en la figura 3.38,  $dE_{pc}/d\log v = 0$ .



**Figura 3.38.** Dependencia del potencial de pico con la velocidad de barrido de:  
a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

El tipo de proceso involucrado en la reducción monoelectrónica del anión radical nitro fue determinado aplicando los criterios de diagnóstico propuestos por Nicholson y Shain.<sup>29</sup> Uno de los parámetros utilizado fue la variación de la relación de corrientes de pico con la velocidad de barrido. Está establecido que, para un sistema totalmente reversible, la razón de corriente se mantiene igual a la unidad, ( $i_{pa}/i_{pc} = 1$ ), independientemente de la velocidad de barrido. Por el contrario, desviaciones de este valor, indican la aparición de algún otro tipo de proceso adicional al electrónico. En el caso de los tres compuestos estudiados, se observó que la razón de corrientes tiende hacia la unidad con el aumento de la velocidad de barrido, esto indica la presencia de una reacción química acoplada a la transferencia electrónica. (Figura 3.39)

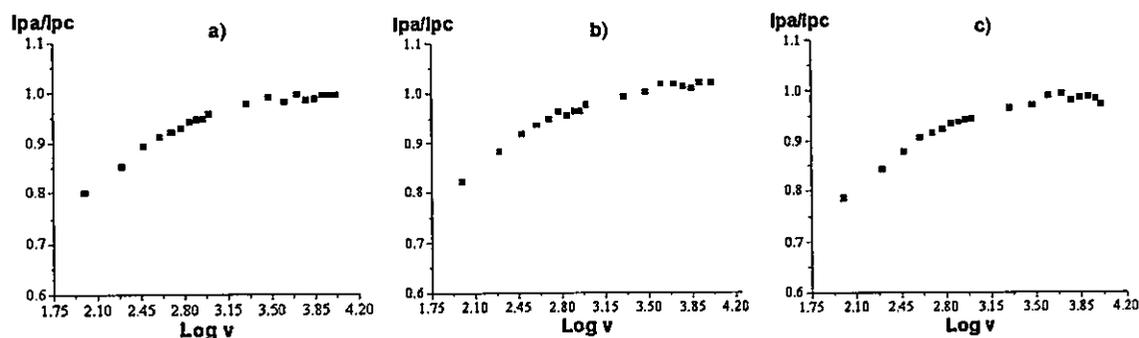


Figura 3.39. Dependencia de  $i_{pa}/i_{pc}$  con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

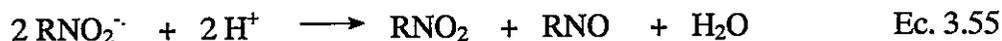
Según los criterios de diagnóstico indicados, un aumento de  $i_{pa}/i_{pc}$  con el incremento de la velocidad de barrido, es indicio de que tras el proceso de transferencia electrónica, transcurre una reacción química irreversible, este tipo de proceso es denotado como un proceso EQi. Este comportamiento puede ser representado por el siguiente mecanismo:



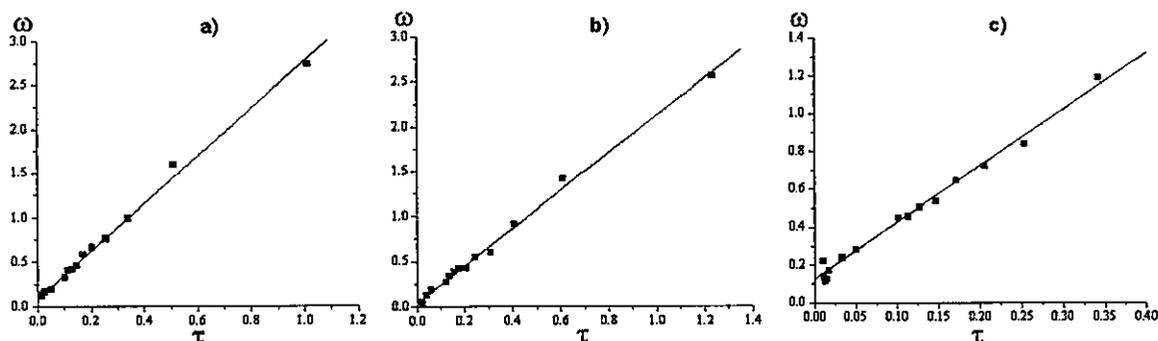
La clave en este tipo de proceso es la variación de la escala de tiempo del experimento. A bajas velocidades de barrido, se da tiempo para que el anión radical nitro, formado en el barrido de ida, reaccione químicamente, antes de oxidarse en el barrido de vuelta. La presencia de la reacción química acoplada, reduce la concentración de la especie disponible para la re-oxidación, originando una corriente de oxidación de menor intensidad.

Sin embargo, el aumento en la velocidad de barrido disminuye la escala de tiempo del experimento y la reacción química acoplada no tiene lugar, por lo tanto, todo el anión radical nitro formado está disponible para ser re-oxidado, en estas condiciones  $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$ .

Wardman, Tocher y Squella<sup>11,19,21</sup> han indicado, que en estas condiciones, el proceso químico asociado a la transferencia electrónica corresponde a una reacción de dismutación de segundo orden, como se indica en la ecuación 3.55.

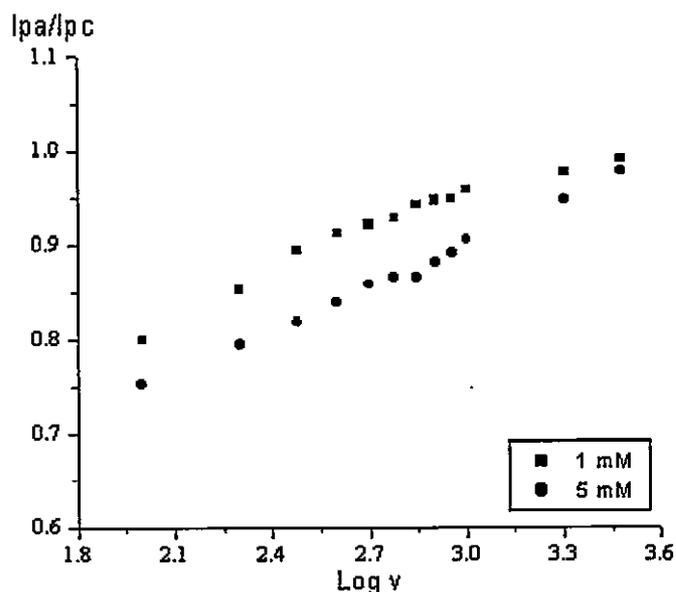


La estabilidad del anión radical nitro está determinada por esta reacción química. Para determinar el orden de reacción, aplicamos el modelo teórico propuesto por Olmstead y colaboradores. Los valores de  $i_{pa}/i_{pc}$  medidos a cada velocidad de barrido fueron incorporados a una curva teórica para determinar el parámetro  $\omega$ , que como fue mencionado lleva incorporado los efectos de constante de velocidad, concentración de la especie electroactiva y velocidad de barrido. Si un gráfico de  $\omega$  versus  $\tau$  resulta en una relación lineal, la pendiente proporciona el valor de la constante cinética de segundo orden. En la **Figura 3.40**, podemos observar una relación lineal entre  $\omega$  y  $\tau$  para los tres compuestos analizados.



**Figura 3.40.** Dependencia de  $\omega$  frente a  $\tau$  de:  
a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

Este hecho confirma que la naturaleza de la reacción química acoplada es la dismutación del radical. Además, la razón de corrientes  $i_{pa}/i_{pc}$  varió significativamente al cambiar la concentración de la especie electroactiva a bajas velocidades de barrido de potencial (0,1- 2 V/s), manteniéndose la tendencia descrita para el mecanismo EQi. (**Figura 3.41**) La variación de  $i_{pa}/i_{pc}$  constituye un criterio de discriminación con respecto al orden de la reacción, indicando que el orden de reacción química asociada es distinto de uno, pero este criterio no indica el orden de la reacción. Sin embargo, en este caso, no contradice los resultados obtenidos aplicando el tratamiento teórico de Olmstead, que indica que la reacción asociada corresponde a una reacción de segundo orden.



**Figura 3.41.** Efecto del cambio de concentración de FDHP1 sobre la razón de corrientes  $i_{pa}/i_{pc}$ .

La constante cinética de segundo orden ( $k_2$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) fueron determinados a partir de las pendientes de  $\omega$  versus  $\tau$ . Estos valores, juntamente con los potenciales de reducción se exhiben en la **tabla 3.12**

**Tabla 3.12.** Valores de  $E_{pc}$ ,  $k_2$  y  $t_{1/2}$

Compuestos	$-E_{pc}$ (mV)	$k_2$ ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)
FDHP1	760	$2689 \pm 172$	$0.37 \pm 0.02$
FDHP2	700	$1947 \pm 133$	$0.51 \pm 0.03$
FDHP3	721	$2863 \pm 107$	$0.35 \pm 0.01$

A pesar de la diferencia energética en la formación del anión radical nitro, manifestados en sus potenciales de reducción, no hay diferencias significativas entre los valores de  $k_2$  y  $t_{1/2}$ . El anión radical nitro de FDHP2 se muestra solo ligeramente más estable. Este hecho puede deberse, como fue mencionado por Núñez-Vergara y colaboradores, a que la reacción de

protonación heterogénea del radical, que da inicio al proceso de dismutación, la cual al ocurrir en la superficie del electrodo muy rápidamente, hace que el decaimiento sea similar para los tres compuestos.<sup>58</sup>

La reacción de protonación como etapa inicial en el proceso que da cuenta del decaimiento natural del anión radical nitro fue confirmada, evaluando el comportamiento de la relación  $i_{pa}/i_{pc}$  con la variación del pH. Con el incremento del pH se produce un aumento en la intensidad del pico de oxidación, debido a un aumento en la concentración de anión radical nitro disponible para ser oxidado en el barrido inverso. Por consiguiente, hay un aumento en la razón de corrientes. (Figura 3.42.a) A partir de los valores de  $i_{pa}/i_{pc}$  se aplicó el método de Olmstead y Nicholson, para establecer la relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$  y finalmente obtener el parámetro cinético de segundo orden.

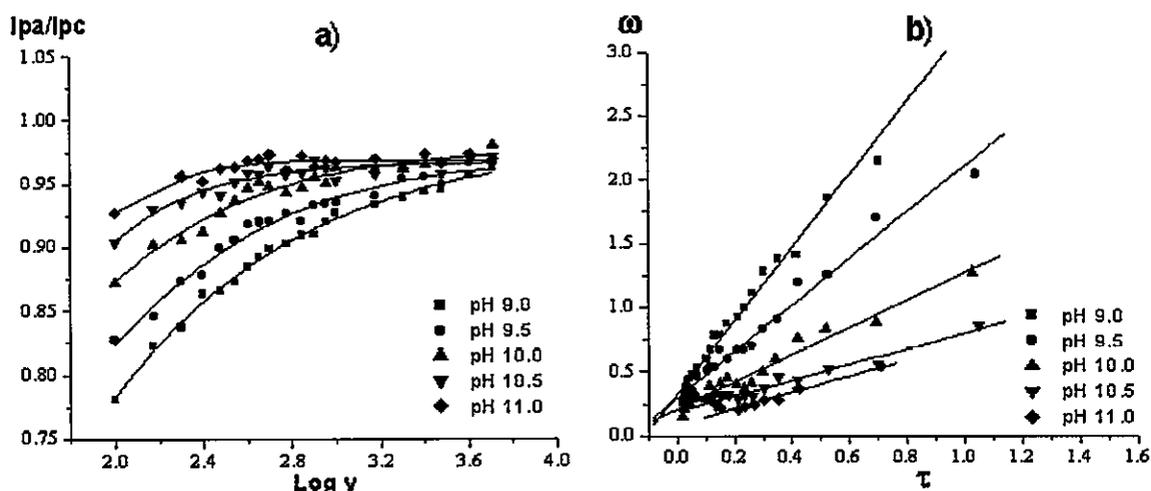


Figura 3.42. a) Dependencia de la razón de corrientes con el logaritmo de la velocidad de barrido a diferentes valores de pH. b) Relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$

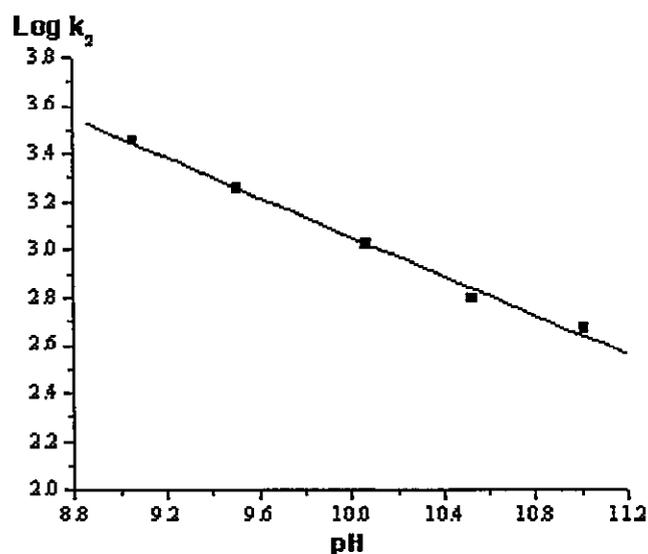
Analizando la Figura 3.42.b, podemos afirmar que la constante de la reacción de dismutación disminuirá conforme aumente el pH, pues se observa un descenso en la pendiente al aumentar la basicidad del medio. Los valores de  $k_2$  y  $t_{1/2}$  calculados se presentan en la tabla 3.13.

**Tabla 3.13.** Valores de  $k_2$  y  $t_{1/2}$  del anión radical nitro derivado de FDHP3

pH	$K_2$ ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)
9.0	2850	0.35
9.5	1810	0.55
10.0	1060	0.94
10.5	630	1.58
11.0	470	2.13

Los valores de  $t_{1/2}$  indican que el anión radical nitro se estabiliza a medida que aumenta el pH del medio. Este hecho confirma, que la menor concentración de protones disponibles en el medio, reduce la constante de velocidad de la reacción de dismutación.

Es posible establecer una relación lineal entre el logaritmo de la constante cinética del proceso de decaimiento natural del anión radical nitro y el pH. (Figura 3.43)

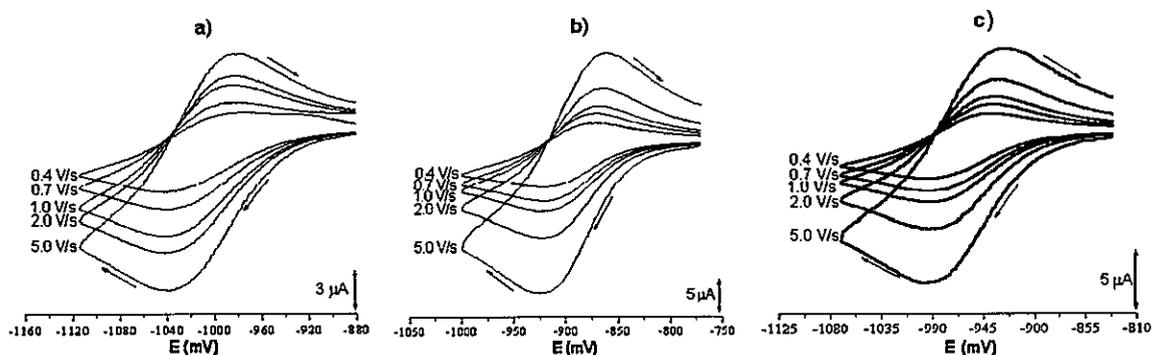


**Figura 3.43.** Dependencia con el pH del logaritmo de la constante cinética del anión radical nitro de FDHP3.

En resumen, el medio mixto ha demostrado ser un sistema adecuado para la caracterización cinética del anión radical nitro, pero no constituye un medio diferenciador en cuanto a afinidad electrónica. Las constantes cinéticas de segundo orden determinadas fueron muy similares a pesar de la diferencia entre los potenciales de reducción de cada compuesto. Finalmente, hay que destacar que el proceso de dismutación que da cuenta del decaimiento natural de la especie radicalaria es dependiente de la concentración de protones, tal y como lo establece la dependencia de  $\log k_2$  con el pH.

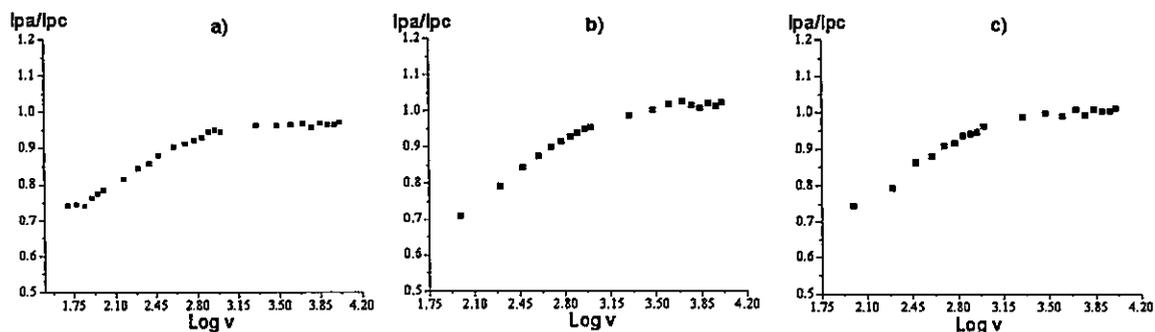
### 3.4.1.2. Medio Aprótico

La formación y estabilidad del anión radical nitro de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, también han sido evaluadas en medio aprótico. Para el efecto, se registraron voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido (0,1 – 10 V/s) sobre disoluciones 1 mM de cada compuesto. (Figura 3.44)



**Figura 3.44.** Voltamperogramas cíclicos, a diferentes velocidades de barrido, de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

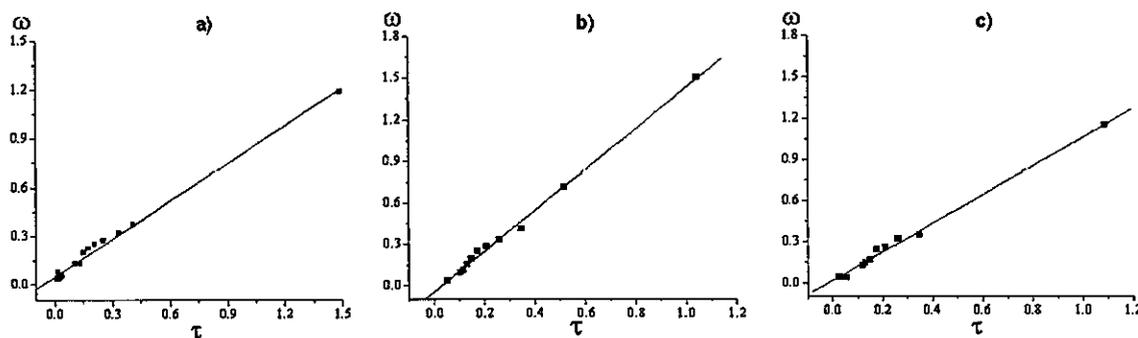
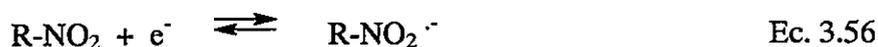
El comportamiento de la razón de corrientes  $i_{pa}/i_{pc}$  con la variación de la velocidad de barrido evidenció, como en el medio mixto, la presencia de una reacción química acoplada a la transferencia electrónica, la cual daría cuenta del decaimiento o descomposición del radical. (Figura 3.45)



**Figura 3.45.** Dependencia de  $i_{pa}/i_{pc}$  con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

La tendencia de la razón de corrientes de incrementarse hasta la unidad con el aumento de la velocidad de barrido confirma que el proceso consiste en una reacción de transferencia electrónica reversible seguido de una reacción química homogénea irreversible, EQi.

Con respecto a la etapa química, estudios previos realizados en un medio totalmente aprótico indican que una reacción de dimerización se ve favorecida con respecto al proceso de dismutación indicado en el medio mixto.<sup>19,59</sup> Por lo cual, hemos empleado la curva teórica de trabajo, propuesta por Olmstead, para determinar constantes cinéticas en reacciones de dimerización. La relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$  confirma que, en este medio electrolítico, el anión radical nitro de los compuestos estudiados decae naturalmente a través de un proceso de dimerización. (Figura 3.46)



**Figura 3.46.** Dependencia de  $\omega$  frente a  $\tau$  de:  
a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3

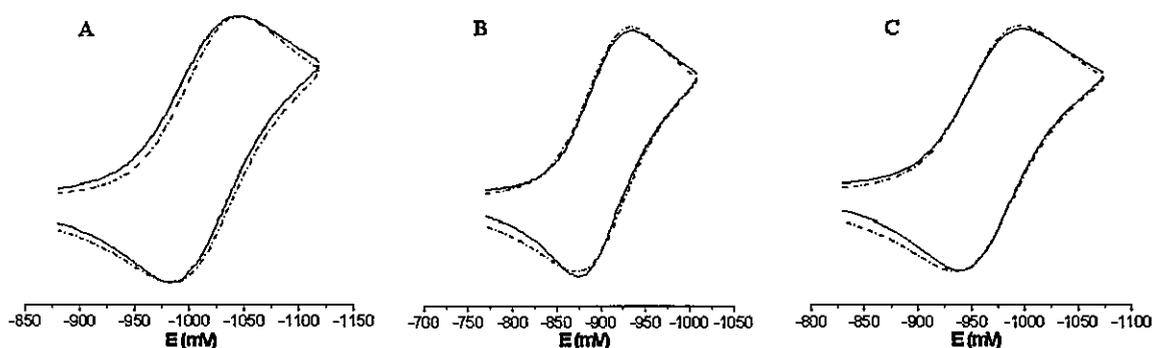
La constante de velocidad de segundo orden y el tiempo de vida media fueron calculados a partir de la pendiente de estos gráficos. Los valores se exponen en la **tabla 3.14**, juntamente con los potenciales de reducción y los valores de  $\Delta E_p$ .

Tabla 3.14. Parámetros cinéticos y electroquímicos

Compuestos	-E <sub>pc</sub> (mV)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> . s <sup>-1</sup> )	t ½ (s)
FDHP1	1044	63 ± 6	779 ± 37	1.30 ± 0.06
FDHP2	929	58 ± 9	1440 ± 68	0.69 ± 0.03
FDHP3	998	64 ± 8	1100 ± 83	0.90 ± 0.07

Los valores encontrados para ΔE<sub>p</sub> sugieren que el proceso de transferencia electrónica es un proceso reversible.

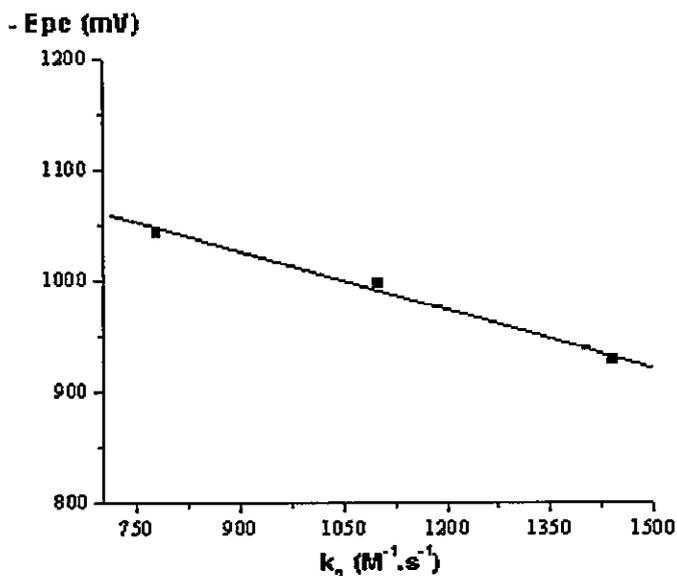
Los voltamperogramas cíclicos de FDHP1, FDHP2 y FDHP3 (1 V/s) fueron simulados siguiendo la secuencia EQ, una reacción de transferencia electrónica reversible seguido de una reacción de dimerización (Ec. 3.56, Ec. 3.57). En la **figura 3.47** podemos observar que empleando los valores de las constantes de dimerización calculados obtenemos una señal voltamperométrica similar a la experimental.



**Figura 3.47.** Voltamperogramas cíclicos, simulado (-----) y experimental (—) del compuesto FDHP1, a pH 3.

Es importante destacar que, en este medio, fue posible establecer una relación entre la afinidad electrónica de los compuestos, reflejada en su potencial de reducción y los parámetros

cinéticos,  $k_2$  y  $t^{1/2}$ . A mayor electroafinidad (FDHP2) menor es la estabilidad del anión radical nitro, es decir, que la velocidad de la reacción acoplada a la transferencia electrónica es mayor. Además, existe una relación lineal entre los valores de los potenciales de reducción y la constante  $k_2$ . (Figura 3.48)



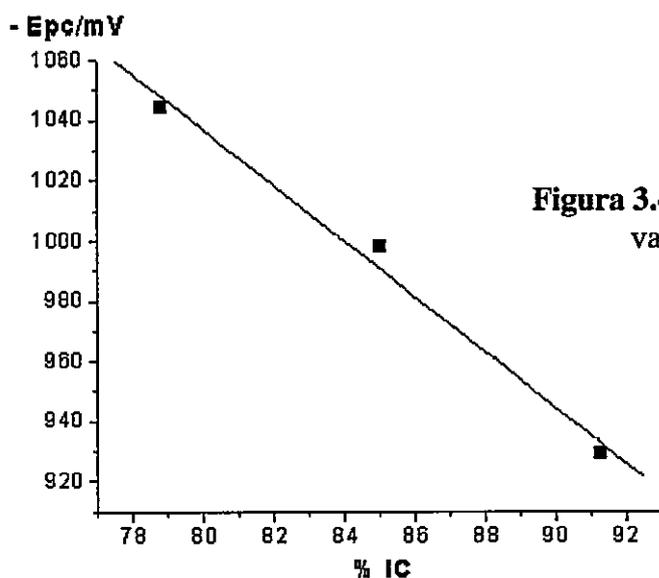
**Figura 3.48.** Gráfico que relaciona los potenciales de reducción con la constante cinética de segundo orden.

Con relación a la afinidad electrónica de los compuestos es importante mencionar que en las mismas condiciones experimentales los potenciales de reducción del nifurtimox y megazol son  $-930$  mV y  $-990$  mV, respectivamente. Teniendo en cuenta que el potencial de reducción de las drogas nitroaromáticas es un importante parámetro de citotoxicidad, podríamos vaticinar una potencial actividad tripanocida en los compuestos estudiados. Un estudio preliminar con respecto a la citotoxicidad sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) fue llevado a cabo a diferentes concentraciones de FDHP1, FDHP2 y FDHP3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$  y  $100 \mu\text{g/ml}$  en DMSO, dimetilsulfóxido). Los resultados de estos experimentos expresados en porcentajes de inhibición de crecimiento de la forma epimastigotes del parásito (% IC) se exponen en la **tabla 3.15**.

**Tabla 3.15.** Potencial de reducción y actividad antiepipimastigote.

Compuestos	- E <sub>p</sub> c/mV	Conc.(μg/ml)	% IC
FDHP1	1044	100	78,80 ± 2,61
		10	72,61 ± 1,56
		1	4,83 ± 3,38
FDHP2	929	100	91,28 ± 0,87
		10	72,12 ± 3,50
		1	7,57 ± 0,42
FDHP3	998	100	85,02 ± 3,48
		10	59,10 ± 2,02
		1	9,70 ± 3,46

Como se puede apreciar a concentraciones de 10 μg/ml los tres compuestos exhibieron un porcentaje de inhibición superior al 50 %, a esta misma concentración se han reportado valores de 89,13 % y 78,62 % para las drogas comercialmente empleadas nifurtimox y benznidazol. A 100 μg/ml fue posible establecer una relación lineal entre la actividad antiepipimastigote y el potencial de reducción del par redox  $RNO_2/RNO_2^-$ , donde el compuesto que es reducido a potenciales menos negativo presentó una mayor actividad. Aunque estudios biológicos no están contemplados en los objetivos de esta tesis, estos resultados son alentadores para proyectar y dirigir la investigación de estos compuestos de tal modo a establecer a futuro su real capacidad tripanocida y su potencial aplicabilidad en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.



Por otro lado, como era de esperarse para una reacción de segundo orden, la vida media del anión radical nitro derivado de FDHP1, FDHP2 y FDHP3 tiende a disminuir conforme aumenta la concentración de la especie electroactiva en disolución. (Figura 3.50)

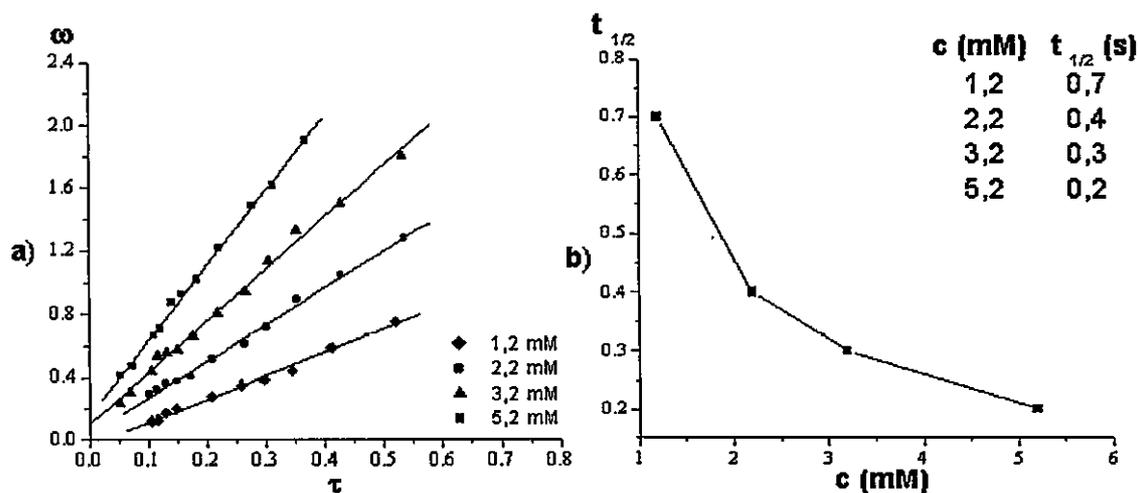
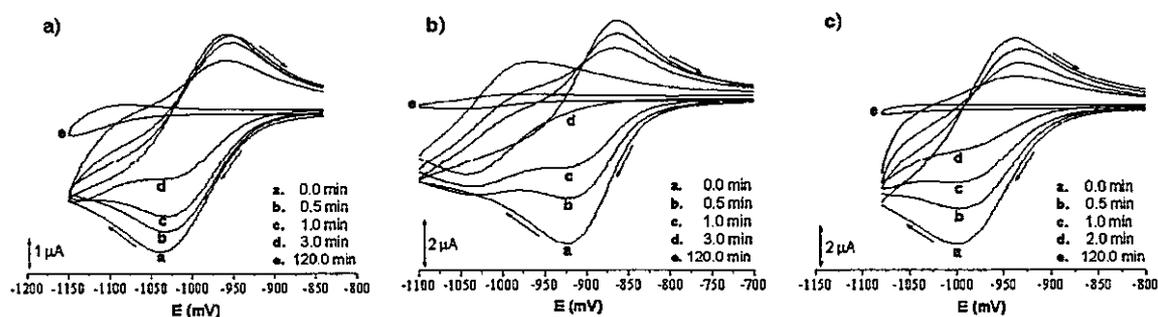


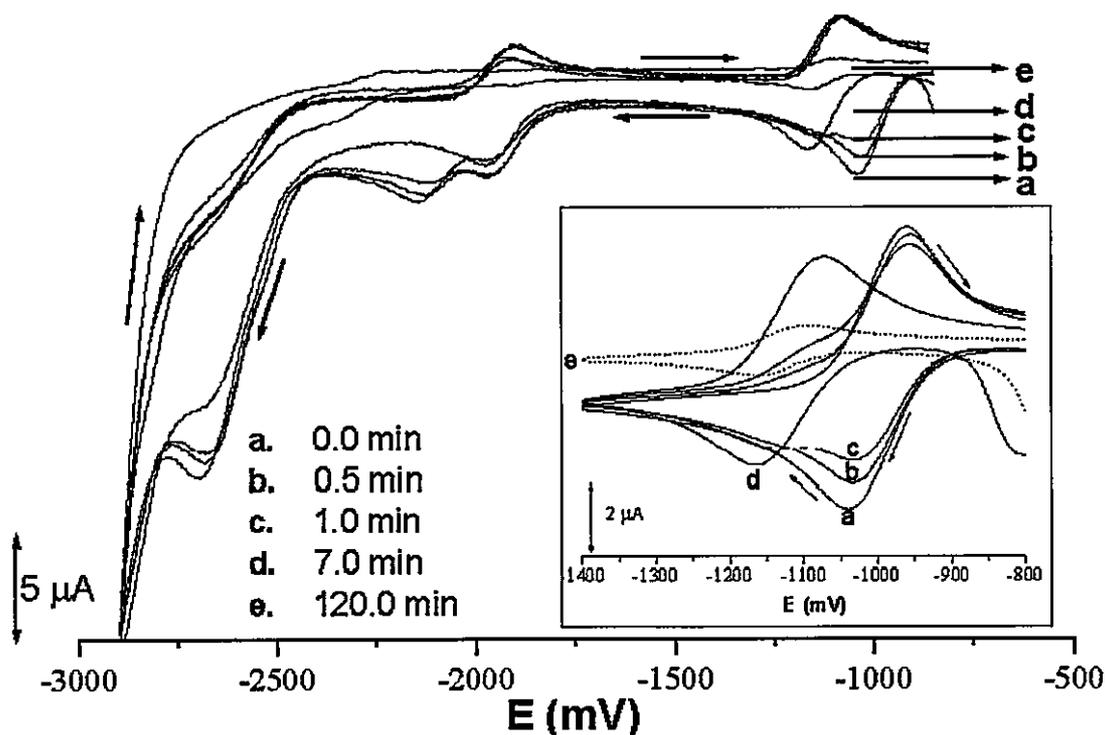
Figura 3.50. a) Gráfico de  $\omega$  versus  $\tau$  y b) Dependencia del tiempo de vida media del anión radical de FDHP2 con la concentración.

Con el objetivo de obtener mayor información con respecto al comportamiento del par redox  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$ , la formación y estabilidad del anión radical nitro han sido evaluadas mediante electrólisis a potencial controlado (EPC) con seguimiento por voltamperometría cíclica. Disoluciones conteniendo 1 mM de los derivados nitro compuestos fueron electrolizadas a potenciales entre  $-1,4$  a  $-1,5$  V, de tal forma a generar exhaustivamente el correspondiente anión radical nitro. Como era de esperarse, se observó una disminución en las señales de reducción y oxidación en el transcurso de la EPC, como consecuencia de la reducción del grupo nitro. Como se puede apreciar en la **Figura 3.51**, la corriente de oxidación decrece más lentamente que de la reducción debido a la alta concentración del anión radical nitro disponible para ser oxidado en el barrido de vuelta.



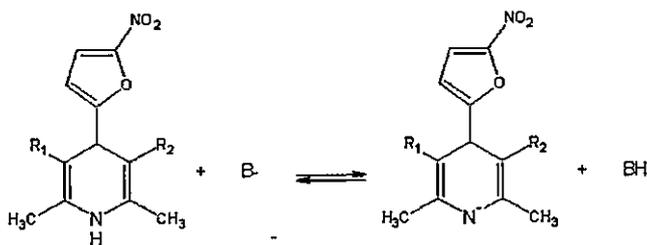
**Figura 3.51.** Evolución del par redox  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$  durante la EPC.

El decaimiento o desaparición de las señales de reducción correspondientes a la transferencia monoeléctrica y posteriores reducciones de esta especie con el tiempo de la electrólisis se observan en la **figura 3.52**.



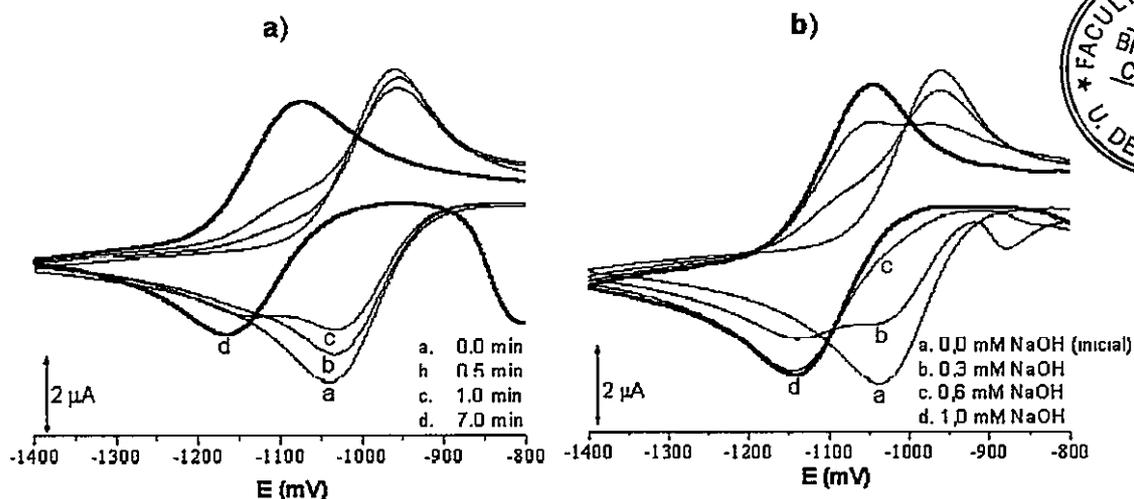
**Figura 3.52.** Evolución de las señales de reducción correspondientes a la reducción del grupo nitro de FDHP1 en el transcurso de la EPC.

Los voltamperogramas cíclicos a diferentes tiempos de la EPC han revelado que la señal correspondiente a la reducción del grupo nitro desaparece totalmente transcurrido los primeros 7 minutos de la electrólisis, sin embargo, se visualiza la presencia de otro par redox reversible, a potenciales más negativos, muy próxima a la señal del anión radical nitro. En la sección 3.2.2, habíamos mencionado que los derivados dihidropiridínicos pueden existir en su forma aniónica en medio aprótico, la adición de una base fuerte nos permitió observar la señal correspondiente a la oxidación del anión de la dihidropiridina. Es posible que el anión radical nitro electrogenerado en la EPC actúe como una base fuerte ( $B'$ ) abstrayendo el protón del anillo dihidropiridínico, tal y como se expresa en la ecuación 3.58.<sup>57,59</sup>



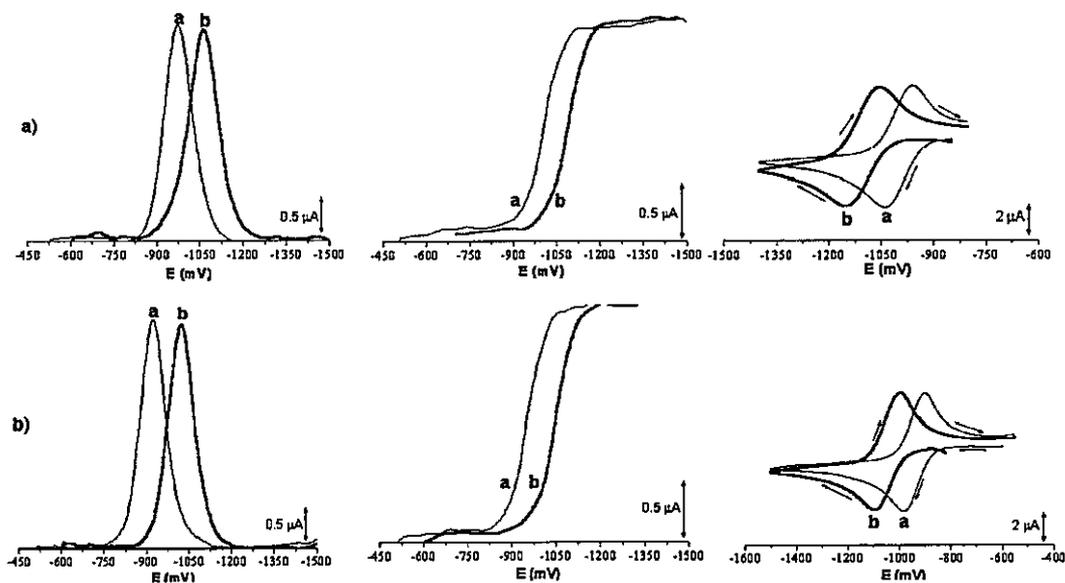
Ec. 3.58

Este hecho fue confirmado comparando los voltamperogramas cíclicos registrados a diferentes tiempos de la electrólisis con aquellos obtenidos por la adición de una base fuerte (microlitros de una disolución etanólica de NaOH). (Figura 3.53)



**Figura 3.53.** Comparación de voltamperogramas cíclicos de FDHP1 registrados: a) A diferentes tiempos de la EPC y b) Después de la adición de base.

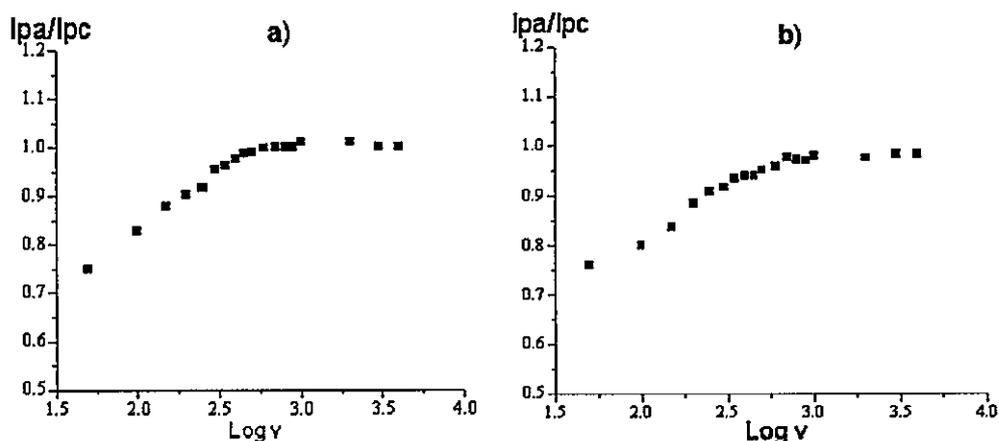
La señal del anión dihidropiridínico generado durante la electrólisis es menor comparado con su equivalente producto de la adición de una base, debido a que el potencial aplicado en la EPC abarca también esta señal. Por la proximidad entre ambos pares redox es difícil la conversión completa de la dihidropiridina a su forma aniónica sin afectar la intensidad de esta última, por lo cual hemos fracasado en nuestro intento de estudiar la estabilidad del anión de la dihidropiridina generándolo electroquímicamente. Sin embargo, la adición de la base nos ha permitido obtener la misma intensidad en las señales correspondientes a la reducción de la especie neutra y la aniónica, excepto para FDHP2, donde la adición de la base estaría favoreciendo otro tipo de reacciones. (Figura 3.54)



**Figura 3.54.** Polarogramas de pulso diferencial, TAST y voltamperogramas cíclicos de la especie neutra, **a**, y de la especie aniónica, **b**, de: a) FDHP1 y b) FDHP3

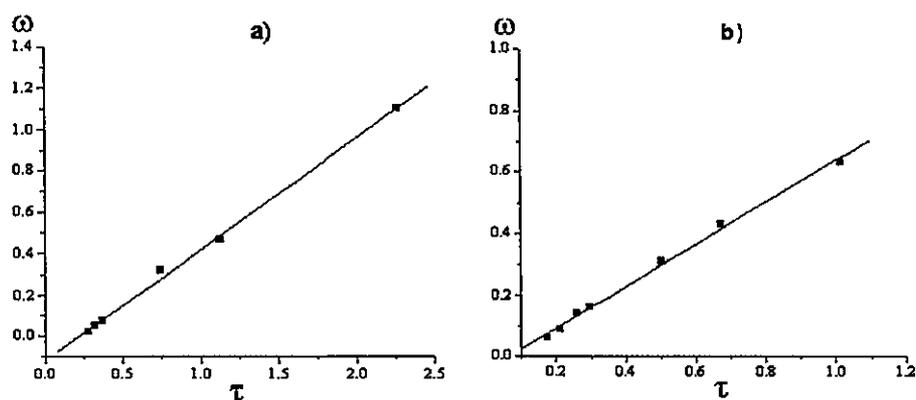
A juzgar por la intensidad de las señales **a** y **b** podemos considerar una completa conversión del derivado de la dihidropiridina a su forma aniónica. La adición de 2 mM de NaOH a una disolución 1 mM de FDHP1 y FDHP3, nos ha permitido estudiar la estabilidad del anión radical nitro del anión dihidropiridínico, siguiendo el mismo procedimiento empleado en la caracterización cinética de la especie neutra.

Aplicando el criterio de Nicholson y Shain, el gráfico que relaciona la razón de corrientes  $i_{pa}/i_{pc}$  con el logaritmo de la velocidad de barrido reveló que se trata del mismo proceso EQi. (Figura 3.55)



**Figura 3.55.** Dependencia de  $i_{pa}/i_{pc}$  con el logaritmo de la velocidad de barrido de: a) FDHP1 y b) FDHP2.

Prosiguiendo con la metodología descrita para determinar la constante cinética de la reacción química asociada a la transferencia electrónica, hemos insertado los valores de  $i_{pa}/i_{pc}$  en la curva teórica de trabajo de Olmstead para obtener el parámetro cinético  $\omega$ . De la relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$ , (**Figura 3.56**) hemos calculado las constantes cinéticas,  $k_2$  y el tiempo de vida media del anión radical nitro del nitración de FDHP1 y FDHP3. Estos valores han sido tabulados junto con los potenciales de reducción y  $\Delta E_p$ . (**Tabla 3.16**)



**Figura 3.56.** Relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$  de: a) FDHP1 y b) FDHP2

**Tabla 3.16.** Parámetros cinéticos y electroquímicos de la forma aniónica de los compuestos dihidropiridínicos.

Compuestos	-E <sub>pc</sub> (mV)	Δ E <sub>p</sub> (mV)	k <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> . s <sup>-1</sup> )	t ½ (s)
FDHP1	1126	75 ± 6	606 ± 71	1.7 ± 0.2
FDHP3	1086	66 ± 5	699 ± 65	1.4 ± 0.1

Comparando estos valores con los parámetros cinéticos y electroquímicos correspondientes a la formación y estabilidad del anión radical nitro de la especie neutra (Tabla 3.14), observamos que la mayor diferencia entre ambos radica en los valores de ΔE<sub>p</sub>, cuyo valor es un importante parámetro que da cuenta de la reversibilidad del proceso electródico. La diferencia entre los potenciales de reducción y oxidación es significativamente mayor que los 59 mV esperados para un proceso reversible monoelectrónico. Esta desviación es característica de un proceso de transición desde un estado reversible hacia un estado intermedio denominado cuasi- reversible. Por lo general, esto ocurre cuando la velocidad relativa de la transferencia electrónica con respecto al transporte de masa es insuficiente para mantener el equilibrio Nernstiano en la superficie del electrodo.<sup>26</sup>

Por otra parte, los parámetros cinéticos determinados indican que el anión radical nitro generado a partir de la forma aniónica de la dihidropiridina es ligeramente más estable.

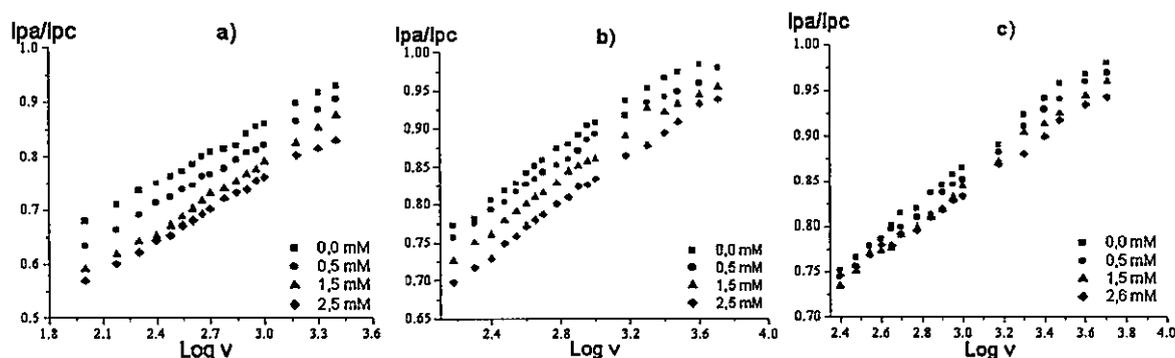
Con todo esto, podemos concluir que la caracterización del anión radical nitro en medio aprótico reveló la presencia de una reacción química acoplada a la transferencia electrónica. La aplicación del método teórico propuesto por Olmstead nos permitió determinar que el decaimiento del anión radical nitro, en este medio, ocurre a través de un proceso de dimerización. Del mismo modo, la constante cinética de segundo orden y el tiempo de vida media de los derivados nitro compuestos fueron determinados.

Asimismo, la electrólisis a potencial controlado evidenció la presencia de una reacción ácido-base entre el anión radical nitro electro-generado y el protón dihidropiridínico. Este hecho nos ha permitido estudiar la formación y estabilidad del anión radical nitro de la forma aniónica de FDHP1 y FDHP3, formado a partir de la adición de una base en la disolución electrolítica..

### 3.4.2. Estudio de la interacción del anión radical nitro

El último objetivo propuesto en el desarrollo de esta tesis constituye el estudio de la interacción del anión radical nitro generado electroquímicamente, con moléculas orgánicas de importancia biológica, entre ellas el glutatión, la adenina y la *N*-acetilcisteína. Las estructuras químicas de estos compuestos han sido presentadas en la **figura 2.3**.

Como fue mencionado en el capítulo de introducción, el glutatión juega un rol importante en la protección de sistemas biológicos contra daño oxidativo. El grupo tiol presente en su molécula es capaz de reaccionar con radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ),  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{RO}_2^\bullet$ , peroxinitrito ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) y otros. Cuando reacciona con radicales libres genera el radical  $\text{GS}^\bullet$ . Esta especie ha sido atrapada y detectada por espectroscopía de resonancia de spin electrónico en una reacción del anión radical nitro de la nitrofurantoina con glutatión.<sup>73</sup> La *N*-acetilcisteína también contiene un grupo  $-\text{SH}$  en su molécula, es un precursor del glutatión y estudios más recientes han revelado su poder antioxidante.



**Figura 3.57.** Dependencia de los valores de ipa/ipc con Log v de FDHP2, a diferentes concentraciones de: a) glutatión, b) adenina y c) *N*-acetilcisteína.

La interacción del anión radical nitro fue evaluada mediante voltamperometría cíclica, en medio mixto, a  $\text{pH} = 9$ . La adición de concentraciones crecientes de glutatión, adenina y *N*-acetilcisteína a una disolución 5 mM de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, generó un efecto significativo sobre la señal voltamperométrica del anión radical nitro. La razón de corrientes ipa/ipc disminuye conforme aumenta la concentración del endo o xenobiótico. (**Figura 3.57**)

De acuerdo con la metodología propuesta en la sección 2.4.5, es posible cuantificar la interacción entre los endo/xenobióticos y el anión radical nitro. Una constante aparente,  $k_{app}$ , fue calculada a partir de las pendientes de  $\omega$  versus  $\tau$ . (Figura 3.58)

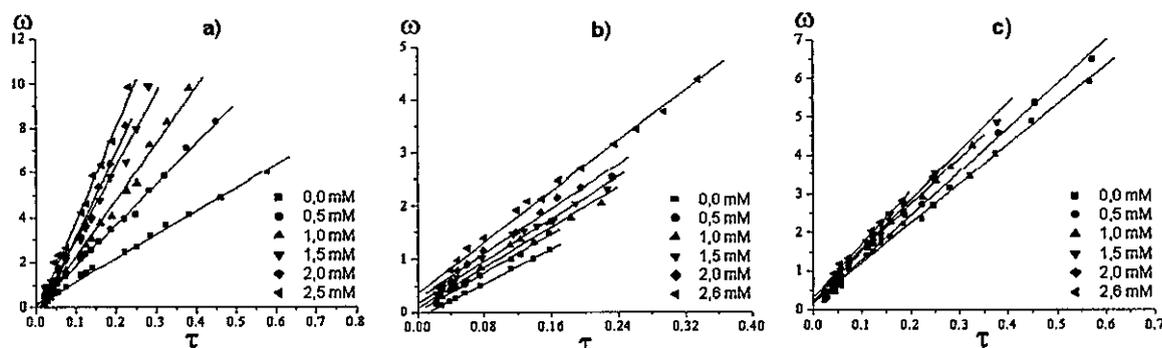


Figura 3.58. Relación lineal de  $\omega$  versus  $\tau$  de FDHP2, a diferentes concentraciones de: a) glutatión, b) adenina y c) *N*-acetilcisteína.

Esta  $k_{app}$  representa el decaimiento natural del anión radical,  $k_2$ , y la interacción con glutatión, adenina y *N*-acetilcisteína. A partir de este valor se puede calcular la constante de interacción ( $k_i$ ) para cada compuesto. Tal como fue expuesto en la ecuación 2.14 ( $k_{app}/2k_{obs} = 1 + k_i$  [end o xen] /  $2k_{obs}$  [ $\text{RNO}_2^-$ ]), una relación lineal de  $k_{app}/2k_{obs}$  con la concentración de cada endo/xenobiótico nos proporcionará el valor de  $k_i$ . (Figura 3.59)

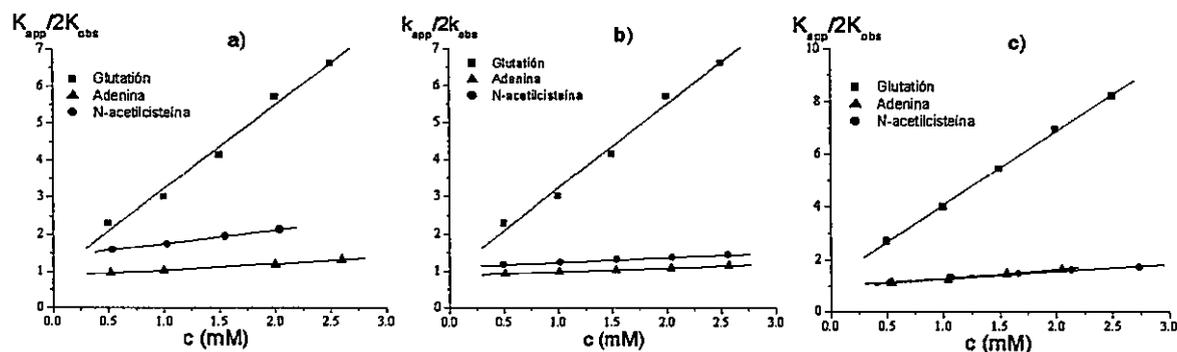


Figura 3.59. Dependencia de  $k_{app}/2k_{obs}$  con la concentración del endo/xenobiótico, de a) FDHP1, b) FDHP2 y c) FDHP3.

En la **tabla 3.17** se exponen los valores de las constantes de interacción para la reacción entre el anión radical nitro generado electroquímicamente a partir de FDHP1, FDHP2 y FDHP3, y los endo/xenobióticos, glutatión, adenina y *N*-acetilcisteína.

**Tabla 3.17** Constantes cinéticas de la reacción de interacción entre los endo/xenobióticos y  $\text{RNO}_2^-$ .

Compuestos	$k_2$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )		
		glutatión	adenina	<i>N</i> -acetilcisteína
FDHP1	1192	13492	997	2149
FDHP2	1909	11955	987	1186
FDHP3	984	13758	1692	1267

En estudios previos realizados en el laboratorio, Núñez-Vergara y colaboradores<sup>69</sup> han propuesto que la disminución de ipa/ipc, como resultado de la interacción del anión radical nitro con compuestos con grupos tioles, se debe a la siguiente reacción:



Winterbourn y colaboradores<sup>74</sup> también han descrito la reacción del anión tiolato ( $\text{RS}^-$ ) con peróxido de hidrógeno.

Estas observaciones estarían de acuerdo con el orden de reactividad que hemos encontrado: glutatión > *N*-acetilcisteína ~ adenina. Los valores de pKa en ese mismo orden son: 9.12, 9.5 y 9.8. Aunque lo más probable es que sea el radical nitro ( $\text{R-NO}_2\text{H}^\cdot$ ) la especie que reaccione con  $\text{RS}^-$ .

En resumen, podemos señalar que la presencia de los endo/xenobióticos (glutatión, adenina y *N*-acetilcisteína) afectaron en mayor o menor medida la estabilidad del anión radical nitro,

actuando como atrapadores de radicales. A partir del orden de reactividad encontrado glutatión > *N*-acetilcisteina ~ adenina, es posible predecir que la acción detoxificante del glutatión prevalecerá sobre el efecto tóxico que se produciría cuando el anión radical interacciona con la adenina.

## **4. Conclusiones Generales**

Con respecto a la síntesis debemos destacar que en algunos casos la mezcla de reacción fue calentada por un breve período de tiempo mientras que en otros, a temperatura ambiente, la reacción fue inmediata. Consideramos que en la síntesis de 1,4-dihidropiridinas, la reacción de un mol de aldehído con dos moles de enaminas en ácido acético es una alternativa sintética muy interesante, sobre todo por aquellas mezclas de reacción que no resisten largas horas de calentamiento a reflujo, como fue el caso de la síntesis de 4-(5'-nitro-2'-furyl)-1,4-DHPs.

En los distintos experimentos electroquímicos realizados durante el desarrollo de esta tesis, se ha puesto de manifiesto que la respuesta electroquímica de los compuestos sintetizados es altamente dependiente del medio electrolítico.

En medio prótico, hemos observado que el mecanismo de electro-oxidación de los seis compuestos dihidropiridínicos difiere si el medio es ácido o básico. El protón en la posición N-1 del anillo de la dihidropiridina es el responsable de dicho cambio. En medio ácido ( $\text{pH} = 4$ ), un mecanismo de oxidación EQEQ fue encontrado para todos los casos. Sin embargo, a  $\text{pH} > 4$ , el mayor carácter aceptor de electrones del grupo nitrofurylo en la posición 4 favoreció el mecanismo EQEQ en los compuestos c, d y e, mientras que, un proceso DISP1 fue descrito para los compuestos a, b y f.

En medio aprótico, el mecanismo de electro-oxidación corresponde a un proceso EQEQ. Asimismo, hemos encontrado que la adición de una base da lugar a la formación del anión dihidropiridínico, cuyo potencial de oxidación es desplazado hacia valores menos positivos que la dihidropiridina de la cual procede.

En lo que atañe a la electro-reducción de FDHP1, FDHP2 y FDH3 en medio prótico podemos concluir que el proceso de reducción del grupo nitro a la hidroxilamina genera una única señal que corresponde a la transferencia de 4 electrones y 4 protones. En algunos casos, el derivado hidroxilamínico electro-generado experimentó una reducción posterior hasta la amina correspondiente.

Sin embargo, en medio mixto, a  $\text{pH} = 9$ , el proceso de reducción generó dos señales: la primera que da cuenta de la formación del anión radical nitro por la transferencia reversible de

un electrón y la segunda, que se observa a potenciales más negativos, correspondiente a la reducción del anión radical nitro al derivado hidroxilamínico.

Mediante voltamperometría cíclica, en medio mixto, a  $\text{pH} = 9$  y en medio aprótico, se determinó la estabilidad relativa del anión radical nitro. En ambos sistemas de disolventes, la variación de la razón de corrientes  $i_{pa}/i_{pc}$  en función de la velocidad de barrido evidenció la presencia de una reacción química acoplada a la transferencia electrónica, esto es, un proceso EQi.

En medio mixto, una reacción de dismutación daría cuenta del decaimiento natural del anión radical nitro. Sin embargo, en medio aprótico, la cantidad insuficiente de protones favoreció un proceso de dimerización. En ambos casos, el tratamiento teórico de Olmstead permitió la determinación de la constante cinética de segundo orden y el tiempo de vida media del anión radical.

El medio mixto no constituyó un medio diferenciador en cuanto a afinidad electrónica, las constantes cinéticas de segundo orden determinadas fueron muy similares a pesar de la diferencia entre los potenciales de reducción de cada compuesto.

Por el contrario, en medio aprótico, encontramos una relación entre la afinidad electrónica de los compuestos, reflejada en su potencial de reducción y los parámetros cinéticos,  $k_2$  y  $t_{1/2}$ . A mayor electroafinidad (FDHP2) menor es la estabilidad del anión radical nitro, es decir, que la velocidad de la reacción de descomposición o decaimiento del anión radical nitro es mayor. Asimismo, un estudio preliminar sobre actividad antiepipimastigotes de los tres compuestos estudiados indicó que existiría una relación entre el potencial de reducción y el porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito. Por otro lado, la electrolisis a potencial controlado evidenció la presencia de una reacción ácido-base entre el anión radical nitro generado y el protón dihidropiridínico. Este hecho nos permitió estudiar la formación y estabilidad del anión radical nitro de la forma aniónica de FDHP1 y FDHP3, formado a partir de la adición de una base en la solución electrolítica.

Finalmente, mediante voltamperometría cíclica pudimos determinar y cuantificar la interacción de glutatión, *N*-acetilcisteína y adenina con el anión radical nitro electro-generado.

## **5. Bibliografía**

1. Anniyappan, M.; Muralidharan, D. and Perumal, P.T. *Synthetic Commun.* 32, 4, **2002**, 659-663.
2. Goldmann, Siegfried; Born, Liborius; Kazda, Stanisla; Pittel, Bernd; Schramm, Matthias., *J. Med. Chem.* 33, **1990**, 1413-1418.
3. Kappe, O.C. *Molecules.* 3, **1998**, 1-9.
4. Hoffman, D.; Kosower, E.M. and Wallenfels, K. *J. Am. Soc.*, 83, **1961**, 3314-3319.
5. Yadav, S.J.; Reddy, B.V.S. and Reddy, P. T. *Synthetic Commun.* 31 (3), **2001**, 425-430
6. Núñez-Vergara, J.L.; Squella, J.A.; Aldunate, J; Letelier, M.E.; Bollo-Dragnic, S.; Repetto, Y.; Morello, A.; Spencer, P.L., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43, **1997**, 151-155.
7. Maya, J. D.; Morello, A.; Repetto, Y.; Téllez, R.; Rodríguez, A.; Zelada, U.; Puebla, P.; Caballero, E.; Medarde, M.; Núñez-Vergara, L.J.; Squella, J.A.; Bonita, M.; Bollo, S.; San Feliciano, A., *Comp.. Biochem. Physiol., C* 125, **2000**, 103-109.
8. De Abreu, F. C.; Ferraz, P.A.; Goulart, M.O.F., *J. Braz. Chem. Soc.*, 13, 1, **2002**, 19-35.
9. Rowley, D. A.; Knight, R. C.; Skolimowsky, I. M.; Edwards, D. I., *Biochem. Pharmacol.* 28, **1979**, 3009-3013.
10. Livertoux, M. H.; Lagrange, P.; Minn, A., *Brain Res.*, 725, **1996**, 207-216.
11. Wardman, P. *Envir. Health Persp.*, 64, **1985**, 309-320.
12. Goldmann, S; Stoltefuss, J., *Angew. Chem.* 30,12, **1991**, 1559-1578.
13. Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica.* McGraw-Hill, Interamericana de España S.A., **1997**, 1019.
14. López-Alarcón, C.; Núñez-Vergara, L. J.; Squella, J.A., *Electrochim. Acta.* 48, 17, **2003**.
15. Stradyn, Ya., Gavars, R., Baumane, L., Duburs, G. *Chem., Heterocycl. Comp.*, 33, 6, **1997**, 672-674.
16. Klíma, J, Ludvik, J, Volke, J. J., *Electroanal. Chem.*, **1984**, 205-211.
17. Montoya, R.; Galvín, M.; Rodríguez, M., *Electroanal.* 11, **1999**, 1241-1244.
18. Karakus, C.; Zuman, P. J., *Electroanal. Chem.*, 396, **1995**, 499-505.
19. Núñez-Vergara, L. J.; Bontá, M.; Navarrete-Encina, P.; Squella, J. A., *Electrochim. Acta.* 46, **2001**, 4289-4300.

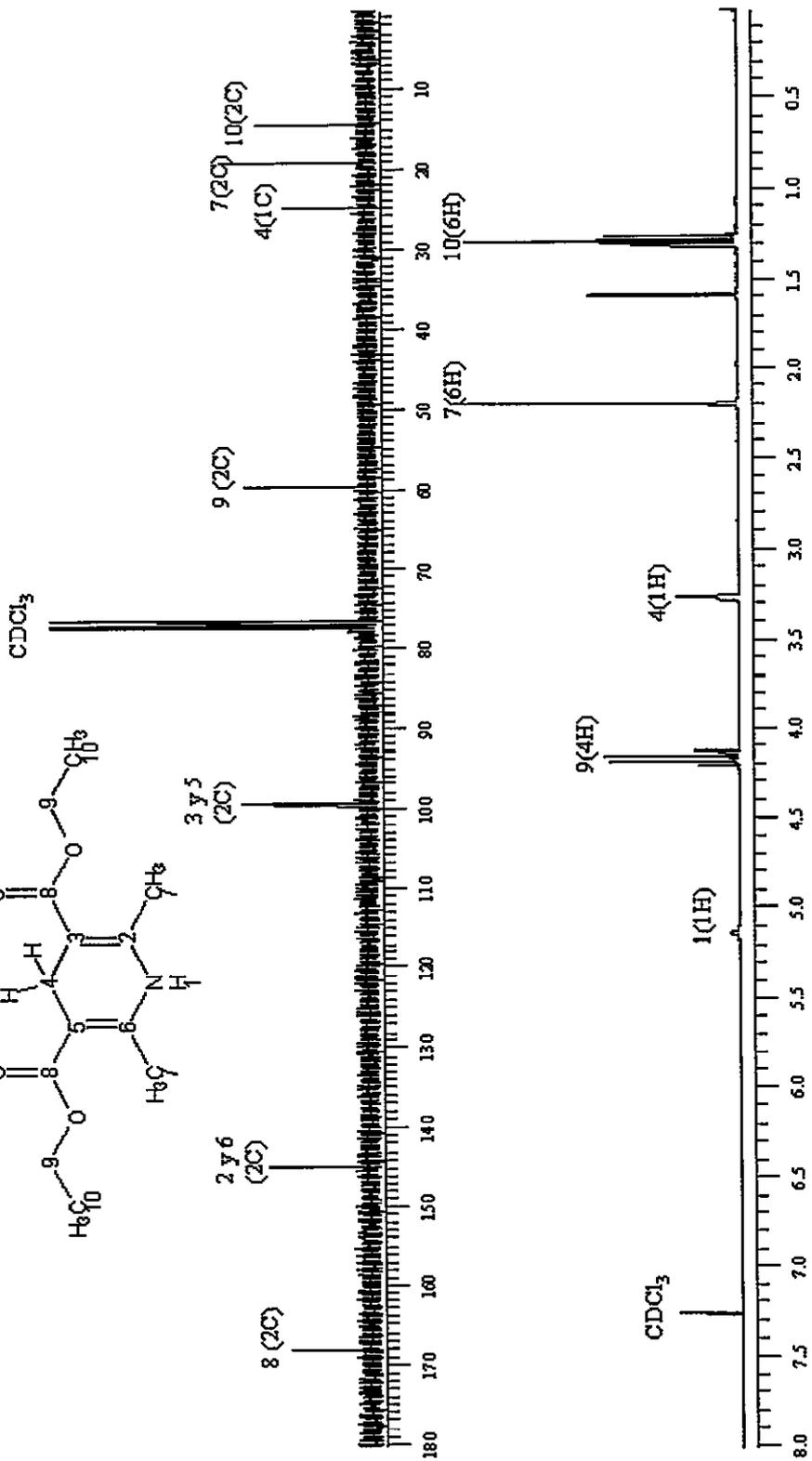
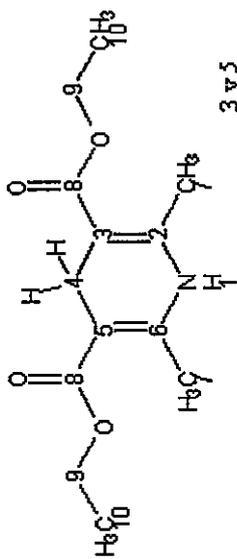
20. Bollo, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Matinez, C.; Chauviere, G.; Périé, J.; Squella, J.A., *Electroanal.* 15,1 **2003**.
21. Tocher, J. H.; Edwards, D. I., *Free Rad. Res. Comms.* 9, 1, **1990**, 49-54.
22. Olmstead, M. L.; Hamilton, R.G.; Nicholson, R. S., *Anal. Chem.*,41, 2, **1969**, 260-267.
23. Olmstead, M. L.; Nicholson, R. S., *Anal. Chem.*, 41, 6, **1969**, 862-864.
24. Squella, J. A.; Bollo, S.; de la Fuente, J.; Núñez-Vergara, L. J., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 34, **1994**, 13-18.
25. Heinze, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, **1984**, 831-847.
26. Zuman, P., *Scientific papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology*, 5, **1999**, 5-71.
27. Bontempelli, G.; Magno, F.; Mazzocchin, G.; Seeber, R., *Ann. Chimica.* 79, **1989**, 103-216.
28. Nicholson, R. S., *Anal. Chem.*.. 36, **1964**, 1406.
29. Nicholson, R. S.; Shain, I., *Anal. Chem.*, 36, 4, **1964**, 706-725.
30. La-Scalea, M.A.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I. G. R., *J. Braz. Chem. Soc.* 10, 2 ,**1999**, 127-135.
31. Hantzsch. *Justus Liebigs Ann.Chem.*, 215, 1, **1882**.
32. Friebolin, H. *Basic One-and Two Dimensional NMR Spectroscopy*, New York: VCH Publishers, **1991**, 344.
33. Jennings, W.B. *Chem. Rev.*, 75, 3, **1975**, 307-322.
34. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.and Morrill, T.C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York: J. Wiley & Sons, **1991**, 419.
35. Böcker, R.H.; Guengerich, F.P., *J. Med.Chem.* 29, **1986**, 1596-1603.
36. Hemmateenejad, B.; Mirj, R., Akhond,M.; Shamsipur, M., *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 10, **2002**, 472-480.
37. Hurvois, J.P.; Moinet, C.; Tallec, A., *Electrochim. Acta*, 38,13, **1993**, 1775-1781.
38. Ludvik, J.; Volke, J.; Klima, J., *Electrochim. Acta.* 32, 7, **1987**, 1063-1071.
39. Bard, A.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Ed. John Wiley & Sons, USA, **1980**, 718.
40. Gileadi, E., *Electrode Kinetics*. Ed. VCH Publishers, USA, **1993**, 73

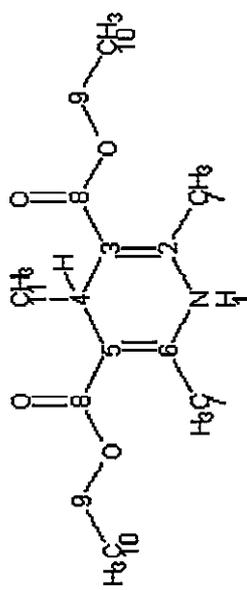
41. Núñez-Vergara, L.J.; Sturm, J.C.; Alvarez-Lueje, A.; Olea-Azar, C.; Sunkel, C.; Squella, J.A., *J. Electrochem. Soc.* 146, 4, **1999**, 1478-1485.
42. Ogle, J.; Stradins, J.; Baumann, L., *Electrochim. Acta.* 39, 1, **1994**, 73-79.
43. Cheng, J.p.; Lu, Y.; Zhu, X.Q.; Sun, Y., *J. Org. Chem.* 65, **2000**, 3853-3957.
44. Nikolic, J.; Expósito, E.; Iniesta, J.; González, J.; Montiel, V., *J. Chem. Educ.*, 77, 9, **2000**, 1191-1194
45. López-Alarcón, C.; Squella, J.A.; Núñez-Vergara, L.J.; Baez, H.; Camargo, C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, **2002**, 1-10.
46. Morello, A., *Comp. Biochem. and Physiology.* 90C, 1, **1988**, 1-12.
47. Oliveira, R.; Passos, A.P.; O Alves, R.; Romanha, A., *J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.* 98, 1, **2003**, 141-144.
48. Caignan, G. A.; Holt, E. M. Z., *Kristallogr.* 215, **2000**, 122-126.
49. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W., *Chem. Rev.* 91, **1991**, 165-195.
50. Bollo Dragnic, S. V. Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. **1997**.
51. Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Carbajo; Squella, J. A., *J. Electrochem. Soc.* 147, 9, **2000**, 3406-3413.
52. Tocher, J. H.; Knight, R. C.; Edwards, D. I., *Free Rad. Res. Comm.* 5, 6, **1989**, 319-326.
53. Kissinger, P. T.; Heineman, W. R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry.* Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 301.
54. Paquette, L.A., *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry.* Ed. W. A. Benjamin, INC, New York, **1968**, 223.
55. Zuman, P., Rupp, E., *Electroanal.* 7, 2, **1995**, 132-137.
56. Zuman, P.; Fijalek, Z. J., *Electroanal. Chem.* 296, **1990**, 583-588.
57. Baumann, L.; Stradins, J.; Gavars, R.; Duburs, G., *Electrochim. Acta.* 37, 14, **1992**, 2599-2610.
58. Núñez-Vergara, L. J.; Ortiz, M. E.; Bollo, S.; Squella, J. A., *Chem. Biol. Inter.*, 106, **1997**, 1-14.
59. Bontá, M.; L.J.; Chauviere, G.; Périé, J.; Núñez-Vergara, Squella, J.A., *Electrochim. Acta.*, 47, **2002**, 4045-4053.

60. Eisner, U.; Kuthan, J. *Chem. Rev.* 72, 1, **1972**, 1-42.
61. Greef, R.; Peat, R.; Peter, L. M.; Pletcher, D.; Robinson, J. Southampton Electrochemistry Group. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Ed. Ellis Horwood Limited. **1985**, 178-228.
62. Guengerich, F.P.; Peterson, L. A.; Böcker, R.H., *J. Biol. Chem.* 263, 17, **1988**, 8176-8183.
63. Hafiz, Ibrahim Saad A.; Darwish, Elham S., and Mahmoud, Fivian Farouk *J. Chem. Research (S)*, **1999**, 536-537.
64. Ilavsky, Dusan, and Milata, Viktor. *Collet.Czech.Chem.Comm.* 61, **1996**, 1233-1243.
65. Katritzky, A.R.; Ostercamp, D.L. and Yousaf, Taher. *Tetrahedron.*, 42, 20, **1986**, 5729-5738.
66. Katritzky, A.R.; Ostercamp, D.L. and Yousaf, Taher. *Tetrahedron.*, 43, 22, **1987**, 5771-5186.
67. Kim, Seok-Chan; Choi, Kwan-Min and Cheong, Chan-Seong. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23, 1, **2002**, 143-144.
68. Natale, N. R.; Rogers, M.E.; Staples, R.; Triggler, D.J.; Rutledge, A., *J. Med. Chem.* 42, **1999**, 3087-3093.
69. Núñez-Vergara, L. J.; Guíñez-Castro, J. E.; Bollo, S.; Squella, J. A. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 41, **1996**, 363-370.
70. Petrow, Vladimir A. *New Syntheses of Heterocyclic Compounds. Part VII*, **1946**, 885-888.
71. Zamponi, G. W.; Stotz, S. C.; Staples, R. J.; Andro, T. M., *J. Med. Chem.* 46, **2003**, 87-96.
72. Zhu, Xiao Q.; Liu, Yang; Zhao, Bing. J.; Cheng, Jin P. *J. Org. Chem.*, 66, **2001**, 370-375.
73. Núñez-Vergara, L. J.; Sturm, J. C.; Olea-Azar, C.; Navarrete, P.; Bollo, S.; Squella, J. A. *Free Rad. Res.*, 32, **2000**, 399-409.
74. Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D. *Free Rad. Biol. Med.* 27, **1999**, 322-328.
75. Docampo, R.; Moreno, S.N.J. *Free radicals in Biology*. Ed. W.A. Pryor. New York, **1984**, 243-288.

## Apéndice A

Espectros de resonancia magnética nuclear





CDCl<sub>3</sub>

7(2C) 10(2C)

11(1C) 4(1C)

9(2C)

3 y 5  
(2C)

2 y 6  
(2C)

8(2C)

7(6H)

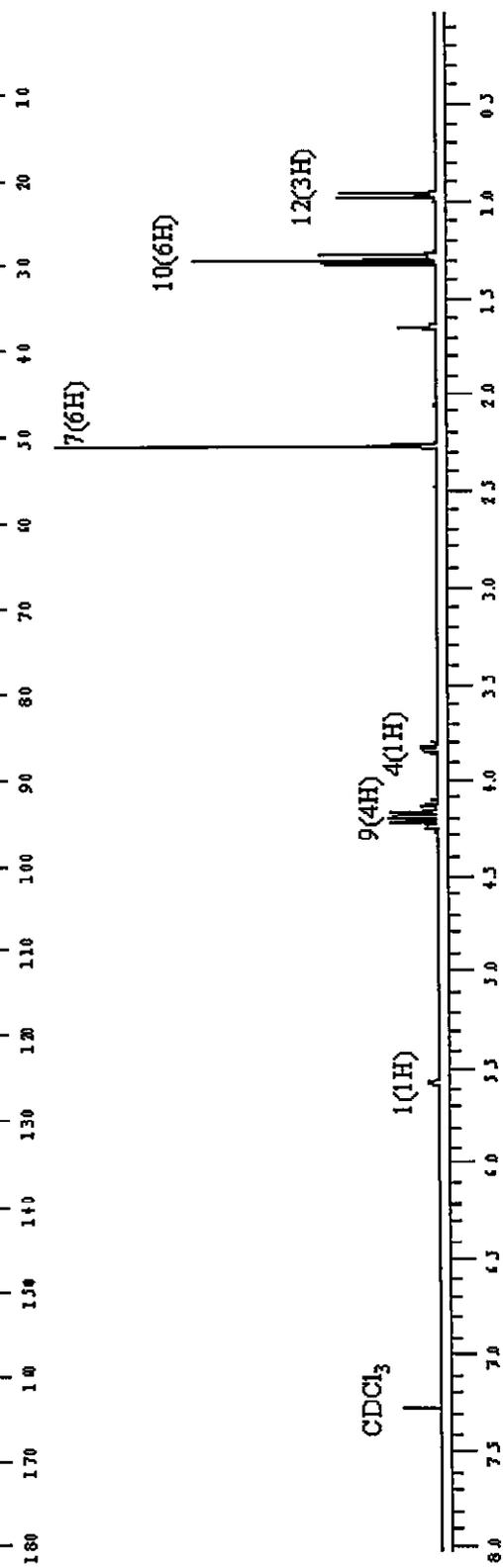
10(6H)

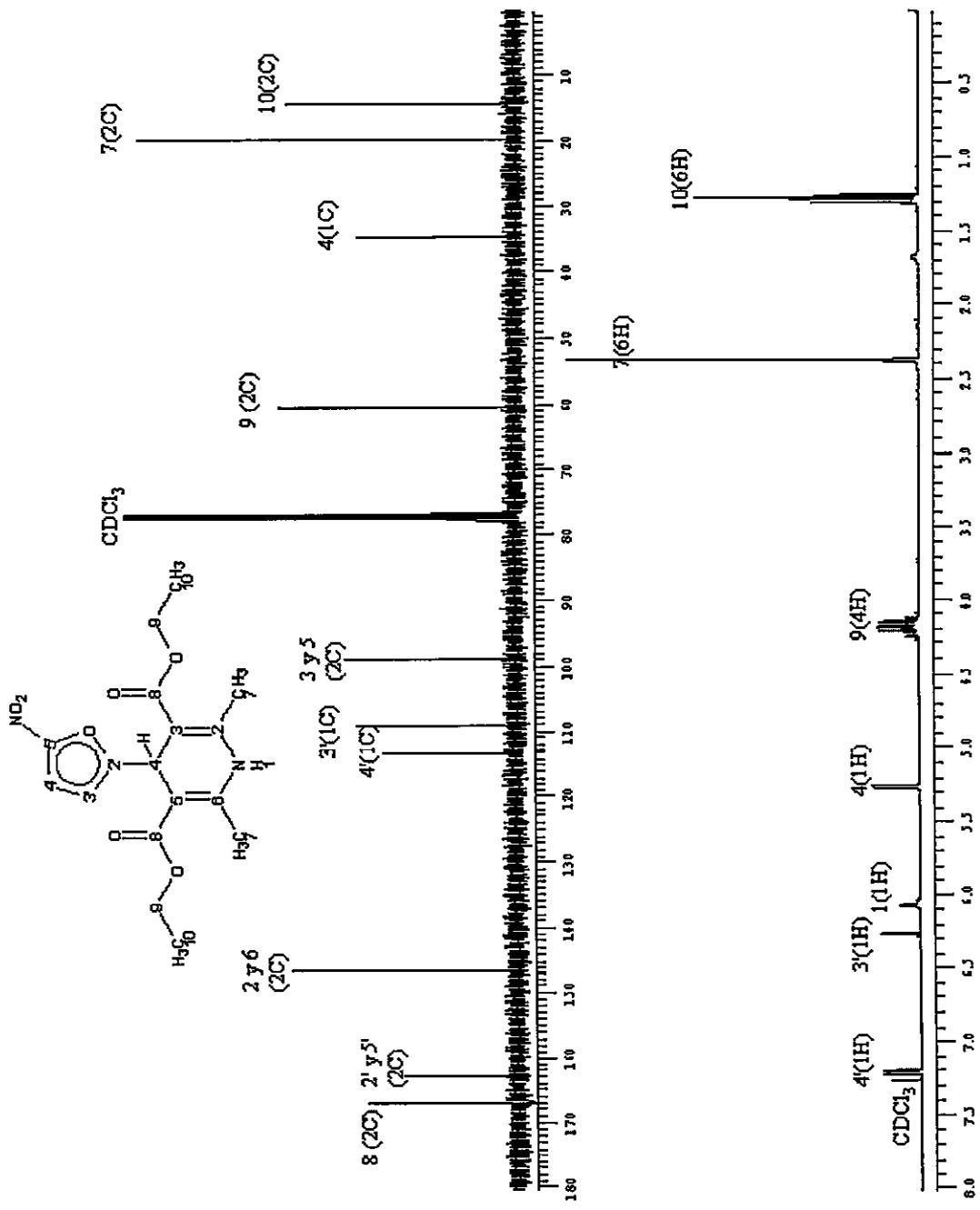
12(3H)

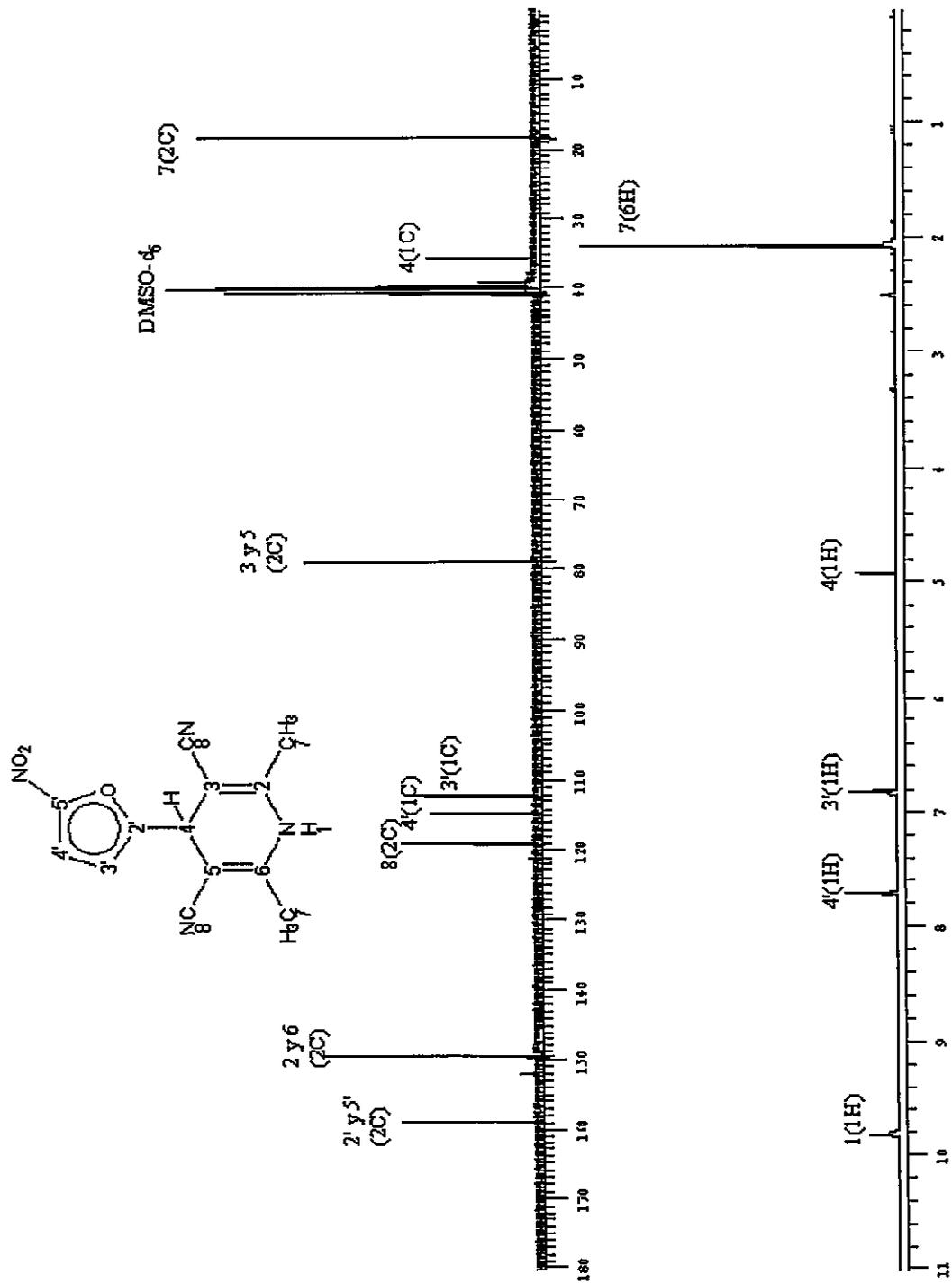
9(4H) 4(1H)

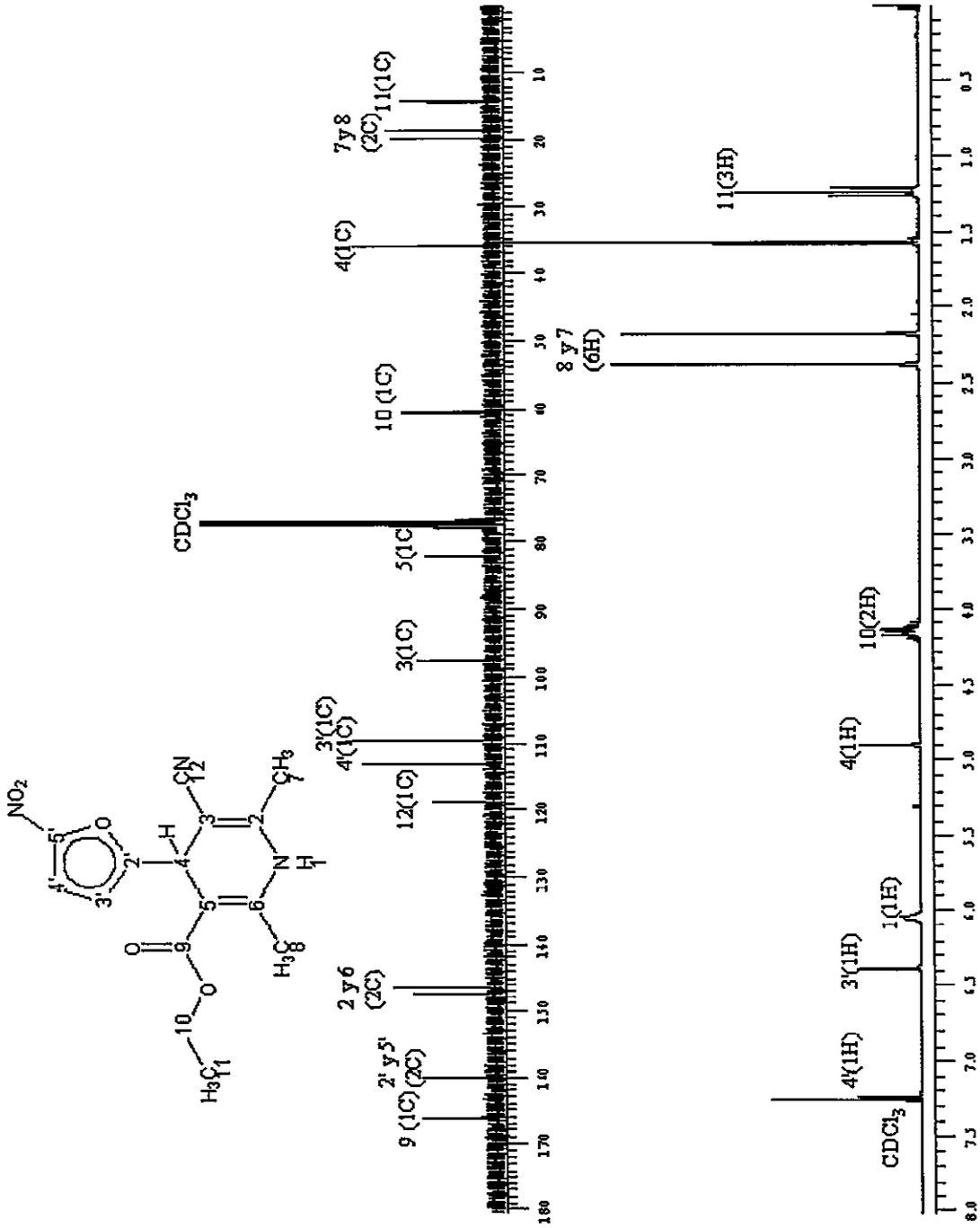
1(1H)

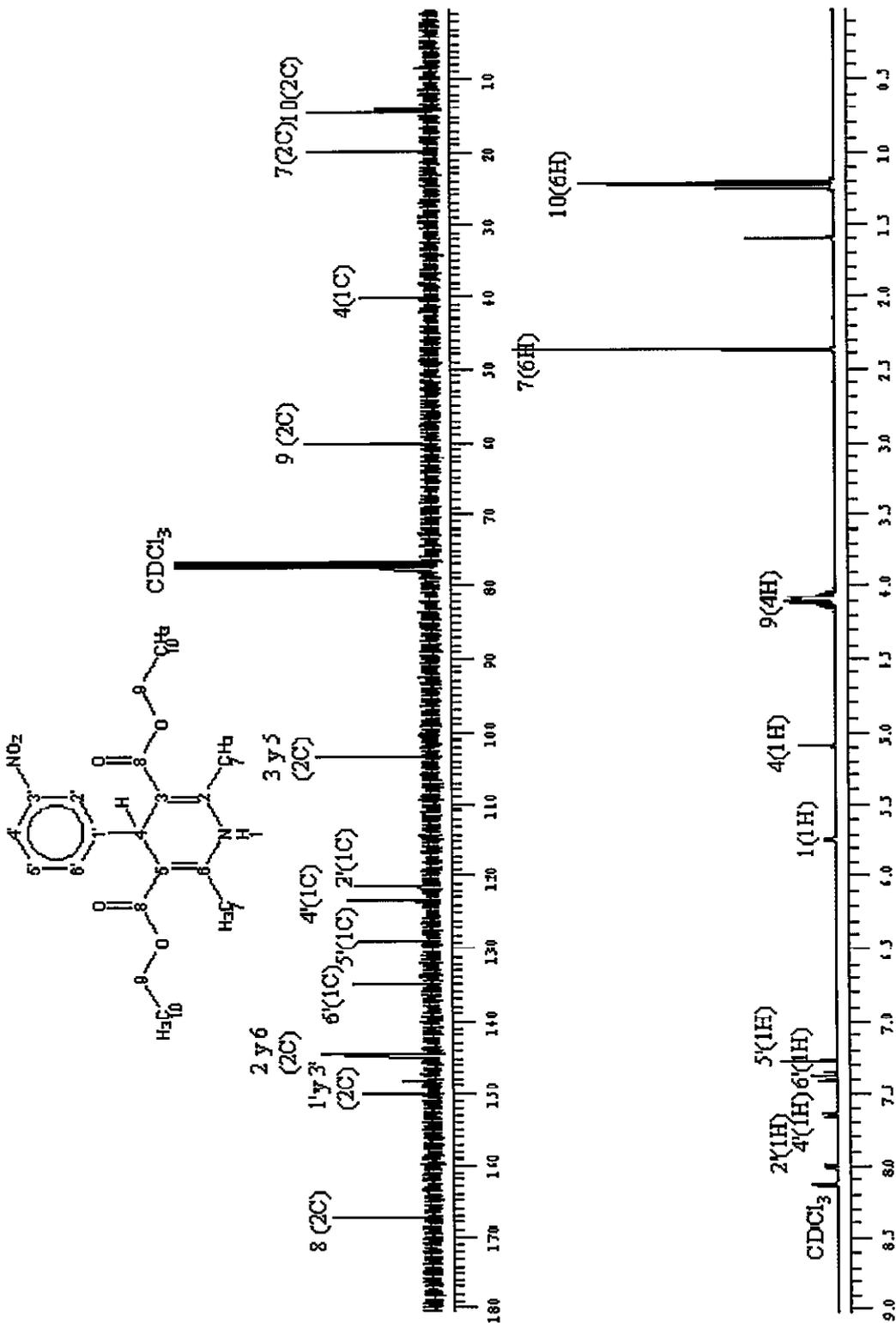
CDCl<sub>3</sub>











## Apéndice B

### **Espectros masa**

