



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio Electroquímico y de Electroespectroscopía
UV-vis de los Fármacos Antiparasitarios
Nifurtimox y Benznidazol en Presencia de
Glutación**

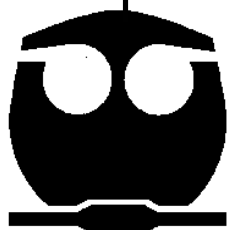
T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

QUÍMICA

P R E S E N T A:

GUADALUPE DIANA SÁNCHEZ URBÁN



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Miguel Saloma Terrazas

Vocal: Ing. Luis Francisco Farrera Gamboa

Secretario: Dra. Martha Aguilar Martínez

1er. Suplente: Dra. Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

2do. Suplente: Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba

Lugar donde se realizó la tesis:

Edificio A, Laboratorio de Electroquímica Molecular (Anexo 4F), Facultad de Química, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dra. Martha Aguilar Martínez

FIRMA

SUSTENTANTE:

Sánchez Urbán Guadalupe Diana

FIRMA

Parte de los resultados experimentales de este trabajo de tesis, fueron presentados en el siguiente congreso internacional:

210th meeting of the Electrochemical Society. Oral presentation. "Interaction of antiprotozoal drugs with biomolecules. An ESR and UV-vis spectroelectrochemical study". Cancún, México. Octubre 2006.

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dar las gracias a los miembros del jurado, porque con su participación y sus sugerencias esta tesis ha sido mejorada.

Dr. Miguel Saloma Terrazas

Ing. Luis Francisco Farrera Gamboa

Dra. Martha Aguilar Martínez

Dra. Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero, por medio del **proyecto de investigación 49796-Q**.

A la **Dra. Martha Aguilar Martínez**, por su cuidadosa dirección, su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo y por sus valiosos consejos tan importantes para mi formación.

A la **Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba** por su asistencia en electroespectroscopia UV-vis, gracias por transmitirme tus conocimientos y por la confianza que me diste.

A mi madre por su apoyo incondicional y su cariño en todos los días de mi vida. Gracias a ti soy todo lo que hasta este día me marca como persona.

A mi hermana Rosa Elba, porque con su ejemplo todos los días me hace una mejor persona.

A mi hermano Christian, quien siempre ha sido mi hombro en los momentos más difíciles.

A mi hermana Maria, quien con su ejemplo me enseñó el valor de la vida.

A Katy muchas gracias por enseñarme que la vida siempre puede ser mejor y compartir conmigo tantas experiencias que me han hecho madurar. Eres una gran amiga.

A Celso, por su paciencia y apoyo durante la realización de esta tesis.

A mis amigos Frantz, Juan, León, Laura, Ricardo, Martha, Sergio, Juan Carlos, Bianca, Mayis, Alma, Manuel, Daniel, Jimmy, Alan gracias porque con ustedes he compartido esta gran etapa de mi vida llamada universidad y por hacer mi vida más feliz todos los días.

INDICE GENERAL

	Página
I. LISTA DE ILUSTRACIONES	
II. GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	
III. INTRODUCCIÓN	
CAPÍTULO 1	1
ANTECEDENTES	
1.1 Actividad biológica de los compuestos nitro	3
1.2 Electroquímica de los grupos nitro	6
1.2.1 Comportamiento electroquímico de los grupos nitro en medio prótico	6
1.2.2 Comportamiento electroquímico de los grupos nitro en medios apróticos	7
1.3 Puente de hidrógeno	8
1.3.1 Asociación por puente de hidrógeno entre especies iónicas y neutras	11
1.4 HIPÓTESIS	12
1.5 OBJETIVO GENERAL	13
1.6 OBJETIVOS PARTICULARES	14
CAPÍTULO 2	15
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
2.1 Equipo y materiales.	16

2.2	Reactivos	18
2.3	Metodología	20
2.3.1	Voltamperometría cíclica	20
2.3.2	Coulometría	21
2.3.3	Espectroelectroquímica UV-vis	21
2.3.4	Simulación teórica de los espectros UV-vis	22
 CAPÍTULO 3		 23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
3.1	Nifurtimox	25
3.1.1	Análisis voltamperométrico de la reducción nifurtimox.	25
3.1.1.1	Variación de la velocidad de barrido	29
3.1.2	Reducción de nifurtimox en presencia de glutatión	33
3.1.2.1	Efecto de la concentración de glutatión	34
3.1.3	Reducción de nifurtimox en presencia de un donador de puente de hidrógeno	37
3.1.3.1	Efecto de la concentración de 2-propanol	37
3.1.4	Experimentos de coulometría de nifurtimox	39
3.1.5	Detección del anión radical nitro mediante espectroelectroquímica UV-vis	43
3.1.6	Simulación de los espectros UV-vis	46

3.2 Benznidazol	48
3.2.1 Estudio voltamperométrico de benznidazol	48
3.2.1.1 Variación de la velocidad de barrido	50
3.2.2 Estudio voltamperométrico de nitrobenceno	55
3.2.3 Reducción de benznidazol en presencia de glutatión	58
3.2.3.1 Efecto de la concentración de glutatión	59
3.2.4 Experimentos de coulometría de benznidazol	61
3.2.5 Detección del anión radical nitro mediante espectroelectroquímica UV-vis	63
3.2.6 Simulación de los espectros UV-vis	67
CAPÍTULO 4	69
CONCLUSIONES	
4.1 Perspectivas	71
CAPÍTULO 5	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXO A	76
A.I Enfermedad de Chagas	77
A.II Actividad biológica de nifurtimox	79
A.III Actividad biológica de benznidazol	81

ANEXO B	84
TÉCNICAS UTILIZADAS	
B.I Voltamperometría cíclica	85
B.II Coulometría	93
B.III Espectroelectroquímica UV-vis	95

I LISTA DE ILUSTRACIONES

	<i>Figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1.1	Estructura química de los fármacos: a) nifurtimox, b) benznidazol.	2
Figura 1.2	Serie de reacciones de intercambio de protones y electrones para compuestos nitroaromáticos.	5
Figura 1.3	Voltamperograma cíclico de 2-nitrofurano 1 mM en acetonitrilo velocidad de barrido 1 V s^{-1} .	8
Figura 1.4	Representación gráfica del puente de hidrógeno entre moléculas de agua.	9
Figura 1.5	Representación gráfica del puente de hidrógeno entre las bases nitrogenadas del ADN	10
Figura 2.1	Celda electroquímica con un sistema de tres electrodos.	16
Figura 2.2	Vista delantera del espectrofotómetro UV-vis.	17
Figura 2.3	Representación estructural de la pseudobiomolécula glutatión y de los compuestos nitro utilizados en este trabajo de investigación.	19
Figura 3.1	Representación estructural de nifurtimox.	25
Figura 3.2	Voltamperograma cíclico típico para nifurtimox 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs^{-1} . a) $E_{\lambda 1} = -1.65 \text{ V}$ y b) $E_{\lambda 2} = -1.15 \text{ V}$.	28

Figura 3.3	Mecanismo de reducción de los grupo nitro en medio aprótico.	28
Figura 3.4	Voltamperograma cíclico típico para nifurtimox 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidades de barrido. a) 0.1 Vs ⁻¹ , b) 0.4 Vs ⁻¹ , c) 1.0 Vs ⁻¹ .	29
Figura 3.5	Voltamperograma de nifurtimox 1mM en TFBTEA 0.1M en acetonitrilo E _{λ2} =-1.15 V. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidades de barrido: a) 0.1 Vs ⁻¹ , b) 0.4 Vs ⁻¹ , c) 1.0 Vs ⁻¹ .	30
Figura 3.6a	Representación gráfica de i_{pc} como función de $v^{1/2}$ para la onda Ic de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.	30
Figura 3.6b	Representación gráfica $i_{pc} v^{1/2} c^{-1}$ como función de $\log v$ para la onda Ic de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.	31
Figura 3.6c	Representación gráfica de i_{pa} / i_{pc} como función de la velocidad para la onda Ic de nifurtimox 1mM en acetonitrilo.	32
Figura 3.6d	Representación gráfica E _{pc} como función de $\log v$ para la onda Ic de nifurtimox 1mM en acetonitrilo.	32
Figura 3.7	Estructura de glutatión	33
Figura 3.8	Voltamperograma para nifurtimox 1mM con adiciones de glutatión en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs ⁻¹ : a) 0 mM de glutatión, b) 2 mM de glutatión, c) 4 mM de glutatión.	34
Figura 3.9	Representación estructural de 2-propanol.	37
Figura 3.10	Voltamperograma cíclico de nifurtimox 1 mM con adiciones de 2-propanol. Carbón vítreo como electrodo de trabajo: a) 0 M, b) 0.05232 M, c) 0.20928 M.	38

Figura 3.11	Coulometría de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.	39
Figura 3.12	Voltamperometría cíclica de nifurtimox 2 mM en acetonitrilo, con un potencial de inversión $E_{\lambda 2}$, de -1.150 V, para aislar la onda Ic: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis.	40
Figura 3.13	Voltamperograma de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.	41
Figura 3.14	a) Espectros de absorción ultravioleta-visible de nifurtimox, a diferentes tiempo de electrólisis, aplicando un potencial de $E = -0.97$ V en acetonitrilo, b) Ampliación de la zona de 500 a 900nm.	43
Figura 3.15a	Absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 402 nm.	44
Figura 3.15b	Absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 675 nm.	45
Figura 3.16	a) Espectros experimentales, b) Simulación teórica de acuerdo al programa Spartan'06, 1) nifurtimox neutro, 2) anión radical de nifurtimox.	47
Figura 3.17	Representación estructural de benznidazol.	48
Figura 3.18	Voltamperograma cíclico típico para benznidazol 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido de 0.1 Vs ⁻¹ : a) $E_{\lambda 1} = -1.8$ V, b) $E_{\lambda 2} = -1.1$ V.	49
Figura 3.19a	Voltamperograma cíclico típico para benznidazol 1mM en TFBTEA 0,1M en acetonitrilo, a diferentes velocidades de barrido. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. $E_{\lambda 1} = 2.2$ V: a) 0.1 Vs ⁻¹ , b) 0.5 Vs ⁻¹ , c) 1.0 Vs ⁻¹ .	51

Figura 3.19b	Voltamperograma cíclico típico para benznidazol 1mM en TFBTEA 0.1M en acetonitrilo, a diferentes velocidades de barrido. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. $E_{\lambda 2}=1.1$: a) 0.1 Vs^{-1} , b) 0.5 Vs^{-1} , c) 1.0 Vs^{-1} .	51
Figura 3.20	Mecanismo de reducción para el anión radical nitro aromático $R - \text{NO}_2^{\bullet -}$ a hidroxilamina $R - \text{NH} - \text{OH}$, en medio aprótico.	52
Figura 3.21a	Representación gráfica de i_{pc} como función de $v^{1/2}$ para la onda IIIc de benznidazol 1 mM en acetonitrilo.	52
Figura 3.21b	Representación gráfica $i_{pc} v^{1/2} \text{ c}^{-1}$ como función de $\log v$ para la onda IIIc de benznidazol 1 mM en acetonitrilo.	53
Figura 3.21c	Representación gráfica de i_{pa} / i_{pc} como función de la velocidad para la onda IIIc de benznidazol 1mM en acetonitrilo.	54
Figura 3.21d	Representación gráfica E_{pc} como función de $\log v$ para la onda IIIc de benznidazol 1mM en acetonitrilo.	54
Figura 3.22	Representación estructural de nitrobenzeno.	55
Figura 3.23	Voltamperograma de nitrobenzeno 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs^{-1} : a) $E_{\lambda 2} = -1.18 \text{ V}$, b) $E_{\lambda 1} = -1.7 \text{ V}$.	56
Figura 3.24	Mecanismo de reducción para el grupo nitro aromático en medio aprótico.	56
Figura 3.25	a) Voltamperograma de nitrobenzeno, b) Voltamperograma de benznidazol	57
Figura 3.26	Voltamperograma para benznidazol 1 mM con adiciones de glutatión en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo a 0.1 Vs^{-1} : a) 0 mM de glutatión, b) 2 mM de glutatión.	60

Figura 3.27	Coulometría de benznidazol 2.0 mM en acetonitrilo.	61
Figura 3.28	Voltamperometría cíclica de benznidazol 2 mM en acetonitrilo: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis.	62
Figura 3.29	Espectros de absorción ultravioleta-visible de benznidazol, a diferentes tiempo de electrólisis en un experimento de espectroelectroquímica UV-vis aplicando un potencial de $E = -0.97$ V: a) Espectro de benznidazol neutro a un tiempo de 0 s; b) 100 s, c) 200 s.	64
Figura 3.30	Gráfica de absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 320 nm asociada a la absorción de la molécula de benznidazol neutra.	65
Figura 3.31	Absorbancia vs. concentración a una longitud de onda de 500 nm.	66
Figura 3.32	a) Espectros experimentales, b) Simulación teórica de acuerdo al programa Spartan'06. 1) Benznidazol neutro, 2) Anión radical de benznidazol.	68
Figura B-1	Señal de excitación típica para la voltamperometría cíclica. E_{λ_i} = potencial de inicio, E_{λ_1} y E_{λ_2} = potenciales de inversión.	85
Figura B-2	Voltamperograma cíclico típico para una reacción reversible. E_{pc} = potencial de pico catódico, E_{pa} = potencial de pico anódico, I_{pc} = corriente de pico catódico, I_{pa} = corriente de pico anódico.	85
Figura B-3	Voltamperograma cíclico de 1mM O en electrolito soporte. Barrido de potencial vs. SCE. Perfiles de concentración-distancia.	88
Figura B-4	Voltamperogramas cíclicos representativos. (a) Proceso reversible. (b) Proceso irreversible. (c) Proceso con reacciones químicas acopladas.	91

II GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Amperios
c	Concentración
°C	Grados centígrados
-COOH	Grupo carboxilo
DH	Donador de puentes de hidrógeno
e	Electrón
EA	Electrodo auxiliar
ΔE_p	Diferencia de los potenciales de pico voltamperométricos
E	Potencial
ϵ	Coefficiente de absorción molar
E°	Potencial estándar
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
E_λ	Potencial de inversión
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EC	Mecanismo de una reacción electroquímica seguida por una química
ER	Electrodo de referencia
ESC	Electrodo saturado de calome

ET	Electrodo de trabajo
Et ₄ NBF ₄	Tetrafluoroborato de tetraetilamonio
F	Constante de Faraday. Cantidad de carga eléctrica en un mol de electrones. $F = 96,485 \text{ culombios mol}^{-1}$
ΔG^0	Energía libre de Gibbs estándar
GSH	Glutación forma reducida
i	Corriente
i_{pa}	Corriente de pico anódico
i_p	Corriente de pico voltamperométrico
<i>in situ</i>	Locución latina que significa en el lugar, utilizada para designar pruebas o determinaciones que se realicen en el lugar donde se lleva a cabo el fenómeno a estudiar
<i>in vitro</i>	Locución latina que significa en el vidrio, utilizada para designar pruebas de laboratorio realizadas en un tubo de ensayo.
<i>in vivo</i>	locución latina utilizada para designar pruebas de laboratorio en seres vivos
i_{pa}/i_{pc}	Relación de las corrientes de pico anódico y pico catódico
i_{pc}	Corriente de pico catódico
j	Densidad de corriente
J	Joules
K	Grados Kelvin

$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda de máxima absorción (nm)
M	Molar (mol por litro)
μA	Microamperios
mL	Mililitros
mM	Milimolar (milimoles por litro)
mV	Milivoltios
mV s^{-1}	Milivoltios por segundo
n_{ap}	Número aparente de electrones
n	Número de electrones intercambiados
$-\text{NH}_2$	Grupo amino
N_0	Número de moles de sustancia electroactiva
nm	Nanómetros
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
Pr(OH)	2-propanol
Q	Carga en culombios
R	Constante molar de los gases ($8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
R-NHOH	Hidroxilamina
R-NO	Nitroso
R-NO ₂	Compuesto nitro aromático
$\text{R-NO}_2^{\bullet-}$	Anión radical
-OH	Grupo funcional hidroxilo

ROS	Especies reactivas de oxígeno
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
V	Voltios
V	Volumen
ν	Velocidad de barrido de potencial (Vs^{-1})
VC	Voltamperometría cíclica
vis	Visible
$\nu^{1/2}$	Raíz cuadrada de la velocidad de barrido

III INTRODUCCIÓN

El *Tripanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, que afecta aproximadamente a 24 millones de personas desde California Meridional hasta Argentina y Chile.¹ Esta enfermedad es considerada un problema de salud pública en América Latina tomando el segundo lugar después de la malaria en mortalidad. Actualmente esta patología se trata con agentes nitroheterocíclicos tales como nifurtimox y benznidazol, pero esta quimioterapia es todavía inadecuada debido a que causa toxicidad sistemática y efectos adversos tales como anorexia y depresión del sistema nervioso central.² Además hay reportes de mutagénesis y daño al ADN en ciertas bacterias por parte del nifurtimox, debido a esto es necesario tener un mayor conocimiento de cómo estos fármacos interactúan con los componentes celulares.

Para clarificar la acción citotóxica de benznidazol y nifurtimox se investigó la reducción electroquímica de ambos fármacos en medio aprótico y se comparó su comportamiento electroquímico en presencia de la pseudobiomolécula glutatión con el propósito de investigar cual de los intermediarios electrogenerados es susceptible de interactuar con esta molécula.

La etapa inicial del estudio consistió en realizar un examen cualitativo del comportamiento rédox de ambos fármacos mediante voltamperometría cíclica en medio aprótico. Se hizo un análisis de los parámetros voltamperométricos: potencial de pico, E_p , corriente de pico, i_p y potencial de media onda, $E_{1/2}$ y se encontró que en medio aprótico estos compuestos muestran el comportamiento típico de los nitroaromáticos, en

medio aprótico. Dos ondas de reducción, la primera correspondiente al par redox nitro neutro-anión radical $NO_2 / R-NO_2^{\bullet-}$, en el que el grupo nitro se reduce al anión radical, vía la transferencia de un electrón y la segunda al par anión radical-hidroxilamina $R-NO_2^{\bullet-} / R-NH-OH$, en el que el anión radical nitro se reduce a la hidroxilamina correspondiente, vía tres electrones y cuatro protones. No se encontraron complicaciones cinéticas debidas a reacciones de autoprotonación.

En la segunda etapa se hizo un análisis voltamperométrico del efecto de la concentración de glutatión, para caracterizar las asociaciones intermoleculares entre éste y las especies reducidas de los fármacos. Se encontró que sólo el dianión nitro de benznidazol fue lo suficientemente básico para interactuar, vía una asociación por puente de hidrógeno, con la pseudobiomolécula glutatión.

Se realizó coulometría a potencial controlado para obtener información sobre la estabilidad del anión radical a escalas de tiempo grandes (minutos) y confirmar el número de electrones aparente n_{ap} involucrados en la formación del anión radical. Los resultados de estos experimentos mostraron que a tiempos grandes, el anión radical de estos compuestos experimenta múltiples reacciones que no permitieron detectar el n_{ap} .

Para la detección del anión radical $R-NO_2^{\bullet-}$ relacionado con la acción citotóxica de ambos fármacos, se empleó la espectroscopía UV-vis acoplada a la técnica electroquímica de electrólisis preparativa.³ Con estos experimentos fue posible detectar al anión radical nitro de nifurtimox y benznidazol a una longitud de onda de $\lambda = 675$ nm y $\lambda = 500$ nm respectivamente.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1. Antecedentes

Los antichagásicos de interés en este trabajo de investigación, nifurtimox y benznidazol (figura 1.1), poseen en su estructura un grupo nitro, $-\text{NO}_2$, cuya reducción constituye la base de su aplicación clínica. Su actividad biológica y sus efectos citotóxicos se han asociado con las especies derivadas de la electroreducción del grupo nitro en medios fisiológicos.

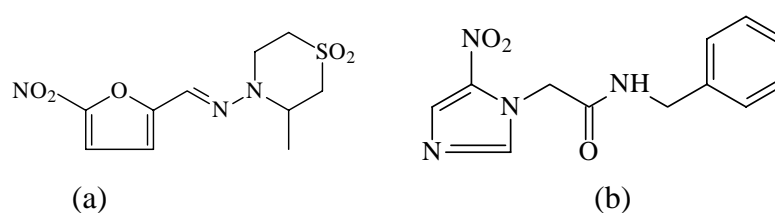


Figura 1.1 Estructura química de los fármacos:
a) nifurtimox, b) benznidazol

1.1 Actividad biológica de los grupos nitro

Numerosos compuestos nitroaromáticos son manufacturados para su uso en la industria farmacéutica. Los principales usos farmacéuticos de estos compuestos son como agentes antibacteriales, antiprotozoarios y anticancerígenos.⁵ El tipo de propiedades biológicas de los diferentes nitrocompuestos depende de la facilidad con la que el grupo nitro sufre procesos de reducción intracelularmente, durante su biotransformación a la amina correspondiente.⁶⁻⁷ Por ejemplo, los nitroimidazoles son selectivamente tóxicos sobre bacterias y protozoarios anaerobios, ya que el grupo nitro acepta electrones en potenciales que en células aeróbicas no son posibles de generar. Otros nitrocompuestos tienen acción tripanomicida cuando existen flavoproteínas en el medio que permiten la reducción del nitrocompuesto.⁸

La desventaja de usar estos compuestos es debido a que durante su reducción se genera el anión radical nitro, $R - NO_2^{\bullet-}$, una especie reactiva que exhibe citotoxicidad en varios sistemas celulares, incluyendo las células de los mamíferos, los protozoarios y las bacterias.⁹ Una de las posibles vías de acción de este anión radical es a través de la interacción con las hebras helicoidales del ADN, causando daños al oxidar la doble hélice.¹⁰ Otra posibilidad es que este anión radical genere especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno al transferir electrones al oxígeno molecular, las cuales pueden causar daño celular directamente por reaccionar con diversas macromoléculas biológicas tales como los lípidos, el DNA y las proteínas, o indirectamente por la generación de radicales hidroxilo altamente reactivos.¹¹⁻¹²

Sin embargo el anión radical no es el único intermediario que presenta efectos citotóxicos, ya que diversos experimentos *in situ* han demostrado que la hidroxilamina formada durante la reducción de los nitroimidazoles causa daño al ADN.¹³ Los diversos intermediarios, generados son una consecuencia directa de los complejos esquemas de reacción que presentan los procesos de reducción, ya que el nitro es capaz de aceptar hasta seis electrones para su completa reducción a la amina correspondientes, como se ha observado en el caso de la reducción electroquímica de los nitroaromáticos (figura 1.2).¹⁴

El conocimiento de las características redox de los compuestos nitroaromáticos y sus intermediarios, llega a ser relevante para anticipar sus efectos tóxicos en sistemas biológicos, ya que diversos estudios han demostrado que los potenciales de reducción del grupo nitro están correlacionados con la actividad antimicrobiana de estos compuestos.¹⁵

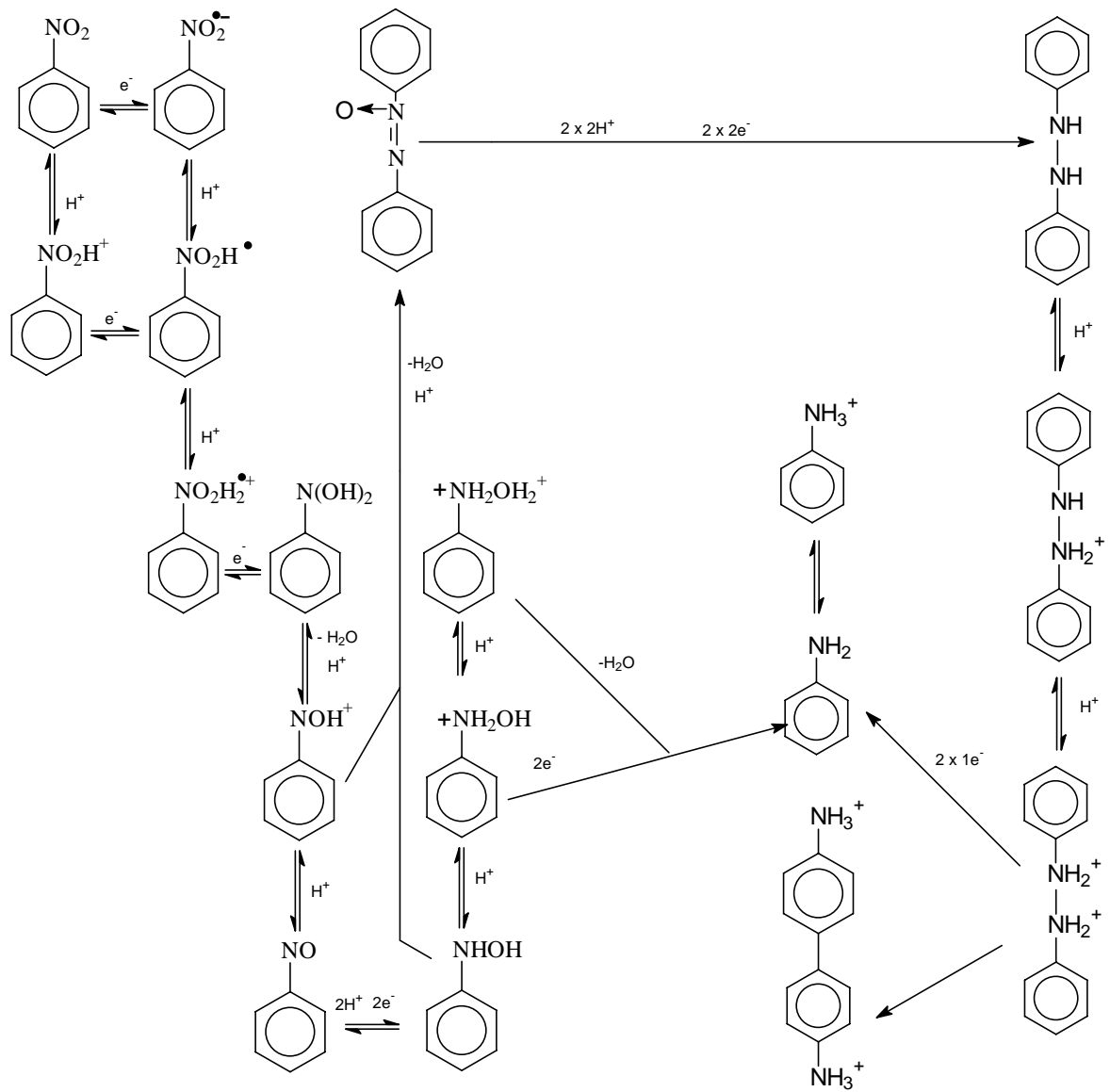


Figura 1.2 Serie de reacciones de intercambio de protones y electrones para compuestos nitroaromáticos.

1.2 Electroquímica de los grupos nitro

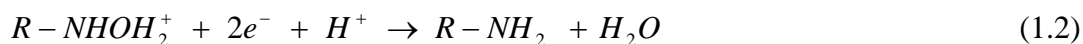
Los estudios electroquímicos de los mecanismos de reducción de los compuestos nitroaromáticos comenzaron desde principios del siglo veinte, una parte de estos estudios involucro el uso de mezclas de disolventes no acuosos y soluciones acuosas, para determinar la estabilidad de los intermediarios electrogenerados. Se encontró que la reducción de estos compuestos depende de la naturaleza del medio de reacción y de su estructura química.¹⁶ Por lo que es importante tener una visión general del comportamiento electroquímico de los nitro en medios próticos y apróticos.

1.2.1 Electroquímica de los compuestos nitro en medio prótico

Para caracterizar el comportamiento rédox de los compuestos nitro y para estudiar los mecanismos de sus reacciones rédox, se han realizado varios estudios voltamperométricos en medios próticos, encontrando que la reducción de los compuestos nitro, puede presentar una o dos ondas de reducción dependiendo de las condiciones del medio de trabajo. La reducción de los compuestos nitroaromáticos en soluciones acuosas presenta una primer onda, la cual se ha asignado a la reducción del grupo nitro, vía la adición de cuatro electrones y cuatro protones, para dar como resultado la formación de la hidroxilamina correspondiente (ecuación 1.1).



En medios ácidos, el derivado hidroxilamina es además reducido a su amina correspondiente en un segundo paso, vía la adición de dos electrones y dos protones.¹⁷



1.2.2 Electroquímica de los compuestos nitro en medio aprótico

Los estudios realizados del comportamiento voltamperométrico de los compuestos nitro, sin protones ácidos en su estructura química, en medios apróticos han dado a conocer la formación del anión radical nitro bajo diferentes condiciones de trabajo. La reducción del nitro en este medio genera dos procesos catódicos, representadas como dos ondas de reducción (figura 1.3). La primera onda se asigna a la reducción del grupo nitro a anión radical nitro, vía la transferencia de un electrón. La segunda onda se atribuye a la formación de la hidroxilamina, por la reducción del anión radical, vía tres electrones y cuatro protones, pasando por la especie dianión nitro, $R-NO_2^{2-}$, una especie de carácter básico, formada por la transferencia de un electrón al anión radical.

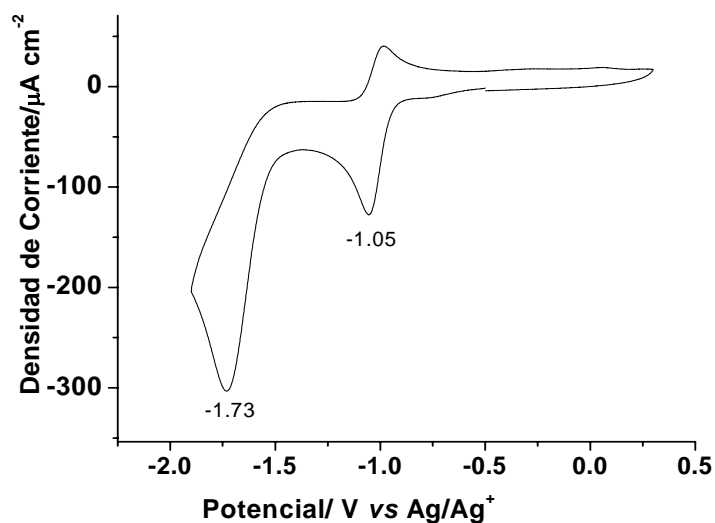


Figura 1.3 Voltamperograma cíclico de 2-nitrofurano 1 mM en acetonitrilo velocidad de barrido 1 Vs⁻¹.

El mecanismo de reducción general se representa a continuación (ecuación 1.3 y 1.4)



1.3 Puente de Hidrógeno

Entre las fuerzas que participan o que favorecen los procesos de asociación entre moléculas orgánicas o inorgánicas, se encuentran atracciones electrostáticas entre sitios con carga opuesta del tipo ión-ión y dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals, efectos hidrofóbicos y puentes de hidrógeno.¹⁸

Los puentes de hidrógeno son interacciones moleculares del tipo no covalente (figura 1.4a) que se forman por átomos de hidrógeno localizados entre átomos electronegativos. Cuando un átomo de hidrógeno está unido covalentemente a un átomo electronegativo como el oxígeno o el nitrógeno, asume una densidad (δ) de carga positiva, debido a la elevada electronegatividad del átomo vecino. Esta deficiencia parcial en electrones, hace a los átomos de hidrógeno susceptibles de atracción por los electrones no compartidos de los átomos de oxígeno o nitrógeno. Así que el puente de hidrógeno es un tipo de atracción dipolar particularmente fuerte, más de 40 kJ mol^{-1} , en el cual un átomo de hidrógeno hace de puente entre dos átomos electronegativos, sujetando al primero con un enlace covalente (donador de puente de hidrógeno) y al otro (aceptor de puente de hidrógeno) con fuerzas puramente electrostáticas.¹⁹⁻²⁰

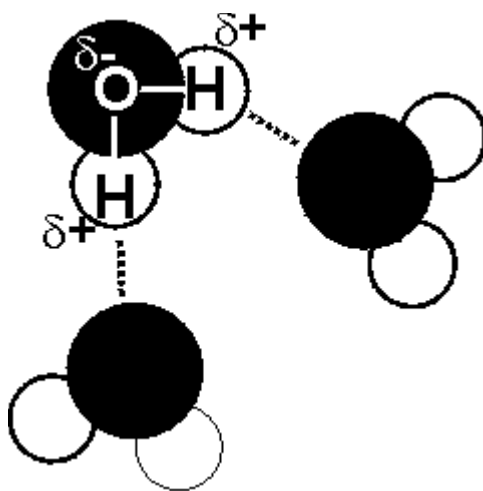


Figura 1.4 Representación gráfica del puente de hidrógeno entre moléculas de agua.

Este tipo de enlace se presenta ampliamente en sistemas químicos-biológicos formando parte del reconocimiento molecular entre las dos cadenas poliméricas que forman el ADN así como entre substratos con sus receptores.¹⁹ Según los estudios de Watson y Crick la unión de las cadenas poliméricas del ADN se realizan mediante puentes de hidrógeno entre los nucleótidos que lo componen (figura 1.4b), los cuales a su vez están formadas por una base nitrogenada, un azúcar denominada desoxirribosa y un grupo fosfato. Otra característica de gran importancia, es la participación del puente de hidrógeno en la formación de la estructura terciaria del ADN, ya que da estabilidad a la doble hélice.²¹

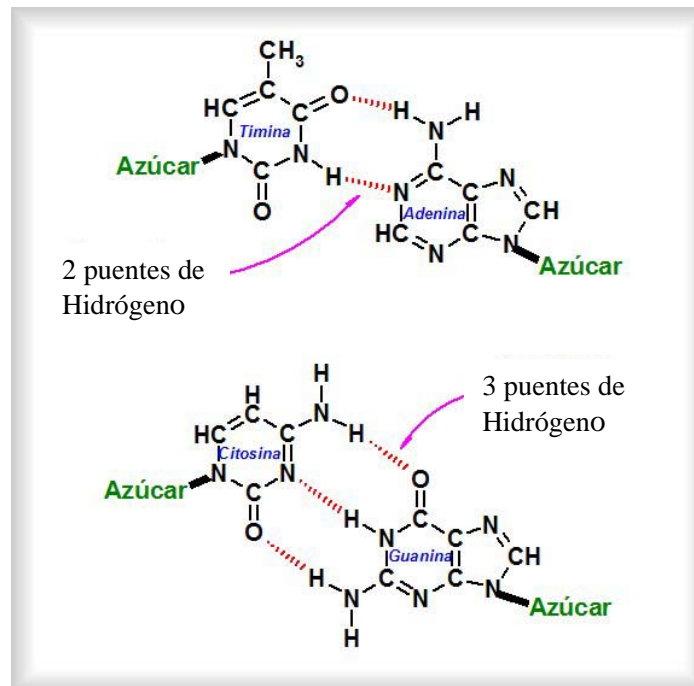


Figura 1.5 Representación gráfica del puente de hidrógeno entre las bases nitrogenadas del ADN.

1.3.1 Asociación por puente de hidrógeno entre especies iónicas y neutras

Para estudiar las interacciones por puente de hidrógeno que involucran especies cargadas difíciles de aislar, se utilizan técnicas electroquímicas acopladas con técnicas espectroscópicas que permiten caracterizar los iones generados *in situ*. Estos tipos de acoplamientos tienen como ventaja el permitir estudiar la formación de puentes de hidrógeno entre las especies en sus diferentes grados de oxidación (-, 0, +).

El estudio de las asociaciones por puente de hidrógeno entre sistemas tipo anión-neutro se ha realizado utilizando la técnica de voltamperometría cíclica, basándose en la observación de los cambios en la posición del pico voltamperométrico en función de la concentración del donador de puente de hidrógeno (DH).²²

Los modelos utilizados para describir cuantitativamente la asociación entre un producto rédox y un donador de puente de hidrógeno, se basan en las variaciones de potencial de media onda del proceso rédox.²³ Por ejemplo el modelo de asociación en el que las bases electrogeneradas no están protonadas y se observa que su comportamiento voltamperométrico permanece reversible. En el caso contrario, si el donador DH es lo suficientemente ácido como para protonar a los aniones electrogenerados, el mecanismo cambia, lo cual se ve reflejado en cambios en los potenciales de pico catódico y en la irreversibilidad de los procesos.²⁴

HIPÓTESIS

Si se ha propuesto que el anión radical nitro u otra especie electrogenerada, durante la electroreducción de los fármacos nifurtimox y benznidazol en ambientes biológicos, puede ser el causante de la actividad antichagásica de éstos. Entonces, es de esperarse que la adición controlada de una pseudobiomolécula a estos compuestos pueda distinguir, vía cambios en el potencial y corriente de la primera o segunda ondas de reducción, cual es la especie nitro con la que la pseudobiomolécula está interaccionando.

OBJETIVO GENERAL

Determinar cual es la especie anión radical o dianión nitro provenientes de la reducción electroquímica de nifurtimox o benznidazol, con la que interactúa la pseudobiomolécula glutatión, la cual simula el ambiente biológico de una proteína.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Caracterizar electroquímicamente a los nitroheterociclos Nifurtimox y Benznidazol mediante voltamperometría cíclica en medio aprótico
- 2.- Investigar la estabilidad del anión radical en medio aprótico a tiempos cortos, a escala de segundos vía voltamperometría cíclica y a tiempos largos a una escala de minutos vía coulombimetría
- 3.- Determinar las modificaciones en los procesos de electroreducción del grupo nitro de los fármacos nifurtimox y benznidazol, en presencia de la pseudobiomolécula glutatión para dilucidar el intermediario reactivo anión radical o dianión con el que interactúa la pseudobiomolécula e investigar la naturaleza de la interacción. Si ésta es una interacción supramolecular del tipo puente de hidrógeno o vía una protonación directa.
- 4.- Detectar al anión radical nitro a potencial controlado en medio aprótico por espectroelectroquímica UV-vis.

Capítulo 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Equipo y materiales

Los experimentos de voltamperometría cíclica, se realizaron empleando un potenciostato Autolab PGSTAT100 conectado a una computadora personal para el almacenamiento de datos registrados por un software GPES. Se utilizó un arreglo de tres electrodos (figura 2.1), como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo de 0.2827mm^2 de superficie, un alambre enrollado de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de plata-cloruro de plata en solución acuosa como electrodo de referencia (BAS). El electrodo de trabajo se pulió antes de cada medición utilizando pasta de alúmina de Bühler de $0.5\mu\text{m}$.

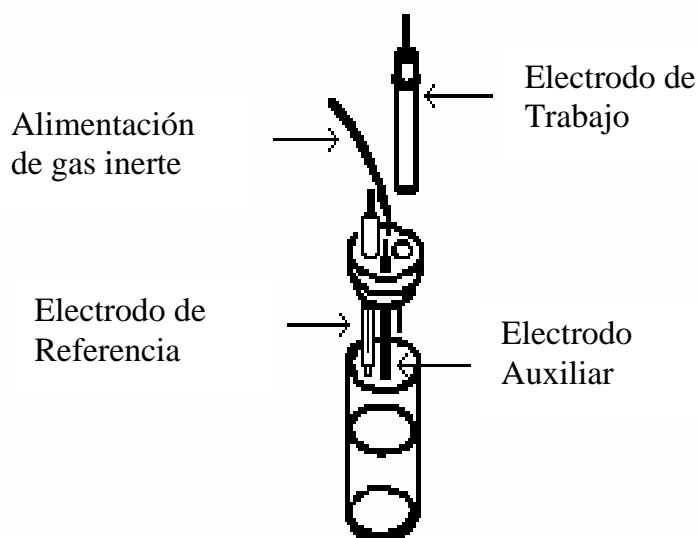


Figura 2.1 Celda electroquímica con un sistema de tres electrodos.

Los experimentos de coulometría se realizaron en una celda que consta de tres electrodos, como electrodo de trabajo se utilizó un macroelectrodo de platino, un electrodo de plata-cloruro de plata en solución acuosa como electrodo de referencia (BAS), y como electrodo auxiliar un alambre enrollado de platino, que se colocó en un compartimiento especial separado de la disolución de trabajo por un disco de vidrio poroso.

La espectroscopia UV-vis se realizó en un espectrofotómetro de UV-vis Agilent 8453 de arreglo de diodos (figura 2.2) acoplado a un Potenciostato/Galvanostato modelo Epsilon de Bioanalytical Systems Inc. BAS 100B/W. Se utilizaron como electrodo de trabajo una malla de platino, un electrodo de platino como electrodo auxiliar (BAS) y un electrodo de plata-cloruro de plata como electrodo de referencia (BAS). Se utilizó una celda de cuarzo con 1mm de paso óptico.

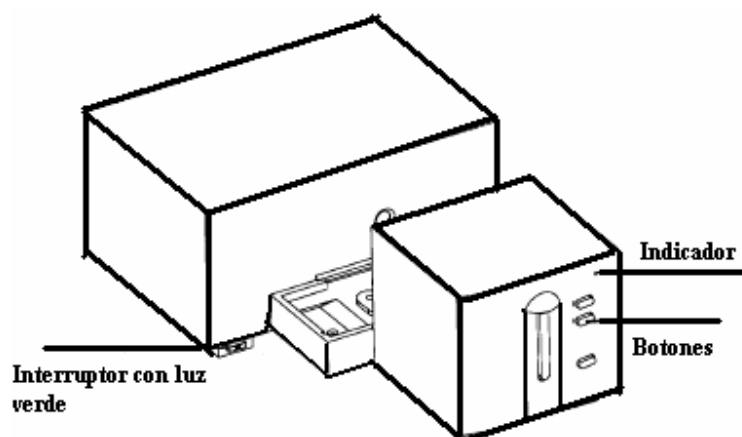


Figura 2.2 Vista delantera del espectrofotómetro UV-vis

2.2 Reactivos

Los medicamentos utilizados son; nifurtimox 4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido extraído de la forma farmacéutica Lampit y benznidazol (N-benzil-2 nitro-1H-imidazol-5-ylacetamida), de Aldrich Chem. La pureza de estos compuestos se comprobó por medio de cromatografía de capa fina. El nitrobenzenceno fue purificado por sublimación al vacío. La pseudobiomolécula glutatión se obtuvo de SIGMA, en su forma reducida $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ (Glu-Cys-Gly: GSH). El electrolito soporte utilizado, tetrafluoroborato de tetraetilamonio, Et_4NBF_4 , (99% Aldrich), se purificó por recristalización de par de disolventes metanol-hexano, se secó al vacío con un rotavapor Büchi a una temperatura de 50 °C y una presión de 3mmHg durante 8 horas. Como disolvente se utilizó acetonitrilo (CH_3CN Aldrich), el cual fue destilado en presencia de pentóxido de fósforo (P_2O_5 Aldrich) para remover trazas de humedad. Se usó nitrógeno de ultra alta pureza marca Praxair.

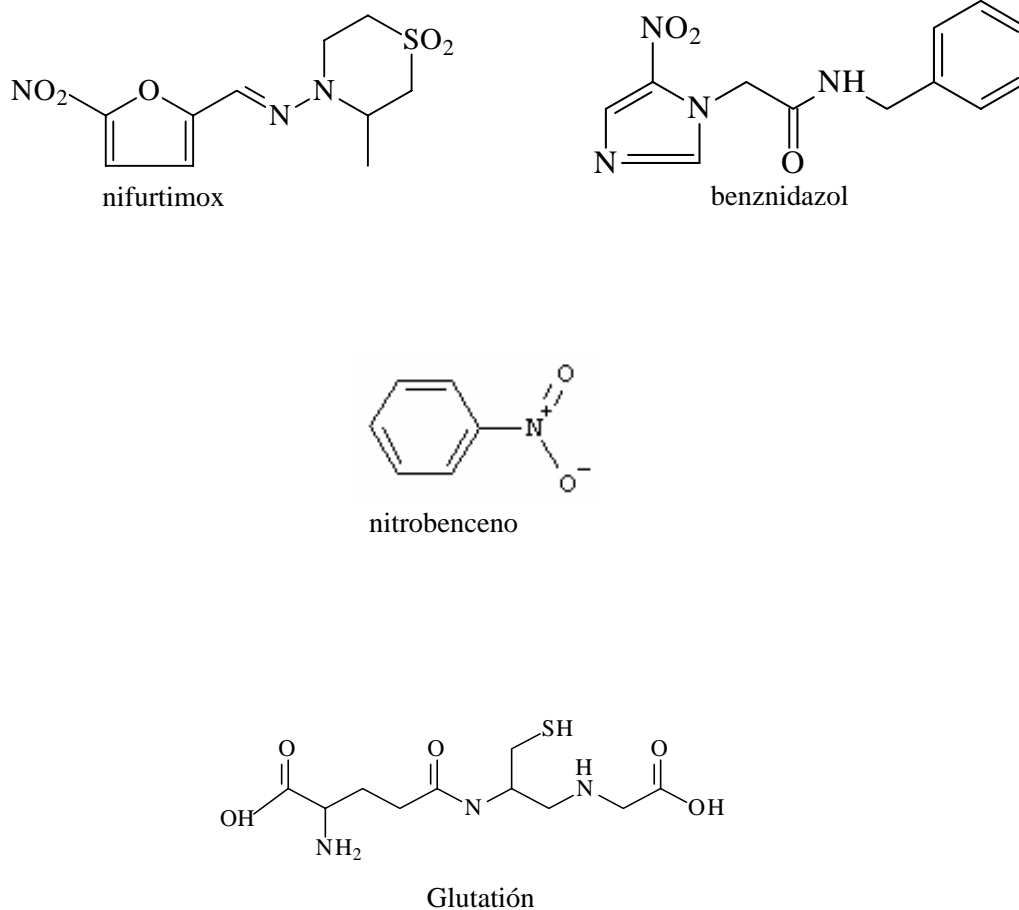


Figura 2.3 Representación estructural de la pseudobiomolécula glutathión y de los compuestos nitro utilizados en este trabajo de investigación.

2.3 Metodología

2.3.1 Voltamperometría cíclica

Como medio electrolítico se utilizó una solución de tetrafluoroborato de tetraetilamonio (TFBTEA) 0,1M en acetonitrilo, a la cual se le hizo pasar una corriente de nitrógeno. Después de verificar la ausencia de respuestas de óxido-reducción en el medio electrolítico, éste se utilizó para preparar las disoluciones 1mM de los analitos, las cuales se burbujearon con N₂ durante 10 minutos antes de realizar los experimentos. Las adiciones de la solución de la pseudobiomolécula glutatión, se realizaron en el orden de microlitros µl.

El electrodo de referencia se colocó en acetonitrilo durante 30 minutos antes de ser utilizado para minimizar el potencial de unión líquida. En la realización de los experimentos la disolución se mantuvo en reposo y se empleó un intervalo de velocidades de barrido de 100 a 10000 mV/ s. Como análisis preliminar se obtuvo la ventana de electroactividad del sistema electrolito-disolvente, la cual se encontró en el intervalo de -2000 a 1000mV referido al potencial plata-cloruro de plata Ag/Ag⁺. Los barridos se iniciaron en sentido negativo, y se realizaron dos ciclos de perturbación.

En este estudio de VC se hizo uso de la técnica de corte entre picos (*wave clipping*) para la asignación de los picos catódico y anódico correspondientes.

2.3.2 Coulometría

La concentración empleada de los fármacos para este tipo de experimentos fue de 2 mM. En este trabajo, el potencial de electrólisis se seleccionó 10 mV más negativo del potencial de reducción de la primera onda para garantizar la reducción del nitro a anión radical nitro. Con el propósito de electrolizar toda la muestra presente, la solución se agitó permanentemente con un agitador magnético y fue burbujeada con nitrógeno durante el transcurso del experimento.

2.3.3 Espectroelectroquímica UV-vis.

Se midió un blanco del medio electrolítico en la espectroscopia UV-vis, obteniéndose el espectro del analito 1mM antes de ser sometido a la electrólisis. El potencial aplicado para llevar a cabo la electrólisis fue 10 mV más negativo que el potencial de reducción de la primera onda. Se realizaron los experimentos espectroelectroquímicos registrando los espectros UV-vis a intervalos regulares de tiempo durante la electrólisis.

2.3.4 Simulación teórica de los espectros UV-vis

La optimización de la geometría y los cálculos de frecuencia se llevaron a cabo de acuerdo a la teoría funcional de la densidad (DFT) usando el nivel B3LYP/6-316* con el programa Spartan'06. Para los aniones radicales se utilizó el método no restringido. La optimización estructural fue seguida por cálculos de frecuencia para asegurar que no hay frecuencias imaginarias.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Resultados y discusión

En este trabajo de investigación, se presenta un estudio *in situ* mediante voltamperometría cíclica y coulombimetría del comportamiento electroquímico de los antichagásicos, nifurtimox y benznidazol en presencia y ausencia de la pseudo-biomolécula glutatión que simula un ambiente biológico a nivel del componente celular, proteína. Este análisis comparativo se hizo con el propósito de determinar las modificaciones en los procesos de electroreducción del grupo nitro en presencia del glutatión. Se prestó una particular atención al par $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$ el cual se ha informado, juega un papel importante en la actividad antichagásica de los fármacos. Un conocimiento de las propiedades electroquímicas es esencial para un mejor entendimiento de la actividad biológica y de las propiedades de los radicales libres generados durante los procesos de biotransformación de este tipo de compuestos.²⁵⁻²⁶ Se pretende que la información obtenida en este trabajo pueda ser utilizada, más adelante, en la comprensión de los principales sitios de acción de estos fármacos en células humanas y en el diseño de nuevos antichagásicos con menos daños secundarios.

3.1 NIFURTIMOX

Como se ha mencionado el mecanismo de acción y el efecto tóxico del nifurtimox (figura 3.1) es a través de la generación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos formados durante la reducción intracelular de su grupo nitro a amino, los cuales pueden interactuar con diferentes macromoléculas biológicas tales como los lípidos, el DNA y las proteínas.²⁷ La voltamperometría cíclica permite electrogenerar y caracterizar *in situ* estos radicales libres, por ello empleamos esta técnica en el estudio de nifurtimox.

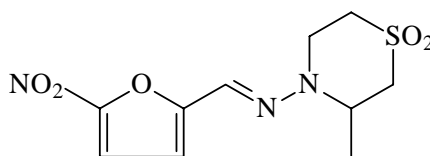


Figura 3.1 Representación estructural de nifurtimox.

3.1.1 Análisis voltamperométrico de nifurtimox.

El nifurtimox 4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido es un compuesto nitroheterocíclico, cuyas propiedades voltamperométricas se estudiaron en medio aprótico polar de acetonitrilo. El voltamperograma cíclico obtenido a 0.1 Vs^{-1} muestra durante el primer barrido que se inició en 0.0 V hacia un potencial negativo de -1.65 V , $E_{\lambda 1}$, dos picos catódicos localizados en -0.961 V y -1.36 V (figura 3.2a). Al invertir el sentido del potencial se encontró que el pico más catódico, no muestra un pico anódico

correspondiente bien definido por lo que se deduce que la reacción de reducción es irreversible debido a que el (o los) intermediario(s) formados durante el paso de transferencia del electrón dan lugar a reacciones químicas acopladas.

Se hizo otro voltamperograma cíclico teniendo un potencial de cambio, $E_{\lambda,2}$, de -1.150 V. Este barrido se para aislar el primer pico catódico correspondiente a la reducción del grupo nitro y detectar la presencia de sus picos anódicos asociados. Cuando se llevó a cabo el experimento de voltamperometría cíclica usando $E_{\lambda,2}$ (figura 3.2b) se observó un pico catódico, i_c , a -0.961 V y su correspondiente pico anódico, i_a , en -0.903 V presentando una relación de corrientes, i_{pa}/i_{pc} , entre la corriente de pico anódico, i_{pa} , y la corriente de pico catódico, i_{pc} , de 0.94 el cual está cercano al valor de 1 característico de un sistema reversible.²⁸ Así mismo, se detectó una separación en los potenciales de pico, $\Delta E_p = E_{pa} - E_p$ igual a 0.058 V que está cercano al valor de 0.060 V, característico de un par redox en el cual ambas especies intercambian electrones rápidamente con el electrodo de trabajo.²⁹ Este resultado concuerda con el mecanismo propuesto (ecuación 3.1) de una transferencia monolectrónica reversible asociada al par redox nitro neutro-anión radical $NO_2 / R - NO_2^{\bullet-}$, en el que el grupo nitro se reduce al anión radical, el cual a su vez se oxida en el barrido inverso para regenerar al nitro neutro.

Un voltamperograma en el cual se hizo el barrido de 0.0 V a $E_{\lambda 21} = -1.65$ V presentó un segundo pico catódico, IIc, en -1.366 V correspondiente a la formación de la hidroxilamina. A este pico se le asocian dos picos anódicos, IIa, en -1.23 V y IIa' en -0.728 V observados durante el barrido de retorno.

Los picos IIa y IIa' se deben a la oxidación de los productos obtenidos del pico catódico IIc, como consecuencia de las reacciones químicas acopladas de los intermediarios formados a ese potencial. Se ha reportado que el pico IIc corresponde a la reducción del anión radical formado en la ecuación 3.1 a través de múltiples pasos de transferencia de tres electrones y cuatro protones (ecuación 3.2 a 3.5), según lo reportado en la literatura para este tipo de compuestos. Entre los diferentes intermediarios que se forman se encuentra el dianión nitro, el cual es un intermediario fuertemente básico.

Para corroborar el número de electrones intercambiados en la onda IIc se obtuvo la relación de corrientes, i_{pIc} / i_{pIIc} , entre los picos de reducción Ic y IIc, encontrándose un valor cercano a 2.2, que es el observado para el nitrobenzono, el compuesto nitroaromático más simple.³⁰ Aun cuando la relación no es exactamente 1:3 esta relación de corrientes se ha asignado al intercambio de un electrón en la primera onda de reducción de los nitrocompuestos y a tres electrones en la segunda onda.

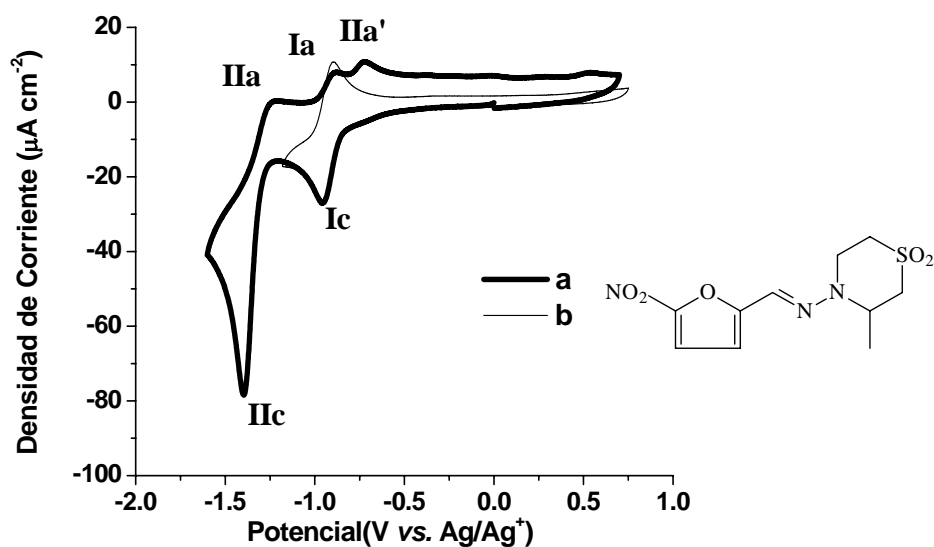


Figura 3.2 Voltamperograma cíclico típico para nifurtimox 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs⁻¹. a) E_{λ1} = -1.65 V y b) E_{λ2} = -1.15 V.

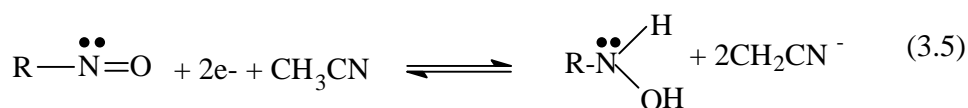
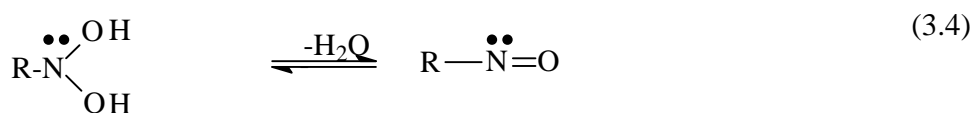
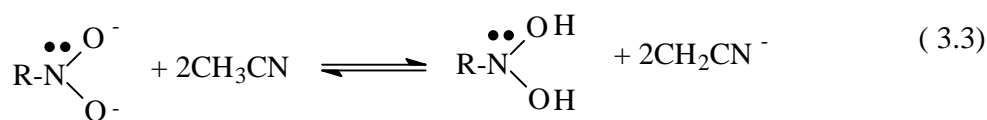
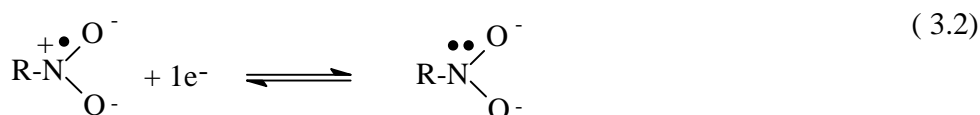
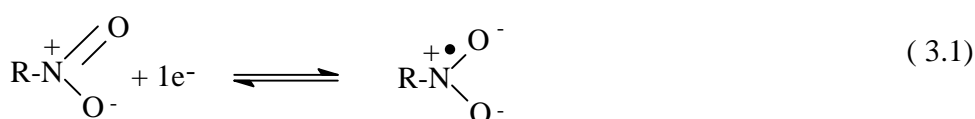


Figura 3.3 Mecanismo de reducción de los grupo nitro en medio aprótico

3.1.1.1 Variación de la velocidad de barrido

Para obtener información sobre la estabilidad del anión radical del nifurtimox al cual se le atribuye la actividad farmacológica antichagásica, se realizó la voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido (figura 3.4-5) evaluando para la onda Ic los parámetros de las corrientes de pico anódico y catódico, así como sus correspondientes potenciales de pico. La onda IIc se sabe corresponde a un sistema irreversible, por lo que no se realizó un análisis voltamperométrico para esta onda.

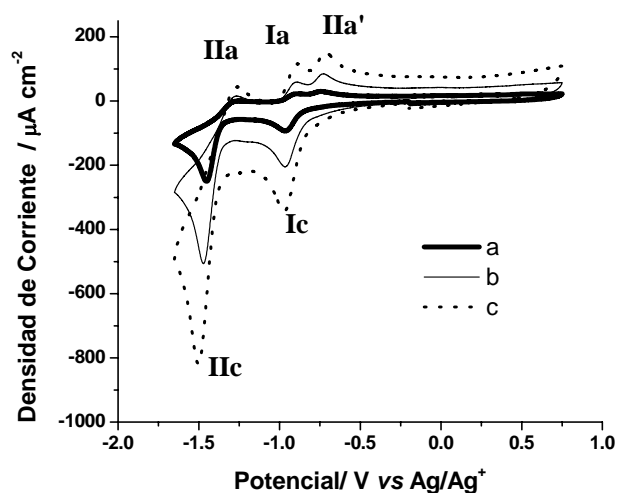


Figura 3.4 Voltamperograma cíclico típico para nifurtimox 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidades de barrido. a) 0.1 Vs^{-1} , b) 0.4 Vs^{-1} , c) 1.0 Vs^{-1} .

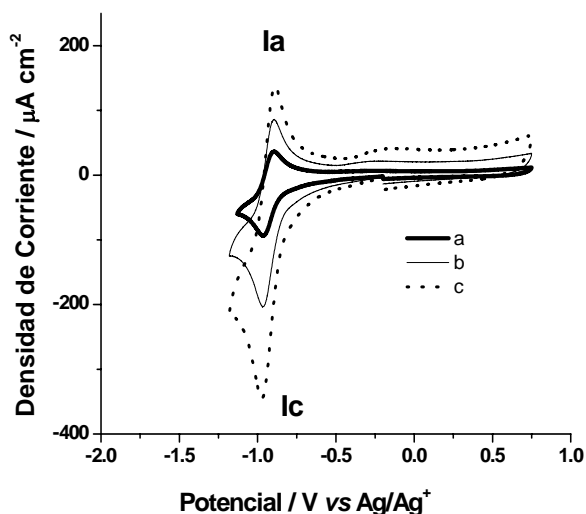


Figura 3.5 Voltamperograma de nifurtimox 1mM en TFBTEA 0.1M en acetonitrilo $E_{\lambda 2} = -1.15$ V. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidades de barrido: a) 0.1 Vs^{-1} , b) 0.4 Vs^{-1} , c) 1.0 Vs^{-1} .

Al representar i_{pc} vs $v^{1/2}$ (figura 3.6a) para la onda de reducción I_c correspondiente al par redox $R\text{-NO}_2/R\text{-NO}_2^{*-}$, se observó una tendencia lineal con ordenada al origen cercana a cero, lo que indica que la onda I_c presenta un comportamiento característico de un sistema controlado por difusión.²⁹

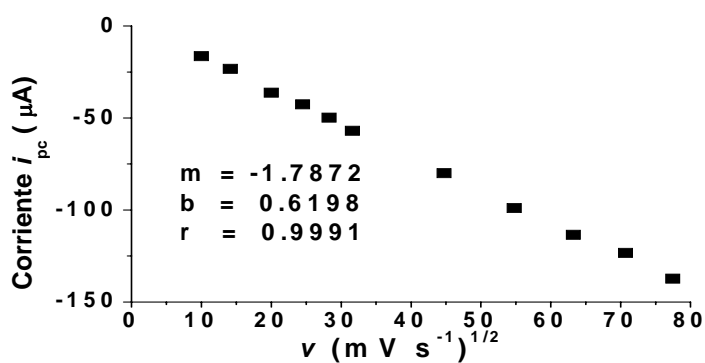


Figura 3.6a Representación gráfica de i_{pc} como función de $v^{1/2}$ para la onda I_c de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.

La gráfica de función corriente $i_{pc} v^{-1/2} c^{-1}$ vs $\log v$ (figura 3.6b) para la onda Ic, donde c es la concentración en mol cm^{-3} de nifurtimox, muestra un valor constante para esta función a las diferentes velocidades de barrido. Ésto indica que en la escala de tiempo del experimento voltamperométrico la primera onda de reducción, Ic, corresponde a un sistema reversible sin reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de electrones en la formación del anión radical.

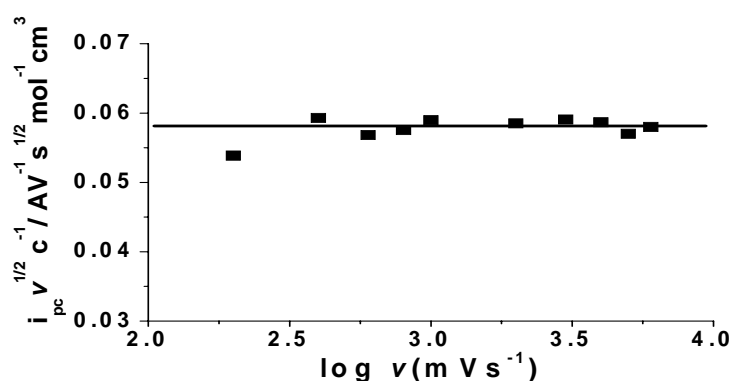


Figura 3.6b Representación gráfica $i_{pc} v^{-1/2} c^{-1}$ como función de $\log v$ para la onda Ic de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.

La gráfica de i_{pa}/i_{pc} vs v (figura 3.6c) muestra una línea recta con pendiente de cero característica inequívoca de un sistema reversible.²⁹ El hecho de que la relación i_{pa}/i_{pc} tenga un valor cercano a 1 a las diferentes velocidades de barrido indica que el anión radical es una especie estable es decir, que la misma cantidad de especie nitro que se reduce se puede reoxidar en el barrido inverso de potencial (ecuación 3.6).

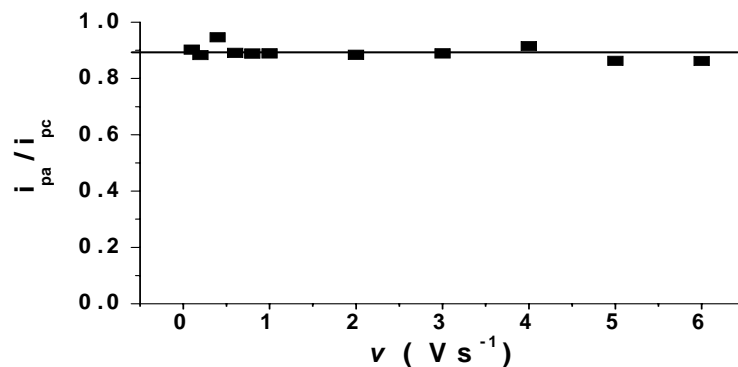


Figura 3.6c Representación gráfica de i_{pa} / i_{pc} como función de la velocidad para la onda Ic de nifurtimox 1mM en acetonitrilo.



La gráfica de E_{pc} vs. $\log v$ da información acerca de la rapidez de la transferencia de electrones en el sistema. El valor de E_{pc} (figura 3.6d) permanece constante a las diferentes velocidades de barrido lo que indica que el sistema es rápido y sin complicaciones cinéticas en la transferencia de electrones.

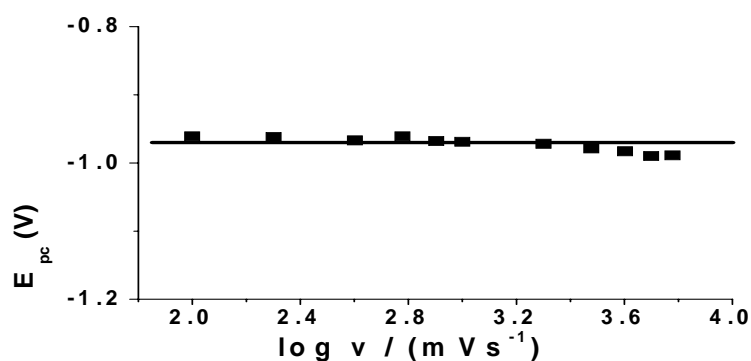


Figura 3.6d Representación gráfica E_{pc} como función de $\log v$ para la onda Ic de nifurtimox 1mM en acetonitrilo.

Una vez caracterizado el comportamiento electroquímico de nifurtimox, la siguiente parte del proyecto consistió en hacer el análisis de su comportamiento en presencia de glutatión.

3.1.2 Reducción de nifurtimox en presencia de glutatión

El glutatión (GSH forma reducida) es un péptido que se encuentra en ambientes intra y extracelulares en las células humanas como parte importante del sistema de defensa antioxidante (figura 3.7). Esta molécula contiene en su estructura molecular protones ácidos provenientes de los grupos funcionales COOH y NH₂, que dependiendo de su acidez, son susceptibles a reaccionar con las especies reducidas del nifurtimox como donadores de protones o asociarse con éstas mediante puentes de hidrógeno.

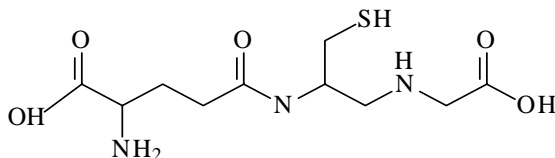


Figura 3.7 Estructura de glutatión

Para determinar si se lleva a cabo un proceso de protonación o de asociación, se realizó el correspondiente estudio del efecto de la concentración de glutatión sobre el comportamiento voltamperométrico de nifurtimox. En voltamperometría cíclica, estos procesos se ven reflejados mediante cambios en la forma de las ondas de reducción que van desde desplazamientos de alguna de las ondas hasta la pérdida de la reversibilidad electroquímica.²²

3.1.2.1 Efecto de la concentración de glutatión

Para comprender el comportamiento voltamperométrico de nifurtimox en presencia de glutatión, se llevó a cabo el análisis de los cambios de potencial y corriente de los picos catódicos I_c y II_c en función de la concentración de glutatión.

En la figura 3.8a se muestra como referencia al patrón típico de reducción del nifurtimox en medio aprótico.

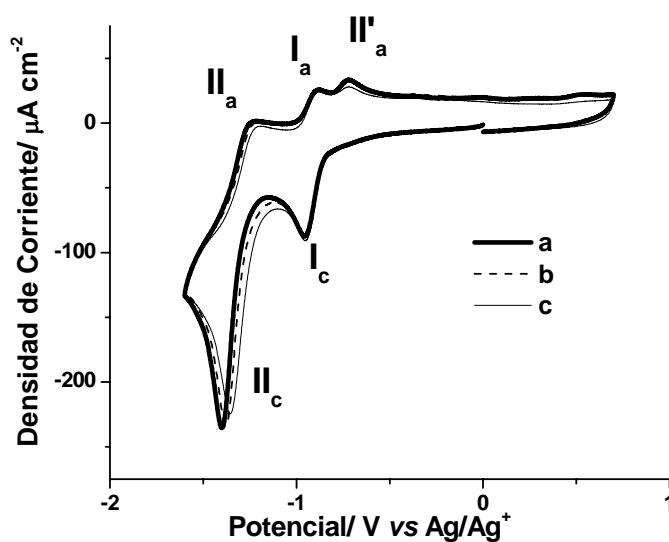


Figura 3.8 Voltamperograma para nifurtimox 1mM con adiciones de glutatión en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs^{-1} : a) 0 mM de glutatión, b) 2 mM de glutatión, (c) 4 mM de glutatión.

En la figura 3.8b-c, se puede apreciar que a las concentraciones de 2 mM y 4 mM de glutatión, la reversibilidad de la onda Ia/Ic no se modifica y por lo tanto puede descartarse la protonación del anión radical $R - NO_2^{\bullet-}$ por glutatión. Considerando, que el potencial de media onda no varió apreciablemente usando varias concentraciones de glutatión, se puede asumir que la interacción asociativa con $R - NO_2^{\bullet-}$ es poco significativa. En contraste, la segunda etapa de reducción (figura 3.8b-c) correspondiente a la formación de la hidroxilamina $R - NH - OH$ teniendo como uno de sus intermediarios al dianión nitro $R - NO_2^{2-}$ que es una especie mas básica que el anión radical, con cantidades crecientes de glutatión, se observó una disminución de la intensidad del pico Ic y de sus correspondientes picos de oxidación IIa-II'a. Esta tendencia se conservó conforme se incrementó la concentración de glutatión y es notable que en todos los ensayos la relación de corrientes de IIa/Ic y IIa'/Ic se mantuvo constante. Es decir se mantiene la cuasi-reversibilidad de la onda, lo que indica que tampoco procede una transferencia de protón con el $R - NO_2^{2-}$ o con alguno de los otros intermediarios electrogenerados. Además se observa un desplazamiento de 0.024 V y 0.046 V hacia valores menos negativos de -1.36 V del potencial catódico de la onda II (E_{pcII}) al incrementar la concentración de glutatión de 0 mM a 2 mM y 4 mM respectivamente.

Lo anterior implica un cambio en los requerimientos energéticos del proceso de transferencia de electrones para la formación de la hidroxilamina (R-NH-OH) a partir del anión radical (R-NO₂^{•-}). Este efecto sugiere la existencia de una estabilización termodinámica de la carga de la especie dianión nitro R-NO₂²⁻, debida a una asociación por puente de hidrógeno entre este intermediario básico y el donador de protones, glutatión.

Con la finalidad de verificar el tipo de asociación observada entre glutatión y las especies electrogeneradas de nifurtimox, se realizó un experimento en el cual se caracterizaron las asociaciones entre los intermediarios de reducción del nifurtimox con 2-propanol una molécula cuyas propiedades como donador de puente de hidrógeno en presencia de especies radicales y aniónicas es bien conocido.²⁸

3.1.3 Reducción de nifurtimox en presencia de un donador de puente de hidrógeno

El 2-propanol (figura 3.9) es un alcohol cuyo grupo funcional –OH le permite actuar como un débil donador de protones en medios apróticos. El efecto que tiene sobre especies básicas como los aniones radical es mediante una asociación vía puentes de hidrógeno.

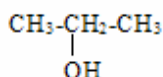


Figura 3.9. Representación estructural de 2-propanol

3.1.3.1 Efecto de la concentración de 2-propanol

El comportamiento voltamperométrico de nifurtimox, al adicionar diferentes concentraciones de 2-propanol, se presenta en la figura 3.10. En ausencia del alcohol (figura 3.10a) se observa el comportamiento típico de reducción de los nitro. Conforme se adicionaron cantidades crecientes de 2-propanol (Fig 3.10b-c), la separación de picos $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0.58V$ de la onda Ic no se apartó significativamente del valor de 0.60V establecido para sistemas reversibles, por lo que se descarta la presencia de una asociación por puente de hidrógeno entre el anión radical y el donador de protones. En contraste, la

señal voltamperométrica IIc se desplazó 0.06 V y 0.1V hacia potenciales menos negativos que -1.36 V correspondientes al potencial catódico de la onda IIc (E_{pcII}) con el incremento de la concentración de 2-propanol de 0 M a 0.05 M y 0.2M -respectivamente.

Este desplazamiento y el cambio de la onda IIc está relacionado con la estabilización de las especies electrogeneradas a este potencial, mediante una asociación de puente de hidrógeno con el 2-propanol. El proceso de protonación de la especie $R-NO_2^{\cdot-}$ en presencia del 2-propanol queda descartado, ya que como se ha mencionado en la literatura, la protonación del anión radical nitro daría lugar a la desestabilización del mismo, proceso que conlleva a la pérdida de la reversibilidad de la onda de reducción, lo que no se observó para la onda Ic. Para esta onda al igual que para la onda Ic, la protonación queda descartada porque la relación de corrientes IIa/IIc y IIa'/IIc se mantuvo constante con cantidades crecientes del 2-propanol.

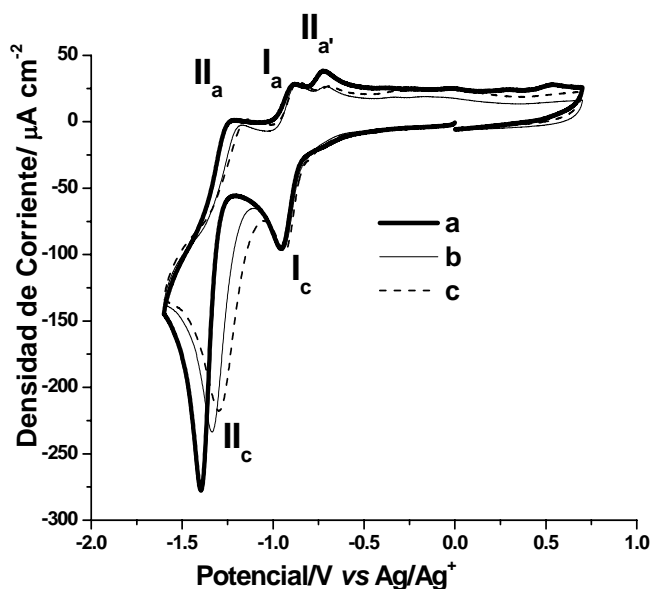


Figura 3.10 Voltamperograma cíclico de nifurtimox 1 mM con adiciones de 2-propanol. Carbón vítreo como electrodo de trabajo: a) 0 M, b) 0.05232 M, c) 0.20928 M.

Como se puede apreciar de la comparación entre el comportamiento de las especies electrogeneradas de reducción de nifurtimox en presencia de glutatión y de 2-propanol, es que el anión radical $R\text{-NO}_2^-$ es una especie básica muy estable que no se asocia con donadores débiles de puente de hidrógeno. En contraste el dianión nitro es una especie más básica que presenta asociaciones vía puente de hidrógeno con esta clase de moléculas. La transferencia de un protón en ambos casos queda descartada.

3.1.4 Experimentos de coulometría de nifurtimox

Para confirmar la estequiometría electrónica de la reducción de nifurtimox, a nivel de la primera onda I_c , se utilizó el método coulombimétrico aplicando un potencial de -1.15V a una solución de nifurtimox durante 55 minutos. En la figura 3.11 se muestra la carga consumida durante el tiempo de electrólisis en función del tiempo. Se observa que la carga Q fue disminuyendo durante el transcurso del tiempo.

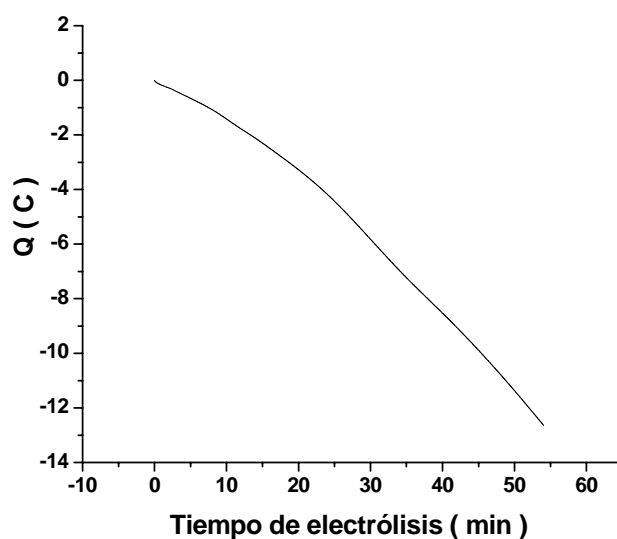


Figura 3.11 Coulometría de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.

El producto que se puede generar en el proceso de electrólisis, considerando el mecanismo de reducción de los nitro en medios apróticos, y el potencial de electrólisis, de trabajo, es el anión radical. Sin embargo, la voltamperometría cíclica obtenida después de 50 minutos de electrólisis reveló que el anión radical no es el único y tampoco el producto mayoritario generado, como se demuestra al comparar la posición del pico Ia, de la voltamperometría del producto de la electrólisis (figura 3.12b), con la voltamperometría antes de la electrólisis (figura 3.12a).

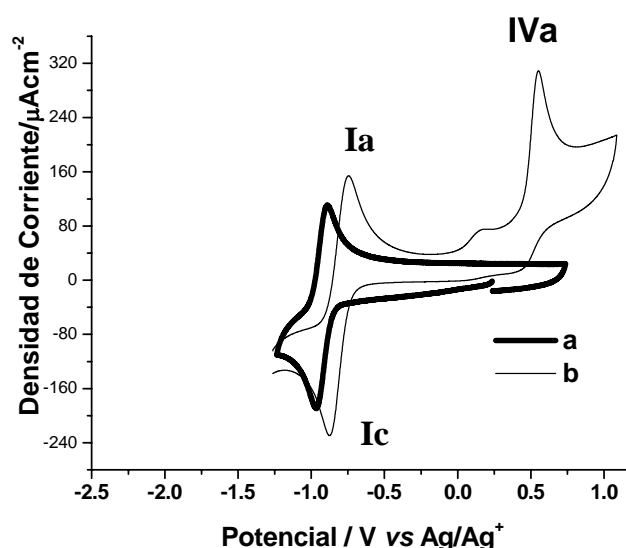


Figura 3.12 Voltamperometría cíclica de nifurtimox 2 mM en acetonitrilo, con un potencial de inversión $E_{\lambda 2}$, de -1.150 V, para aislar la onda Ic: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis.

Adicionalmente, como se puede apreciar en la figura 3.12b, aparece un segundo pico, IVa, a potenciales más anódicos. Este pico también se observa en el voltaperograma completo de nifurtimox (figura 3.13), correspondiente a la oxidación de algunos de los intermediarios formados durante la reducción del anión radical a hidroxilamina.

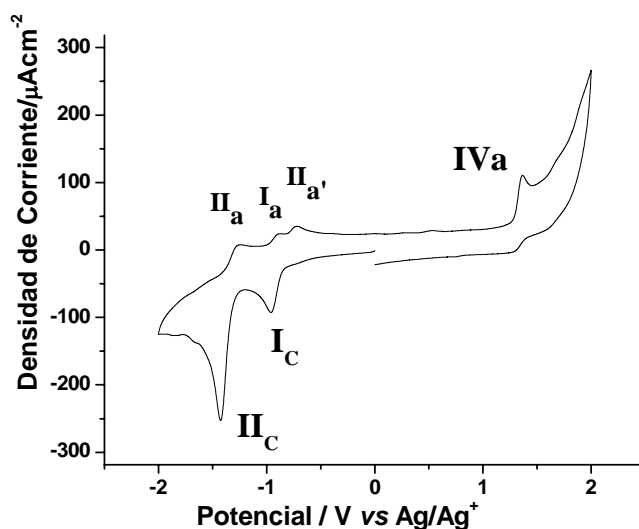


Figura 3.13 Voltamperograma cíclico de nifurtimox 1 mM en acetonitrilo.

Utilizando la ecuación de Faraday y considerando que la reducción sería de nitro a anión radical nitro la carga Q calculada para este experimento, sería de 3.09 C. Sin embargo la carga de 13 C observada en la gráfica 3.11 y la presencia del pico IVa son una evidencia de que la reacción electroquímica que se llevó a cabo a la escala de tiempo de la electrólisis, indica que el anión radical sustrajo un protón de especies capaces de donar protones y formó el radical neutro, $R-NO_2H^\bullet$, el cual se sabe puede reducirse a potenciales menos negativos que los correspondientes al $R-NO_2$. De esta manera, los subsecuentes pasos de electrorreducción de $R-NO_2H^\bullet$ se llevaron a cabo en el mismo potencial que el correspondiente a la reducción de $R-NO_2$. Es por ello que los picos de oxidación observados después de la electrólisis coinciden con los picos de

oxidación observados cuando se reduce el nitro a un potencial lo suficientemente negativo como para formar hidroxilamina.

En trabajos de investigación previos se ha reportado la posibilidad de que el propio acetonitrilo actúe como donador de protones al anión radical, lo cual explicaría el comportamiento antes descrito.³⁰

En este caso, los resultados de la coulometría no fueron útiles para cuantificar el número de electrones transferidos a nivel de la primera onda, debido a que los aniones radicales son especies muy reactivas que en períodos relativamente largos de tiempo llevan a cabo reacciones químicas acopladas con otras especies presentes en el medio, impidiendo detectar su presencia.

Para comprobar la formación del radical a escalas de tiempo de segundos se utilizó la técnica UV-vis acoplada a la electrólisis preparativa en un experimento de espectroelectroquímica UV-vis.

3.1.5 Detección del anión radical nitro mediante electroquímica UV-vis

La caracterización espectroscópica UV-vis del producto de reducción debido a la transferencia de un electrón de nifurtimox en medio aprótico se presenta en la figura. 3.14. Para ello se asignaron las bandas de absorción en el espectro UV-vis con los cromóforos presentes en esta molécula. La banda a 402 nm se ha asignado a la absorción del nifurtimox debida a los dienos conjugados presentes en su estructura química, la cual se observa que disminuye con el tiempo de la electrólisis, debido a que el nitro cambia su ambiente electrónico al reducirse.

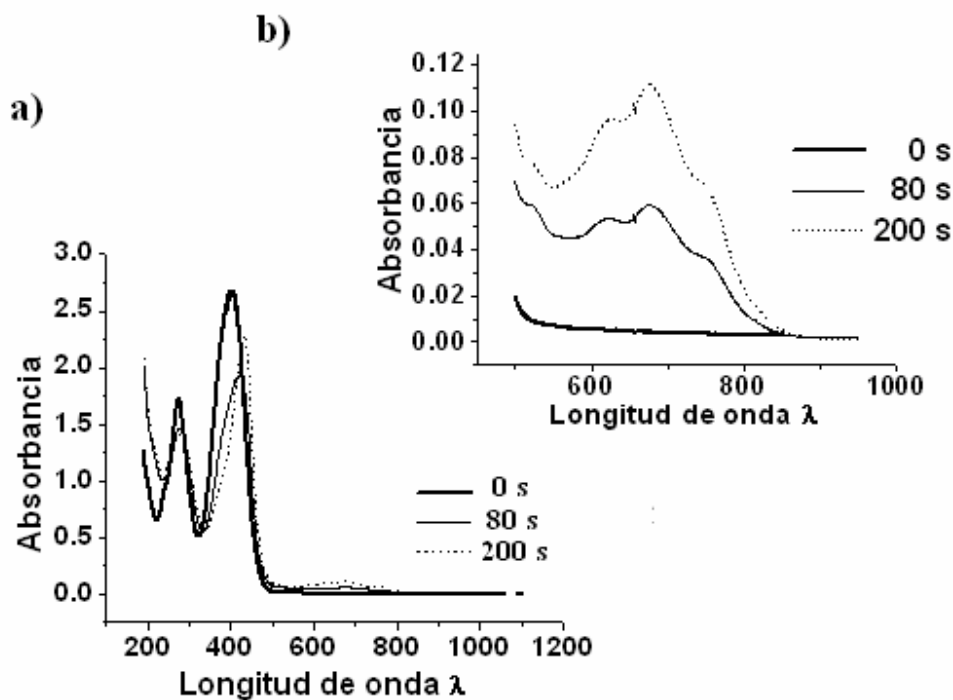
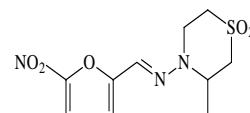


Fig. 3.14 a) Espectros de absorción ultravioleta-visible de nifurtimox, a diferentes tiempo de electrólisis, aplicando un potencial de $E = -0.97$ V en acetonitrilo, b) Ampliación de la zona de 500 a 900nm.

Se ha informado en la literatura que los radicales nitro absorben a lo largo de ondas mayores de 450 nm dependiendo del disolvente, así que la banda que aparece de 675 nm se ha atribuido a la formación del anión radical.

Se aplicó la ley de Faraday (ver sección BII) para obtener la concentración de las especies presentes en la disolución y se relacionó con la absorbancia. (figura 3.15a y 3.15b).

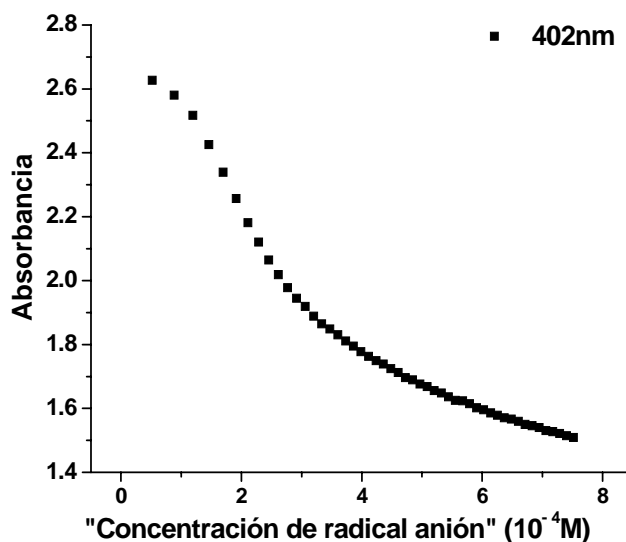


Figura 3.15a Absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 402 nm

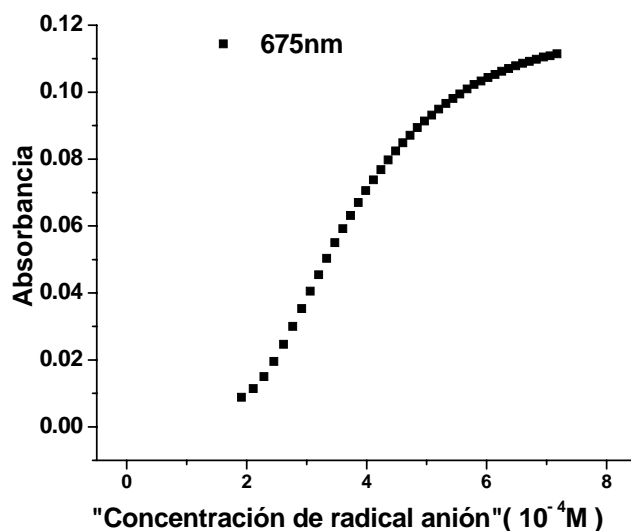


Figura 3.15b Absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 675 nm

De acuerdo a la ley de Lambert y Beer (ver sección B.III) la relación de absorbancia como función de la concentración debería dar una línea recta, al no observarse ésta tendencia para el anión radical (figura 3.15b), se reafirma que esta especie es inestable y que al potencial de reducción del nitro al anión radical, están presentes otras especies.

Para corroborar que la banda a 675nm que se observa en el espectro de UV-vis obtenido experimentalmente para nifurtimox durante su electrolisis, corresponde al anión radical, se realizó la simulación digital del espectro de absorción del anión radical de este compuesto.

3.1.6 Simulación de los espectros UV-vis

La simulación teórica de los espectros UV-vis de nifurtimox neutro y del anión radical de esta molécula, es una forma de validar los resultados experimentales. Para la simulación se utilizó el software “Spartan’06” para Windows, versión 1.1.2, utilizado comúnmente para la simulación digital de experimentos de electroquímica.

Para llevar a cabo la simulación, se realizó la optimización de la geometría y los cálculos de frecuencia de acuerdo a la teoría funcional de la densidad (DFT). Para los aniones radicales se utilizó el método no restringido. La optimización estructural fue seguida por cálculos de frecuencia para asegurar que no hay frecuencias imaginarias.

En la figura 3.16 se puede observar que los espectros teóricos no se ajustan a los experimentales, debido a que las condiciones para la simulación son, en fase gaseosa a 0° C, mientras que las condiciones experimentales son en fase líquida de medio aprótico a 25° C. Sin embargo, tanto la tendencia de las bandas de absorción de los espectros de nifurtimox neutro, como los obtenidos de la molécula electrolizada, se conservan tanto en los espectros teóricos, como en los experimentales. De esta manera se puede establecer que la banda alrededor de 675 nm corresponde al anión radical, porque tanto en el espectro teórico como en el experimental de la molécula neutra, esta banda no aparece. Al contrario de lo que sucede con los espectros de la molécula después de la electrólisis, en la que en ambos espectros se observa la banda alrededor de 675 nm.

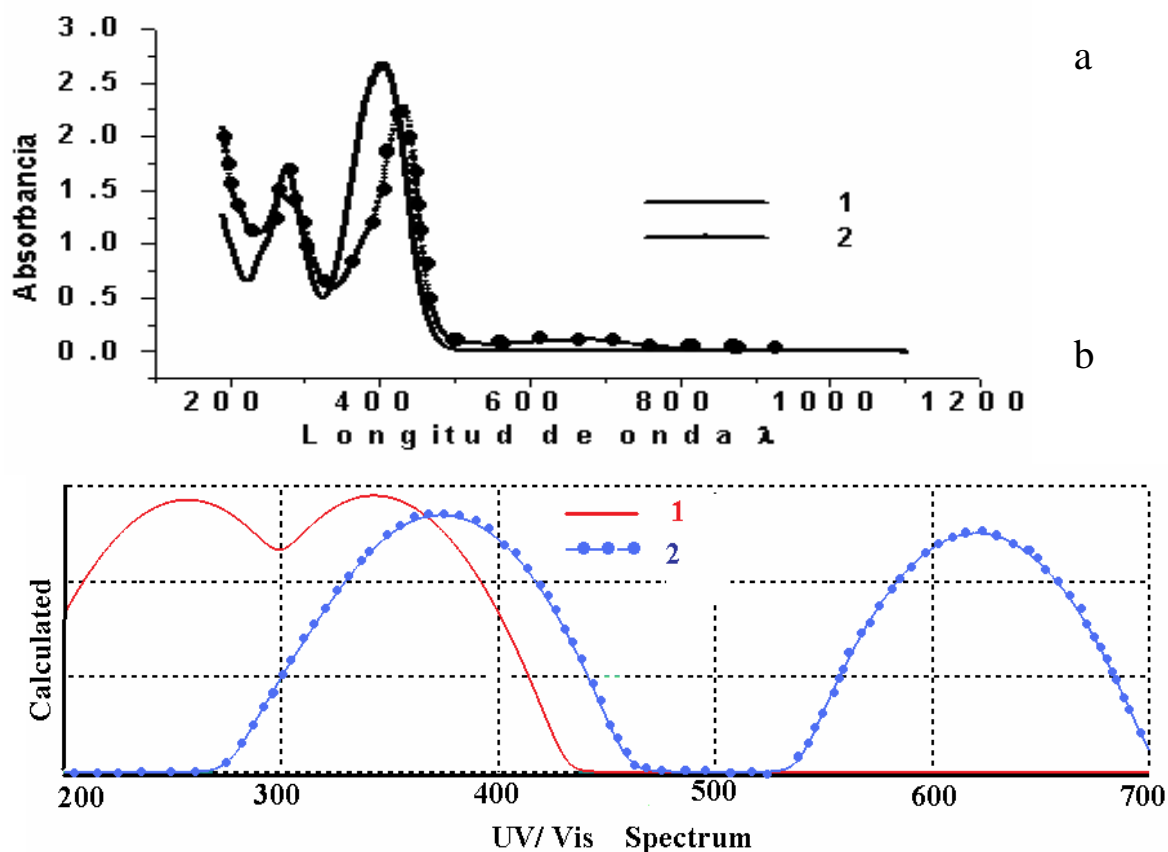


Fig. 3.16 a) Espectros experimentales, b) Simulación teórica de acuerdo al programa Spartan'06, 1) Nifurtimox neutro, 2) Anión radical de nifurtimox.

Otro fármaco con actividad antichagásica de interés en este trabajo de investigación es el benznidazol, por ello en la siguiente parte se describe la caracterización de su comportamiento electroquímico.

3.2 BENZNIDAZOL

3.2.1 Estudio voltamperométrico de benznidazol

El benznidazol (figura 3.17) es un nitroimidazol con actividad antichagásica, su modo de acción contra el *Trypanozoma cruzi* y el efecto tóxico que produce en los humanos está relacionado con las interacciones supramoleculares de los radicales libres, que se generan durante la reducción de su grupo nitro con las macromoléculas presentes en el medio biológico en el que se reduce.³¹ Es claro entonces, que un estudio del tipo de asociaciones que pueden presentar los radicales es necesario para un conocimiento más profundo de sus principales sitios de acción. Una de las técnicas que permite estudiar dichas interacciones es la voltamperometría cíclica.

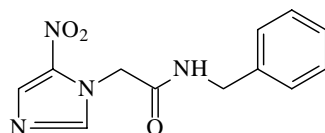


Figura 3.17 Representación estructural de benznidazol

En este trabajo de investigación la voltamperometría cíclica de benznidazol se llevó a cabo en un medio aprótico polar de acetonitrilo, utilizando como electrolito soporte tetrafluoroborato de tetraetilamonio (TFBTEA) 0.1 M a una velocidad de barrido de 0.1 Vs⁻¹ se obtuvo el voltamperograma de benznidazol (figura 6.2a), él cual muestra durante el primer barrido que se inició en 0.0 V hacia el potencial de inversión ($E_{\lambda 1}$) -1.8 V dos picos catódicos el IIIc y el IVc localizados a -1.01 V y -1.31 V respectivamente.

Con el propósito de aislar el pico catódico IIIc (-1.01 V) y asociarlo a su correspondiente pico de oxidación IIIa (-0.947 V) se realizó un segundo voltamperograma (figura 3.18b) con un potencial de inversión ($E_{\lambda 2} = -1.1\text{V}$). La relación de corrientes, i_{pa}/i_{pc} , asociada al par IIIc-IIIa se encontró por 0.92, cercano al valor de 1 reportado en la literatura para un sistema reversible.²⁸ El valor de ΔE_p presenta un valor de 0.063 V próximo al valor teórico de 0.06 V característico de una transferencia monoelectrónica sin complicaciones cinéticas.²⁹ El proceso asociado a esta onda es la transferencia de un electrón entre el par nitro-anión radical nitro $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$.

La onda IVc asociada a la reducción del anión radical nitro a su correspondiente hidroxilamina, en un esquema complejo presenta más de un pico de oxidación (IVa, IVa', IVa''), lo que hace evidente la irreversibilidad de esta onda. Podemos asumir que al igual que nifurtimox y otros nitrocompuestos el proceso asociado a la onda IVc involucra $3e^-$ y $4H^+$ para la reducción del anión radical nitro hasta la hidroxilamina.

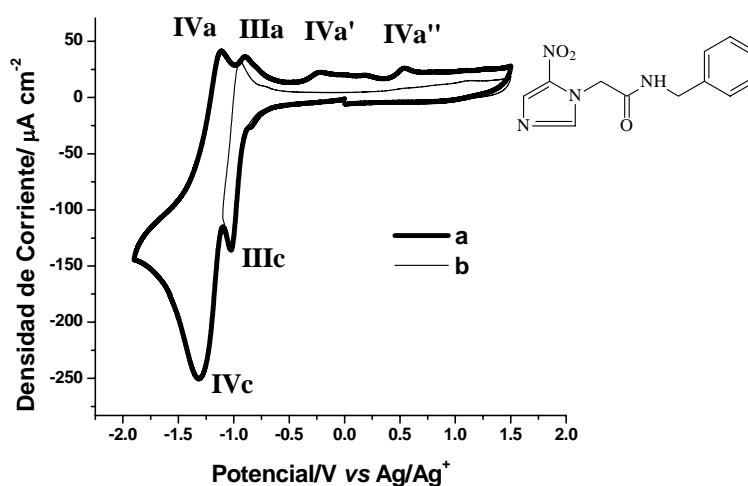


Figura 3.18 Voltamperograma cíclico típico para benznidazol 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido de 0.1Vs^{-1} : a) $E_{\lambda 1} = -1.8\text{V}$, b) $E_{\lambda 2} = -1.1\text{V}$.

3.2.1.1 Variación de la velocidad de barrido

Con el propósito de estudiar la estabilidad del anión radical nitro fue necesario caracterizar el comportamiento voltamperométrico del par $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$ a diferentes velocidades de barrido, a través de un análisis de la relación que existe entre las corrientes de pico catódico, i_{pc} y pico anódico i_{pa} con la velocidad de barrido. Los voltamperogramas obtenidos experimentalmente a velocidades de barrido de 0.1 Vs^{-1} a 6 Vs^{-1} que muestran los picos de reducción IIIc y IVc se observan en la figura 3.19a. En éstos al igual que en nifurtimox, el par IIIc/ IIIa corresponde a la reacción $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$, en tanto que el pico IVc se debe a la serie de reacciones de $R-NO_2^{\bullet-}$ a $R-NH-OH$ (figura 3.20). Los picos IVa, IVa' y IVa'' corresponden a la oxidación de las diferentes especies electrogeneradas durante la reducción de $R-NO_2^{\bullet-}$ a $RNH-OH$. La figura 3.19b sólo muestra el comportamiento voltamperométrico del par (IIIa-IIIc) pertenecientes al sistema $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$, en donde se detecta un sistema reversible con un $E_{pa} - E_{pc} = 0.058 \text{ V}$ y una relación de corrientes i_{pa}/i_{pc} cercana a 1. La corriente de los picos aumenta con la velocidad de acuerdo a la ecuación de Randles- Sevcik (ecuación 3.7), en donde la corriente i es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido $v^{1/2}$.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} v^{1/2} C \quad (3.7)$$

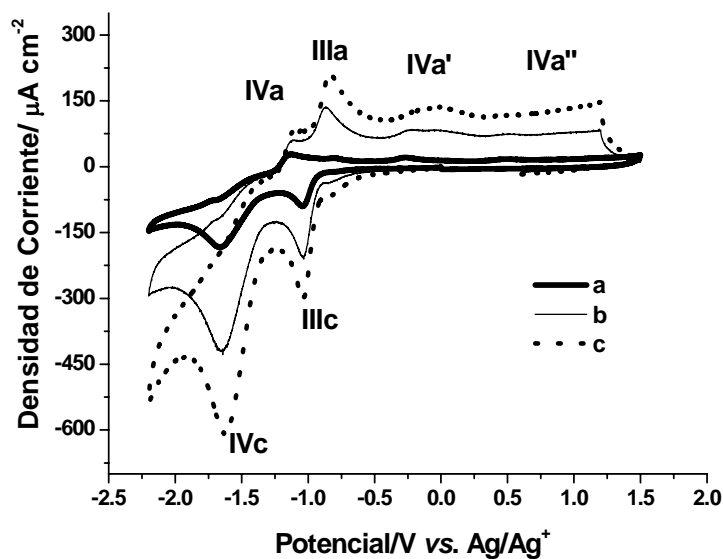


Figura 3.19a Voltamperograma cíclico típico para benzimidazol 1mM en TFBTEA 0,1M en acetonitrilo, a diferentes velocidades de barrido. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. $E_{\lambda 1}=2.2$ V: a) 0.1 Vs^{-1} , b) 0.5 Vs^{-1} , c) 1.0 Vs^{-1} .

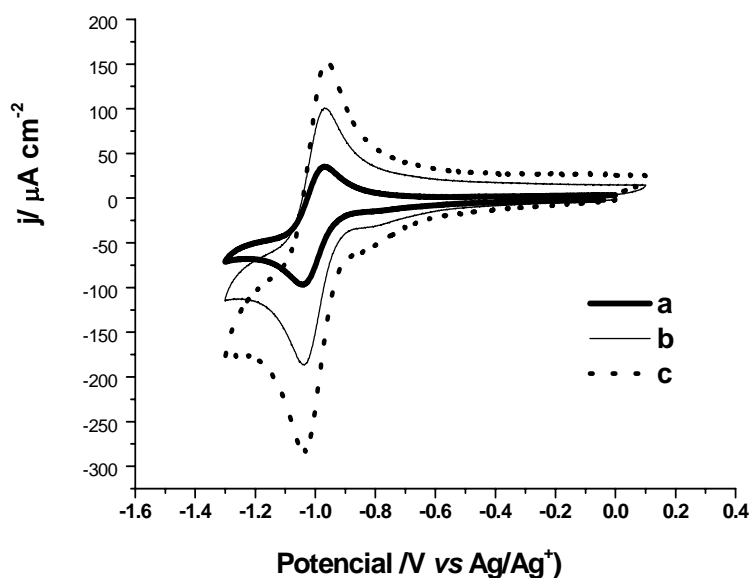


Figura 3.19b Voltamperograma cíclico típico para benzimidazol 1mM en TFBTEA 0.1M en acetonitrilo, a diferentes velocidades de barrido. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. $E_{\lambda 2}=1.1$: a) 0.1 Vs^{-1} , b) 0.5 Vs^{-1} , c) 1.0 Vs^{-1} .

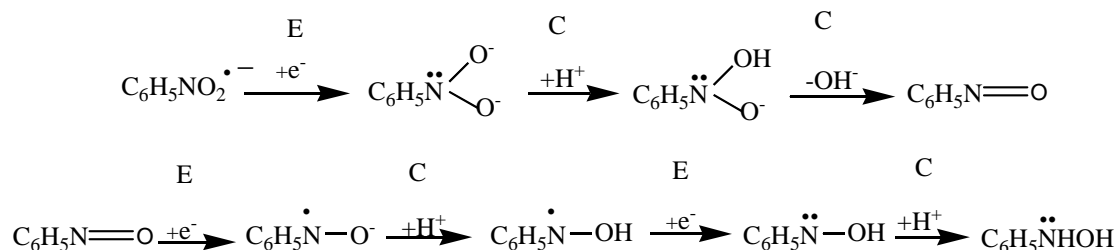


Figura 3.20 Mecanismo de reducción para el anión radical nitro aromático $R-NO_2^{\cdot-}$ a hidroxilamina $R-NH-OH$, en medio aprótico.

De la misma manera que para nifurtimox se representó i_{pc} en función de $v^{1/2}$ (figura 3.21a), para el pico correspondiente a la formación del anión radical nitro, IIIc, obteniendo un comportamiento lineal cuya intersección con las ordenadas fue muy cercano a cero, característica propia de un sistema controlado por difusión.

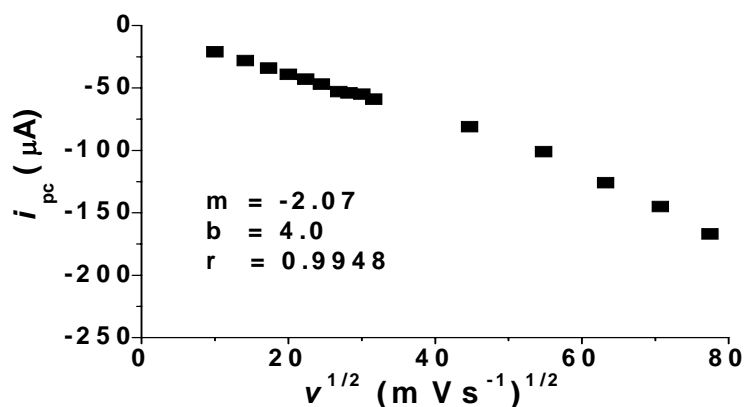


Figura 3.21a Representación gráfica de i_{pc} como función de $v^{1/2}$ para la onda IIIc de benzimidazol 1 mM en acetonitrilo.

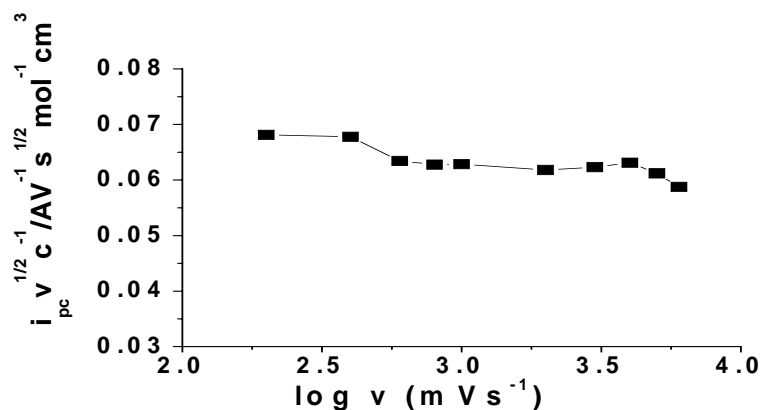


Figura 3.21b Representación gráfica $i_{pc} v^{1/2} c^{-1}$ como función de $\log v$ para la onda IIIc de benznidazol 1 mM en acetonitrilo

Cuando la gráfica de función corriente $i_{pc} v^{1/2} c^{-1} / AV^{-1} s^{1/2} mol^{-1} cm^3$ vs $\log v$ (figura 3.21b) mantiene una tendencia lineal como se observa para la onda IIIc, se puede decir que el primer paso de reducción del benznidazol es un sistema reversible sin reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de electrones en la formación del anión radical nitro. Cuando hay complicaciones por la presencia de reacciones químicas acopladas se pierde la linealidad de la gráfica.

La gráfica i_{pa}/i_{pc} vs. v para la onda IIIc (figura 3.21c) muestra el comportamiento típico de un sistema reversible, es decir, una línea recta con pendiente cero, manteniendo el valor de i_{pa}/i_{pc} constante, a las diferentes velocidades de barrido. El que el valor de i_{pa}/i_{pc} sea cercano a 1 indica que la especie anión radical nitro es estable en periodos cortos de tiempo.

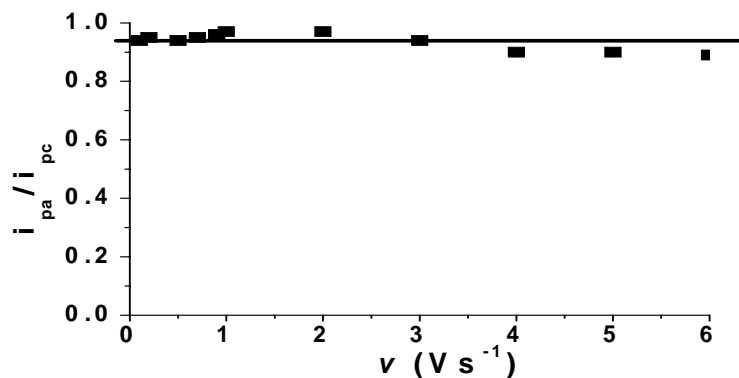


Figura 3.21c Representación gráfica de i_{pa} / i_{pc} como función de la velocidad para la onda IIIc de benznidazol 1mM en acetonitrilo

La gráfica de E_{pc} vs $\log v$ da la explicación acerca de la rapidez de la transferencia de electrones en el sistema. El valor de E_{pc} (figura 3.21d) al permanecer constante a las diferentes velocidades de barrido indica que el sistema es rápido y sin complicaciones cinéticas en la transferencia de electrones.

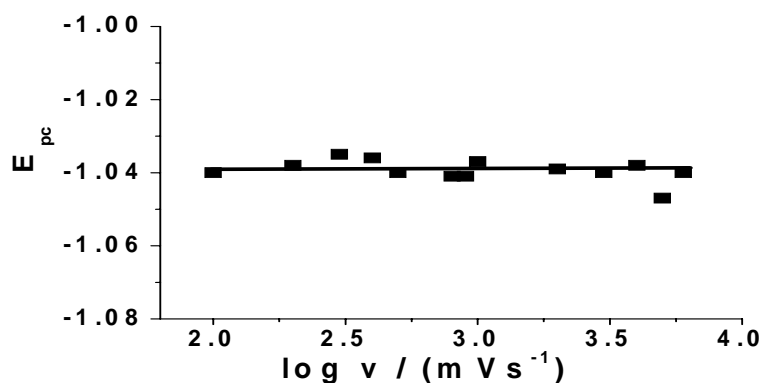


Figura 3.21d Representación gráfica E_{pc} como función de $\log v$ para la onda IIIc de benznidazol 1mM en acetonitrilo.

Para comprobar que los potenciales de pico catódico de IIIc y IVc del benznidazol corresponden a la reducción del grupo nitro y para validar nuestra metodología de trabajo se obtuvo el voltamperograma cíclico de nitrobenceno bajo las mismas condiciones experimentales.

3.2.2 Estudio voltamperométrico de nitrobenceno

El nitrobenceno es un nitro aromático cuyo comportamiento electroquímico a sido caracterizado por otros investigadores, y es bien conocido. Incluso se ha determinado por resonancia magnética electrónica la identidad de su anión radical correspondiente.²⁸

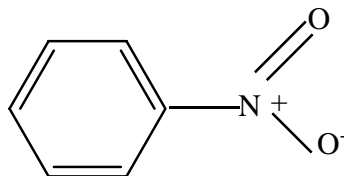


Figura 3.22 Representación estructural de nitrobenceno.

El voltamperograma de nitrobenceno (figura 3.23) obtenido a 0.1 Vs^{-1} muestra durante el primer barrido que se inició en 0.0 V hacia un potencial negativo de -1.7 V , $E_{\lambda 1}$, dos picos catódicos al igual que el benznidazol, el Vc en -1.18 V y el VIc en -1.69 V . Estos picos han sido asignados a la reducción del nitro a anión radical $R-\text{NO}_2/R-\text{NO}_2^{\bullet-}$, y a la formación de la hidroxilamina vía tres electrones, cuatro protones $R-\text{NO}_2^{\bullet-}/R-\text{NH}-\text{OH}$ respectivamente de acuerdo al mecanismo de reacción observado en la figura 3.24, el cual ha sido propuesto en función de los intermediarios que se han logrado aislar por diferentes grupos de investigación. En donde E, en la nomenclatura electroquímica, representa un paso electroquímico y C un paso químico.

Al invertir el sentido del potencial se encontró que el pico más catódico, no muestra un pico anódico bien definido.

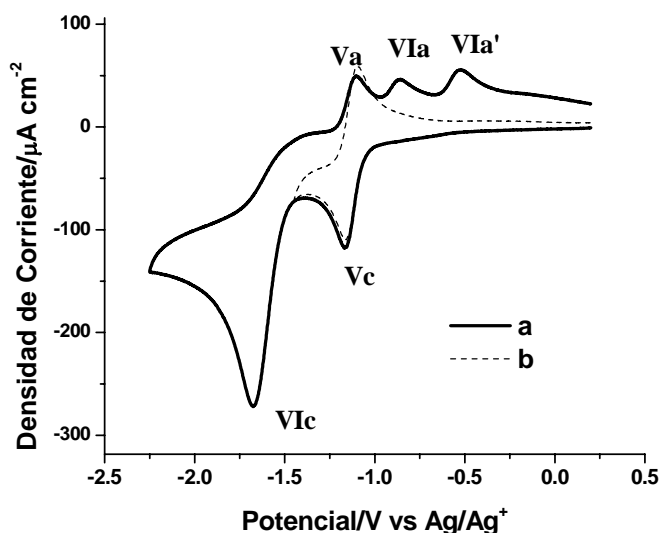


Figura 3.23 Voltamperograma de nitrobenzeno 1 mM en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 0.1 Vs^{-1} : a) $E_{\lambda_2} = -1.18 V$, b) $E_{\lambda_1} = -1.7 V$.

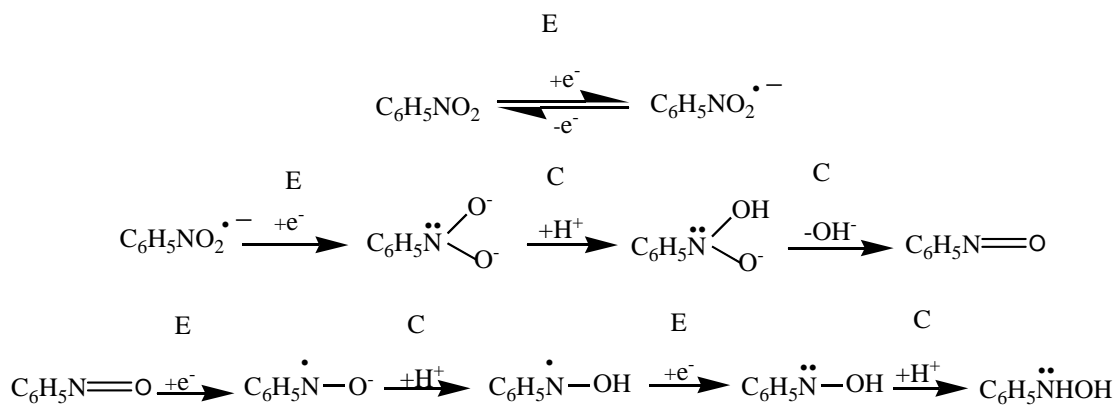


Figura 3.24 Mecanismo de reducción para el grupo nitro aromático en medio aprótico.

Para aislar la onda Vc y asignarle su correspondiente pico anódico, Va, se corrió un segundo voltamperograma con potencial de inversión de $E_{\lambda_2} = -1.18V$. Con este voltamperograma se hace evidente que el pico VIc, está asociado con los picos anódicos

VIIa y VIIa', por lo que se deduce que la reacción de reducción es irreversible debido a que el (o los) intermediario(s) formados durante el paso de transferencia del electrón dan lugar a reacciones químicas acopladas.

Al comparar el voltamperograma del nitrobenceno con el de benznidazol (figura 3.25), observamos que las ondas de reducción del benznidazol se encuentran a potenciales menos catódicos que para nitrobenceno, como consecuencia de que el benznidazol es una molécula con un sistema conjugado mayor que el de nitrobenceno.

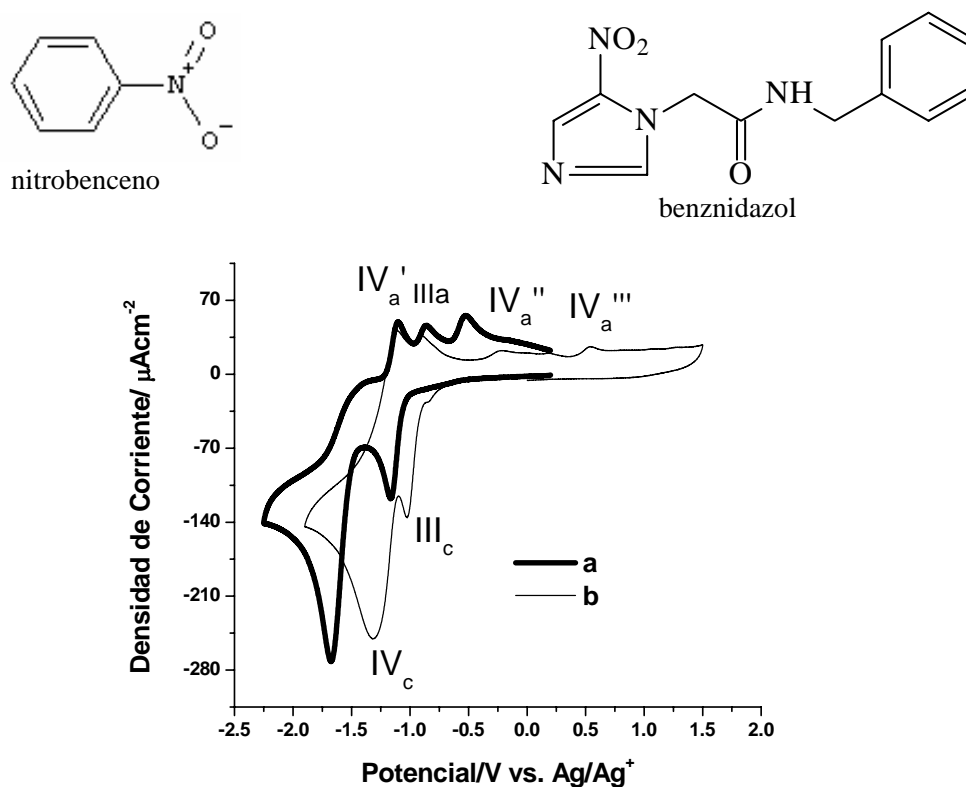


Figura 3.25 a) Voltamperograma de nitrobenceno, b) Voltamperograma de benzimidazol

Observando la figura 3.25, podemos determinar que el benznidazol presenta el comportamiento general de los nitrocompuestos y que las ondas IIIc/IIIa y IVc/IVa-IVa'-IVa'' si corresponden a la reducción del grupo nitro a anión radical y de anión radical a hidroxilamina respectivamente.

Con esta gráfica se valida la metodología del trabajo. El siguiente paso consistió en hacer el análisis del comportamiento electroquímico de benznidazol en presencia de glutatión, al igual que se hizo con nifurtimox.

3.2.3 Reducción de benznidazol en presencia de glutatión

Al igual que con nifurtimox para determinar el comportamiento voltamperométrico de benznidazol en presencia de glutatión (sección 3.1.2) se hicieron adiciones crecientes de esta pseudobiomolécula a una solución de benznidazol en medio aprótico, con la meta de determinar si se lleva a cabo un proceso de protonación o de asociación entre el glutatión y el benznidazol.

3.2.3.1 Efecto de la concentración de glutatión

En la figura 3.26a se muestra como referencia al patrón típico de reducción del benzimidazol en medio aprótico.

El comportamiento de la onda IIIc no se modifica con la adición de glutatión 2 mM, es decir, el esquema de reducción del nitro a anión radical nitro es igual al observado en ausencia de glutatión, indicando que el anión radical no es lo suficientemente básico para interactuar con los protones ácidos del glutatión. Sin embargo la onda IVc se recorrió a valores menos negativos de -1.75 V a -1.57., mostrando que el dianión nitro $R - NO_2^{2-}$ es un intermediario más reactivo y de carácter más básico que el propio anión radical.

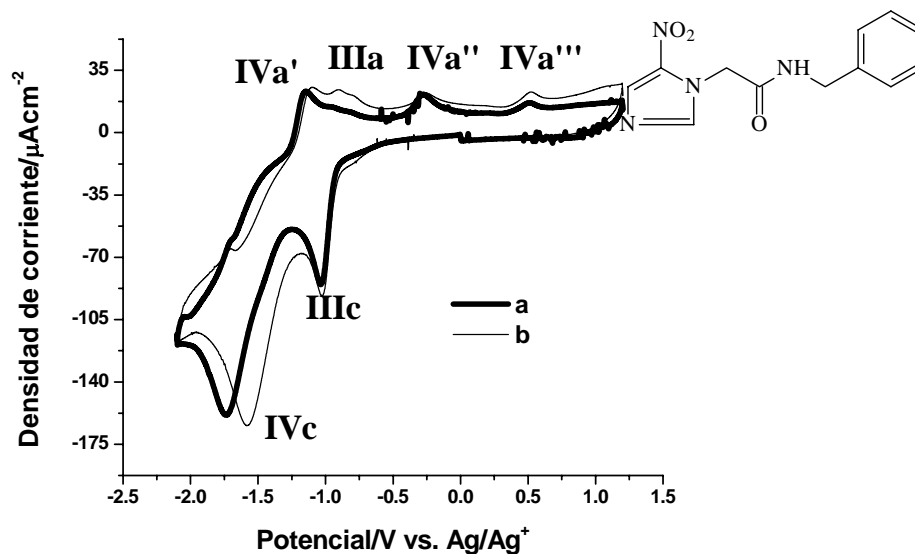


Figura 3.26 Voltamperograma para benzimidazol 1 mM con adiciones de glutatión en TFBTEA 0.1 M en acetonitrilo. Carbón vítreo como electrodo de trabajo a 0.1 Vs^{-1} : a) 0 mM de glutatión, b) 2 mM de glutatión.

El corrimiento del potencial del pico IVc a valores menos negativos continua manteniendo la relación de corrientes de los respectivos picos anódicos, indicando que no ocurre una transferencia de protón con el $R-NO_2^{2-}$ o con alguno de los otros intermediarios electrogenerados.

Lo anterior implica un cambio en los requerimientos energéticos del proceso de transferencia de electrones para la formación de la hidroxilamina ($R-NH-OH$) a partir del anión radical ($R-NO_2^{\bullet-}$). Este efecto sugiere la existencia de una estabilización termodinámica de la carga de la especie dianión nitro $R-NO_2^{2-}$, debida a una asociación por puente de hidrógeno entre este intermediario básico y el donador de protones, glutatión.

Para conocer más sobre el proceso de reducción del nitro a anión radical, se realizó una coulometría, que a diferencia de la voltamperometría nos permitió estudiar la estabilidad de estas especies en períodos de tiempos de minutos.

3.1.4 Experimentos de coulometría de benznidazol

Para confirmar la estequiometría electrónica de la reducción del benznidazol, a nivel de la primera onda IIIc, se utilizó el método coulombimétrico. En la figura 3.27 se muestra la carga consumida durante la electrólisis en función del tiempo.

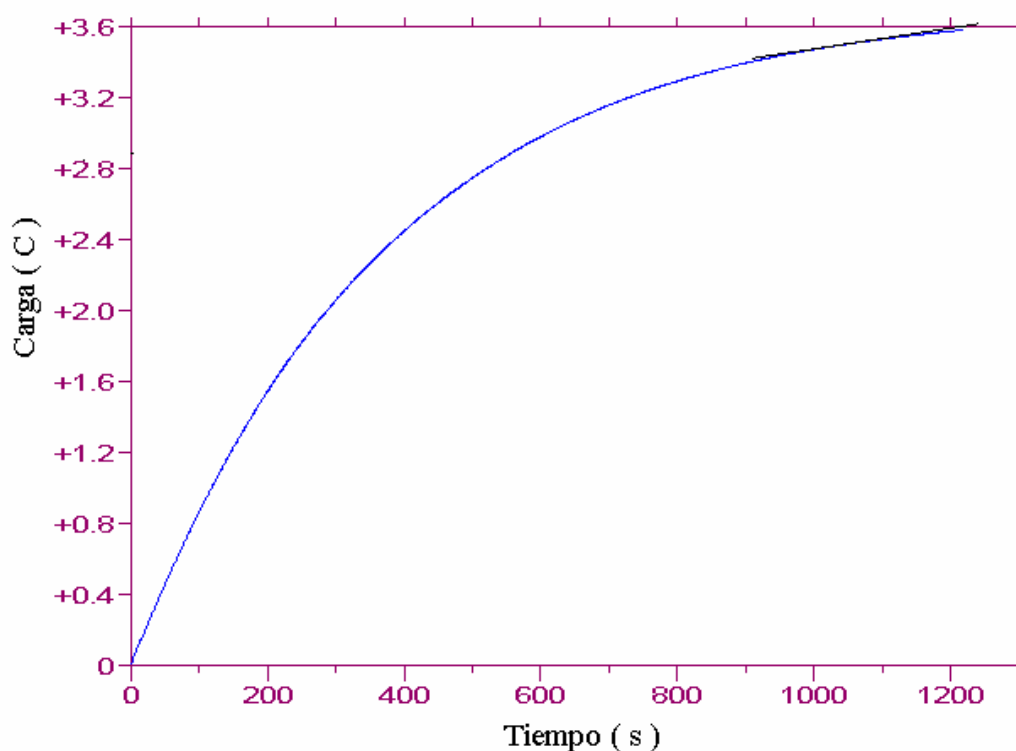


Figura 3.27 Coulometría de benznidazol 2 mM en acetonitrilo.

Para determinar los productos que se formaron durante la electrólisis se hizo una comparación entre el voltamperograma obtenido antes de la electrólisis y uno después de ésta. El producto esperado es el anión radical, sin embargo, la figura 3.28 muestra que después de la electrólisis los picos de oxidación VIIa' y VIIa'' no corresponden al anión radical. Al igual que con nifurtimox se propone que el anión radical se protona para dar al radical neutro $R-NO_2H^\bullet$, el cual puede reducirse a potenciales menos negativos que los correspondientes al $R-NO_2$. De esta manera, los subsecuentes pasos de electrorreducción se llevan a cabo en el mismo potencial que el correspondiente a la reducción de $R-NO_2H^\bullet$ es por ello que los picos de oxidación observados después de la electrólisis no coinciden con el pico del anión radical.

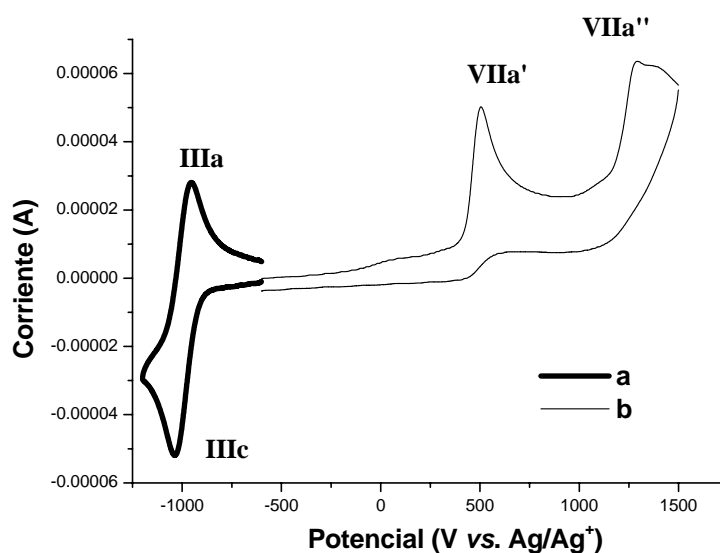


Figura 3.28 Voltamperometría cíclica de benzimidazol 2 mM en acetonitrilo: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis.

Al igual que para nifurtimox la coulometría de benznidazol no resultó útil para confirmar la estequiometría electrónica de la reducción del benznidazol, a nivel de la primera onda, correspondiente a la formación del anión radical debido a que a tiempos largos ocurren múltiples reacciones al potencial del pico IIIc.

Para comprobar la formación del radical a escalas de tiempo de segundos se utilizó la técnica acoplada ultravioleta visible con la electrólisis preparativa.

3.1.5 Detección del anión radical nitro mediante espectroelectroquímica UV-vis

La caracterización espectroscópica UV-vis del producto de reducción monoelectrónica de benznidazol en medio aprótico se comenzó con el análisis de los cambios de las bandas de absorción entre los espectros UV-vis de la molécula de benznidazol neutra (figura 3.29a) y los obtenidos durante la electrólisis (figura 3.29b-c). Para ello las bandas de absorción se asignaron a los cromóforos presentes en esta molécula.

La figura 3.29a muestra el espectro UV-vis de la molécula de benznidazol neutra. La banda a 210 nm se ha asignado a una transición (π - π^*) de un orbital π , de enlace a un orbital π de antienlace, π^* , que se atribuyó al benceno, esta transición es permitida y por lo tanto intensa. La banda en 320 nm es una transición de un orbital de no enlace η a un orbital π de antienlace (η - π^*). Esta banda se atribuyó al grupo nitro teniendo como sustituyente al imidazol.

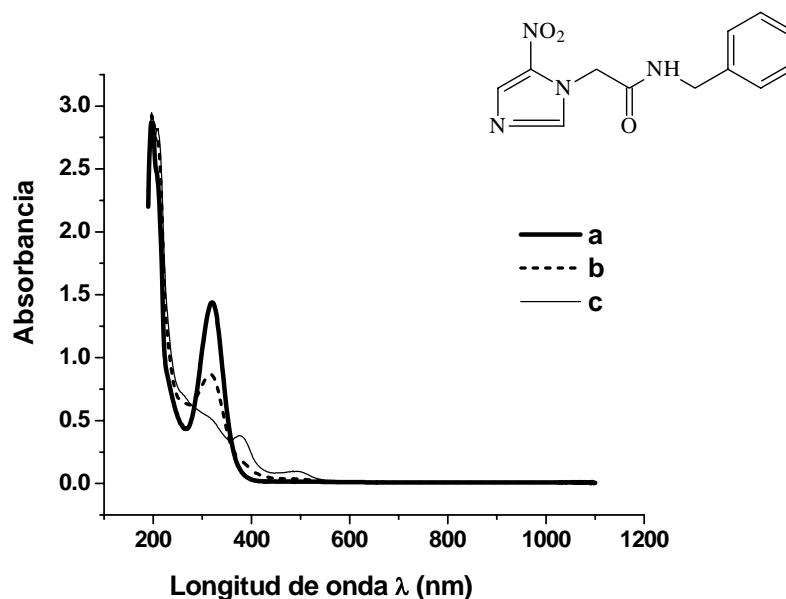


Figura 3.29 Espectros de absorción ultravioleta-visible de benznidazol, a diferentes tiempo de electrólisis en un experimento de espectroelectroquímica UV-vis aplicando un potencial de $E = -0.97$ V: a) Espectro de benznidazol neutro a un tiempo de 0 s; b) 100 s, c) 200 s

En las figura 3.29b a un tiempo de electrólisis de 100 segundos, comienza a observarse una banda a 500 nm, la cual se ha atribuido al anión radical nitro del benznidazol. Esta banda continuó creciendo con el tiempo de electrólisis como se observa en la figura 3.29c a un tiempo de 200 segundos, mientras que la banda a 320nm asignada a la absorción del grupo nitro disminuye como consecuencia del cambio en su ambiente electrónico al reducirse.

Aplicando la ley de Lambert y Beer (ver sección B.III) para determinar el comportamiento de la absorbancia como función de la concentración de las especies presentes en la solución se obtuvieron las siguientes gráficas.

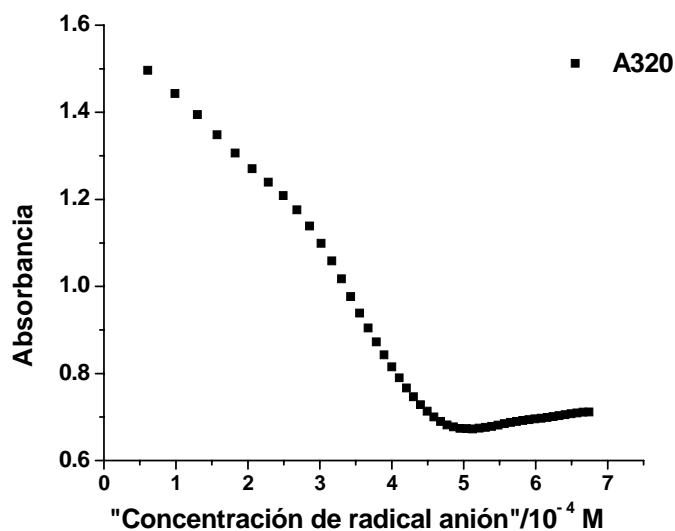


Figura 3.30 Gráfica de absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 320 nm asociada a la absorción de la molécula de benznidazol neutra.

La figura 3.30 muestra que la absorbancia de la banda a 320 nm atribuida al grupo nitro no presenta un comportamiento lineal, estableciendo el hecho que el grupo nitro presente en la solución se puede estar regenerando ya que el anión radical puede experimentar reacciones de desproporción reportadas en la literatura.²⁵

En la figura 3.31 al no observarse una relación lineal entre absorbancia como función de la concentración a 500 nm, que es la banda asignada al anión radical, indica que esta especie sufre reacciones químicas acopladas, que muy probablemente dé especies que absorban a longitudes de onda muy parecido a los que absorbe esta especie, corroborando los resultados obtenidos con la coulometría.

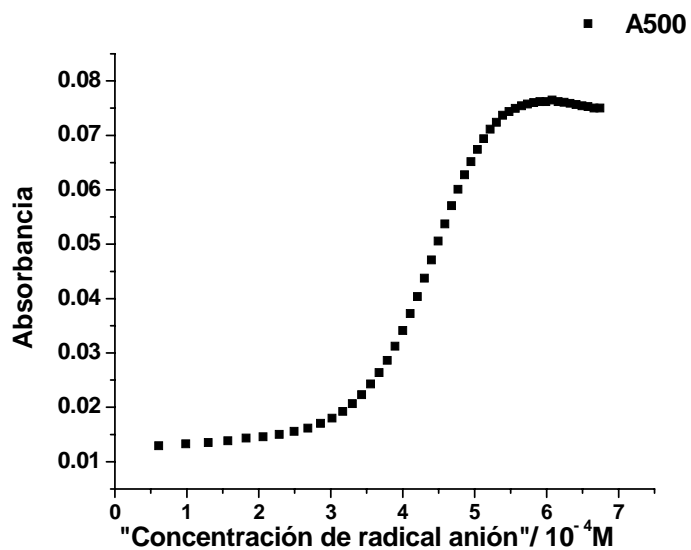


Figura 3.31 Absorbancia vs concentración a una longitud de onda de 500 nm

Para corroborar que la banda a 500 nm que se observa en el espectro de UV-vis obtenido experimentalmente para benznidazol durante su electrolisis corresponde al anión radical, se realizó la simulación digital del espectro de absorción del anión radical de este compuesto.

3.2.6 Simulación de los espectros UV-vis

La simulación teórica de los espectros UV-vis de benznidazol neutro y del anión radical de esta molécula, es una forma de validar los resultados experimentales. Para la simulación se utilizó el software “Spartan’06” para Windows, versión 1.1.2, utilizado para la simulación digital de experimentos comunes de electroquímica.

En la figura 3.32 se puede observar que los espectros teóricos se aproximan a los experimentales, debido a que las condiciones para la simulación son, en fase gaseosa a 0° C, mientras que las condiciones experimentales son en fase líquida de medio aprótico a 25° C. Sin embargo, tanto la tendencia de las bandas de absorción de los espectros de benznidazol neutro, como los obtenidos de la molécula electrolizada, se conservan tanto en los espectros teóricos, como en los experimentales. De esta manera se puede establecer que la banda alrededor de 500 nm corresponde al anión radical, porque tanto en el espectro teórico como en el experimental de la molécula neutra, esta banda no aparece. Al contrario de lo que sucede con los espectros de la molécula después de la electrólisis, en la que en ambos espectros se observa la banda alrededor de 500 nm.

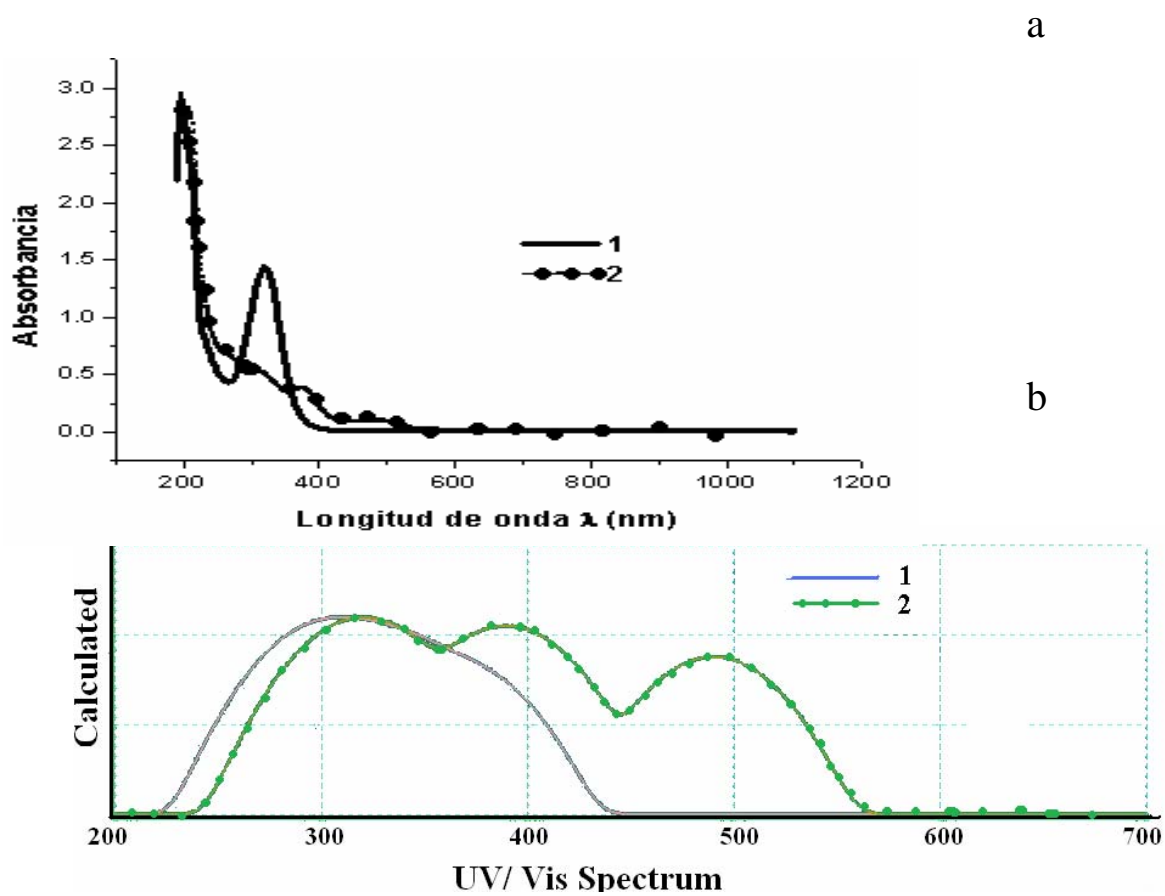


Figura 3.32 a) Espectros experimentales, b) Simulación teórica de acuerdo al programa Spartan'06. 1) Benzimidazol neutro, 2) Anión radical de benzimidazol.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1.- La reducción electroquímica de nifurtimox y benznidazol siguió el mecanismo establecido para compuestos nitro aromáticos en medio aprótico. Una onda reversible para el paso $R-NO_2 / R-NO_2^{\bullet-}$ con la transferencia de un electrón y una onda irreversible para las etapas de $R-NO_2^{\bullet-}$ a $R-NH-OH$ con la transferencia de tres electrones y cuatro protones.
- 2.- El comportamiento electroquímico de los intermediarios generados $R-NO_2^{\bullet-}$, $R-NO_2^{2-}$ durante la electrólisis de los fármacos nifurtimox y benznidazol es diferente a escalas de tiempos de segundos ó de minutos. Debido a las reacciones químicas acopladas que sufren estos intermediarios.
- 3.- No se observó algún tipo de interacción entre los aniones radicales de nifurtimox y benznidazol con el glutatión. Sin embargo, existe una asociación de puente de hidrógeno entre el dianión nitro de benznidazol y el glutatión. Confirmando que benznidazol actúa a nivel de su dianión radical o de su hidroxilamina como se ha propuesto en experimentos *in vitro*, con las proteínas de la membrana celular.
- 4.- El anión radical de ambos fármacos pudo detectarse mediante la técnica acoplada de espectroelectroquímica UV-vis.

4.1 Perspectivas

- 1.- Estudiar mediante técnicas electroquímicas y espectroelectroquímicas UV-vis e IR, las interacciones asociativas entre las especies reducidas de nifurtimox y benznidazol y las bases de adenina, timina, citosina y guanina, las cuales son unidades fundamentales del ADN, la molécula portadora del código genético.
- 2.- Determinar el número aparente de electrones mediante voltamperometría cíclica utilizando microelectrodos, para sustituir la coulometría, debido a que los radicales son inestables a los tiempos de trabajo de esta técnica.
- 3.- Realizar los estudios electroquímicos de las interacciones asociativas entre las especies reducidas de nifurtimox y benznidazol con un triglicérido que simule una membrana celular para elucidar si es en la parte lipofílica de la membrana en donde estas especies interactúan.

Capítulo 5

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Claudio Olea-Azara, Hugo Cerecetto, Alejandra Gerpe, Mercedes González, Vicente J. Arán, Carolina Rigola, Lucía Opazoa. *Issue 1*. 2006, 63, 36-42
2. Castro JA, Díaz de Toranzo EG. *Biomed Env Sci*.1988, 1,19-33.
3. D.I. Edwards, in: C. Hansch, P.G. Sammes. *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1990, vol. 2.
4. ⁴ Docampo R, Moreno SJN. *Free radicals in biology*. 1984, 6, 243-88.
5. B. Mester, R.M. Claramunt, J. Elguero, J. Atienza, A.Gomez-Barrio, J.A. Escario. *Chem. Pharmacol. Bull*. 1991, 39, 1990.
6. P. Wardmann, *Environ. Health Perspect*. 1985, 64, 309-320.
7. A.K. Debnath, C. Hansch, *J. Med. Chem*.1993, 36, 1007-1016.
8. M. Muller, *Biochem. Pharmacol*. 1986, 35, 37-41.
9. J.R. Ames, M.D. Ryan, P. Kovacevic, *Free Radical Biol. Med*. 1986, 2, 277
10. P.J. Declerck, C.J. De Ranter, *J. Chem. Soc. Faraday Tran*. 1987, 83, 257-265.
11. Carolina Rigor, C. Olea -Azar, *Molecular and Biomolecular Spectroscop*.2005, 61, 2933-2938.
12. Sandalio LM, Dalurzo HC. *J Exp Bot*. 2001, 52, 2115-26
13. M. A. La-Scalea. *Pharmaceutic and Biomedical Analisys*. 2002, 29, 561-568.
14. Dumanovic, D. *J. Talanta*. 1971, 18, 675.
15. J. Rozenski, C.J. De Ranter, H. Verplanken. *Quant. Struct*. 1995, 14, 134-141.
16. Luis J. Núñez-Vergara. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1995, 38,355-358.
17. A. Álvarez-Lueje. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, 46, 21-28.
18. A. L. Lehninger. *Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega, España, 1981.
19. Chang, Raymond. *Química*, Mc Graw Hill, China, 9^a edición, 2007.

20. G. A. Jeffrey, W Saenger. Hydrogen Bonding in Biological Structures, Springer-Verlag: Berlin, 1991.
21. G.A. Jeffrey. An Introduction to Hydrogen Bonding. Oxford University: USA, 1997.
22. Salas Reyes Magali; Tesis de Maestría: “Estudio electroquímico y espectroscópico de interacciones asociativas entre especies de interés biológico”, 2005 .IPN, México, D.F.:
23. M. E. Peover, J. D. Davies, *J. Electroanal. Chem.* 1963,6,46.
24. Charazo Ruiz, Luis Felipe; Tesis Doctoral:”Activación electroquímica de rutenocenos con ligantes heterodienilo”, 2006, IPN, Cinvestav, México, D.F.
25. J. A. Squella. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1994, 34, 13-18.
26. Cerecetto Hugo. *IL Fàrmaco.*, 1992, 47 (9), 1207-1213.
27. Díaz de Toranzo et al., 1988.
28. A. J. Bard, L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, Editorial John Wiley & Sons, USA, 1980.
29. Kissinger P., *Laboratory Techniques in Electrochemical Chemistry*, Editorial; Marcel Dekker, USA, 1984.
30. José Antonio Bautista Martínez; Tesis Doctoral: “Influencia del cambio en el nivel de acidez en acetonitrilo en la reducción electroquímica de compuestos orgánicos”, 2005, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
31. Juan Diego Maya, *Biochemistry and Physiology*, xx, 2206,xxx.
32. Ayala Schiaffino Natalia Blanca, Tesis de licenciatura; “Síntesis y estudios electroquímico de cinamamidas nitradas con posible actividad antichagásica”, 1996, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, México.
33. World of Health Organization, *Diseases: Tropical Diseases,Chagas Disease*, Who Publications, Geneva, 2000
34. Marr, J. J., et al. *Infect. Dis.*, 1986, 8, 884.
35. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA. *J Exp Bot.* 2001;52, 2115–26
36. Wolff SP, Garner A, Dean RT. *TIBS.*1986, 11:27–31.

37. Tsuhako, M.H., Alves, M.J.M., Colli, W., Filardi, L., Brener, Z. and Augusto. *Biochem. Physiol.* 1991, 99c(3), 317–321.
38. Juan Diego Maya, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997, 86, 101–106.
39. D.I. Edwards, *J. Antimicrob. Chemoter.* 1993, 31, 9–20.
40. D.I. Edwards, in: C. Hansch, P.G. Sammes, J.B. Taylor (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol. 2, Pergamon Press, Oxford, 1990, pp. 725–751.
41. M.A. La-Scalea, S.H.P. Serrano, E.I. Ferreira, A.M. Oliveira Brett, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 29, 561–568
42. P. Workman, M.I. Walton, F.Y. Lee, *Biochem. Pharmacol.* 1986, 33, 117–119.
43. C. Viode, *J. Chem.* 1997, 21, 1331–1338
44. J A. Guissani, Y. Henry, N. Lougmani, B. Hickel. *Biol. Med.* 1990, 8, 173–189.
45. M.V.M. Lafleur, E.J. Pluijmackers-Westmijze, O.J. Visser, N. Wagenaar, R. Soetekouw, H. Loman, J. Rete`l, *Biochem*
46. Fry, Albert J. *Synthetic Organic Electrochemistry*. Ed. Harper and Row, 1972, pp. 79-95
47. Galus Z. *Fundamentals of electrochemical analysis*, Ed. Ellis Horwood Limited. 1976, USA,
48. Kies, H. L. *J. Electroanal. Chem.* 1962, 4, 257.
49. Harris, Daniel C. *Análisis químico cuantitativo*, Grupo editorial Iberoamericana 3ª edición. 1991, E.U.

Anexo A



A.I Enfermedad de Chagas

Sinónimos: Enfermedad de Chagas-Mazza; enfermedad de Chagas-Mazza-Romaña, tripanosomiasis americana; tripanosomiasis cruzi.

La enfermedad de Chagas, es una patología tropical, producida por el protozoosis *tripanosoma cruzi*, parásito intracelular de las células del SER (Sistema Retículo Endotelial) que ataca particularmente al miocardio, esófago y colon.³² Este parásito que vive en animales silvestres de sangre caliente es principalmente transferido a los humanos a través de las materias fecales de la chinche besucona, pero también puede ser transmitida por el conducto de la leche materna, por transfusión sanguínea, puede ser adquirida también *in útero* (vía tras placentaria) o por el transplante de órganos. La enfermedad fue descrita en 1909, cuando la descubrió el médico brasileño Carlos Chagas.

Este padecimiento consta de tres etapas: aguda, latente y crónica. La fase aguda, cuando es sintomática se caracteriza por fiebre elevada intermitente y el crecimiento de ganglios linfáticos. La fase latente puede durar de 2 meses a 20 años, durante este tiempo el organismo crea anticuerpos contra el parásito sin conseguir eliminarlo, mientras que le parásito destruye células del sistema nervioso autónomo, lo cual afecta el funcionamiento del esófago y del corazón. En la etapa crónica aparecen los síntomas de la enfermedad: miocarditis, insuficiencia cardiaca progresiva y trastornos digestivos entre otros.

El proceso de infección en los humanos comienza con la penetración de los tripanosomas infectantes en las células, donde adquieren la forma redonda y se transforman en amastigotes redondos, que realizan los ciclos repetitivos de división, hasta llenar el citoplasma celular. Después los amastigotes se transforman en Tripanosomas flagelados y al cabo de cinco días son liberados al torrente sanguíneo al romperse la célula infectada, para continuar el ciclo. El sitio de inoculación se conoce como chagoma y generalmente es en tejido subcutáneo.

El Chagas es una enfermedad asociada con la pobreza, que de una manera silenciosa mina la salud de los individuos y puede traer consecuencias letales. Las zonas endémicas son principalmente zonas rurales del continente Americano donde las chinches viven en el adobe, en el pasto, en las grietas y los patios de las casas. Según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad afecta a cerca de un cuarto de la población de América Latina. Alrededor de 100 millones de personas viven en zona de riesgo de contraer el parásito y de 16 – 18 millones de personas son infectadas.³³ En México existe un millón y medio de personas que portan la enfermedad, según datos de la Secretaría de Salud Federal.

Hasta hoy no se cuenta con ninguna vacuna específica, sin embargo, muchos científicos trabajan en la síntesis y caracterización de derivados de nifurtimox y benznidazol los cuales son los fármacos en uso, se espera que estos derivados puedan presentar actividad antichagásica con menos daños colaterales a la salud.

A.II Actividad biológica de nifurtimox

El nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno)aminol]-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) es un potente fármaco tripanosomicida utilizado desde la década de los años 70 en Sudamérica en tratamientos contra el mal de Chagas .

El nifurtimox se absorbe vía oral, sin embargo, se presenta en concentraciones muy bajas en el plasma, tejidos y orina, lo que indica su rápida biotransformación. Los efectos secundarios no deseables del nifurtimox son reacciones de hipersensibilidad (dermatitis, fiebre, ictericia, infiltrados pulmonares y anafilaxias), complicaciones dependientes de la dosis y edad de los individuos, principalmente en el sistema nervioso central y periférico, así como frecuente aparición de náuseas, vómito, mialgia etc.³⁴

Este nitrofurano es un compuesto nitroheterocíclico cuya actividad biológica depende de la reducción del grupo nitro RNO_2 a anión radical nitro $\text{RNO}_2^{\cdot-}$, el cual transfiere electrones al oxígeno molecular para formar anión superóxido, (O_2^-) y peróxido de hidrógeno H_2O_2 (especies ROS). Estas formas de oxígeno son altamente perjudiciales hacia componentes celulares, incluyendo los lípidos, el DNA y las proteínas. La actividad tripanosomicida se debe a que el *T. cruzi* tiene deficiencia de defensas contra los radicales libres, ya que carece de enzimas antioxidantes, como la catalasa y es particularmente sensible a las especies de oxígeno activas.³⁵⁻³⁶ Además la nitroreductasa es muy activa en *Tripanosoma cruzi*.³⁷

Experimentos en tripanosomas y amastigotes de *T. Cruzi* muestran que la resistencia del parásito está relacionada con la cantidad de tioles libres reducidos que tengan

presentes, ya que se observó que al tratar las cepas con el fármaco nifurtimox disminuyó la cantidad de tioles libres. El decremento de estos tioles podría ser consecuencia de su conjugación con los metabolitos producto de la reducción del nitro tales como el derivado nitroso.³⁸ Otra evidencia de que los glutationes libres están involucrados en la defensa del parásito contra el nifurtimox es que aquellas cepas en las que se encontró una mayor cantidad de estos tioles presentaron una mayor resistencia.

En un estudio electroquímico desarrollado con las técnicas de voltamperometría cíclica y coulombimetría a compuestos relacionados estructuralmente con el nifurtimox, por la presencia del grupo 5-nitrofurano, se observó que los potenciales normales de reducción del grupo nitro obtenidos por voltamperometría cíclica proporcionaban información de la facilidad del proceso de transferencia de electrones. Estos se relacionaban con los datos de la actividad biológica *in vitro* previamente publicados expresados como porcentaje de inhibición de crecimiento. Los voltamperogramas obtenidos para nifurtimox y sus análogos fueron similares, lo que indica que tienen el mismo mecanismo de acción.²⁶

A.III Actividad biológica de benznidazol

El benznidazol es un nitroimidazol. Los nitroimidazoles son compuestos que han sido usados con fines terapéuticos durante los últimos 40 años. Estos compuestos son importantes porque son activos contra bacterias Gram.-positivo, Gram.-negativo y protozoarios entre otros.³⁹⁻⁴⁰

El benznidazol (N- benzil -2- nitroimidazol -1-acetamida) es utilizado en la enfermedad de Chagas y es efectivo solamente durante la etapa aguda de la enfermedad.⁴¹⁻⁴² El anión radical nitro y el derivado hidroxilamina son los intermediarios responsables de la acción tóxica de los nitroimidazoles.⁴³ Las propiedades farmacológicas de estos compuestos han sido relacionadas cuantitativamente al par redox ($\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$) y a la formación de la hidroxilamina.⁴⁴

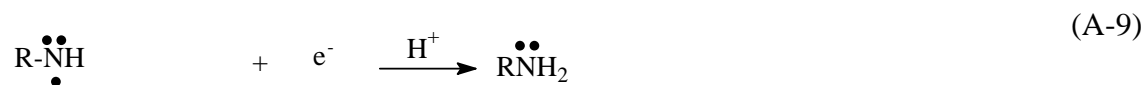
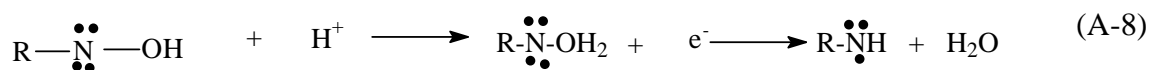
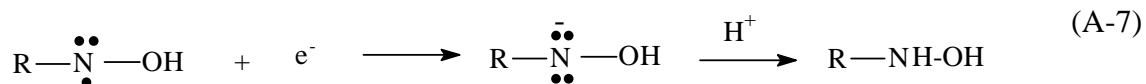
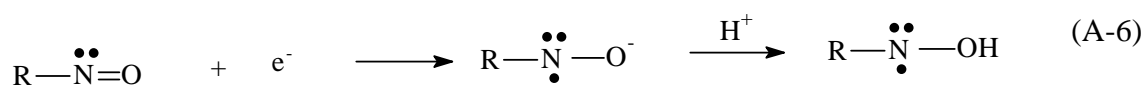
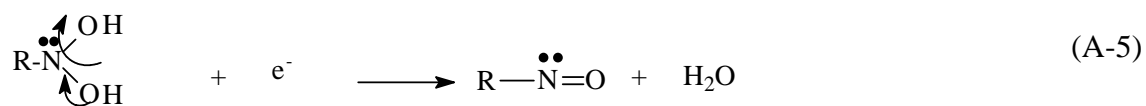
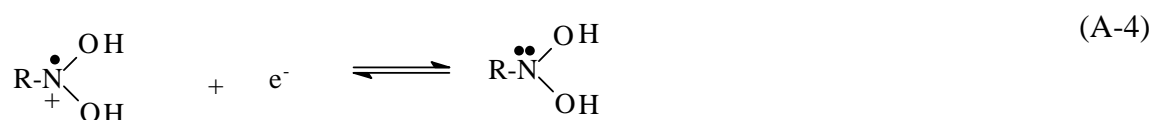
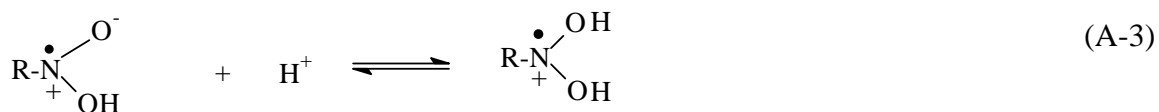
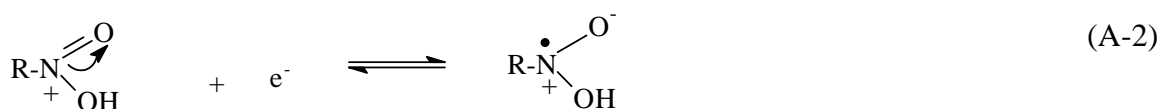
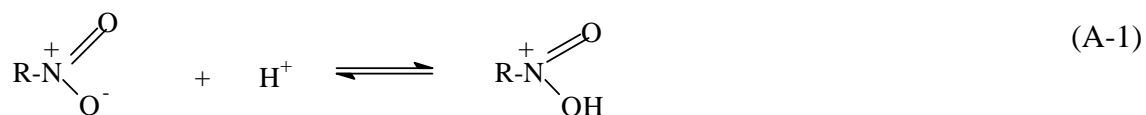
Al igual que en nifurtimox la acción tripanosomicida se debe a la generación del anión radical nitro y a los metabolitos altamente electrofilicos que se forman durante la reducción del grupo nitro.

Experimentos *in vitro* demuestran que el derivado hidroxilamina producto de la reducción del grupo nitro es una de las especies responsables de la acción tóxica de benznidazol ya que reacciona con ácidos nucleicos *in vitro* y se cree que el ADN es el blanco principal de daño *in vivo* causando mutagénesis. Se ha observado también que la hidroxilamina formada *in situ* por la reducción de nitroimidazoles causa daño al DNA

fisisorbido sobre la superficie del electrodo de trabajo, los cuales son detectados electroquímicamente al comparar los potenciales de reducción utilizando el electrodo modificado con los obtenidos con un electrodo no recubierto de DNA.^{10, 41}

Ambas la doble hélice y las hebras de DNA sufren la acción de las drogas nitroimidazoles; el daño al DNA depende de la estabilidad de los productos intermediarios formados durante la reducción.⁴⁵ El anión radical nitro es la especie principalmente responsable del daño al DNA, oxidando su doble hélice ya que las bases de ácido nucleico interactúan con los intermediarios generados durante la reducción del nitroimidazol.

La reducción electroquímica de los nitroimidazoles que se ha observado es (ecuación A-1 a A-9)



Anexo B

TÉCNICAS UTILIZADAS

B.I Voltamperometría cíclica

Ésta es una técnica electroanalítica en donde se aplica un barrido de potencial en la que se utiliza un electrodo estacionario (electrodo de trabajo) inmerso en una solución en reposo. La señal de excitación en forma de onda triangular (figura B-1) se aplica con respecto a un electrodo de referencia en una variación continua de potencial a través de la interfase electrodo-solución y puede repetirse varias veces.⁴⁶ La respuesta del sistema que se registra como consecuencia de esta perturbación es la corriente, i . Las gráficas de i vs. E son conocidas como voltamperogramas (figura B-2).

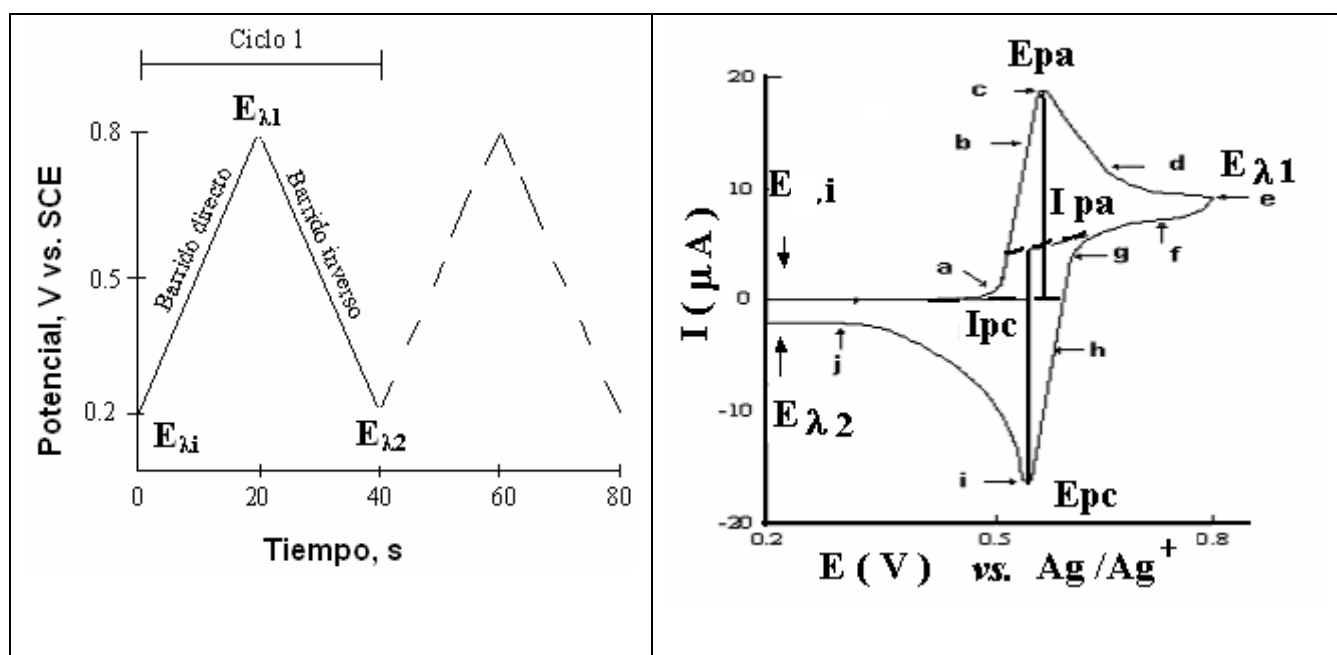


Figura B-1 Señal de excitación típica para la voltamperometría cíclica. $E_{\lambda i}$ = potencial de inicio, $E_{\lambda 1}$ y $E_{\lambda 2}$ = potenciales de inversión.

Figura B-2 Voltamperograma cíclico típico para una reacción reversible. E_{pc} = potencial de pico catódico, E_{pa} = potencial de pico anódico, I_{pc} = corriente de pico catódico, I_{pa} = corriente de pico anódico.

El barrido de potencial, E , se realiza entre los valores: E_i , E_{λ_1} y E_{λ_2} donde, E_i es el potencial de inicio en el cual no ocurre un proceso redox sobre el electrodo de trabajo, mientras que, E_{λ_1} es el potencial de inversión. El barrido se inicia de E_i a E_{λ_1} en un barrido directo hacia potenciales más positivos o negativos, hasta que ocurre la oxidación o reducción respectiva del soluto en estudio en E_{λ_1} , donde se reorienta la dirección del barrido para que el potencial regrese a su valor inicial E_i , conocido como barrido inverso. El barrido se determina para un experimento particular generalmente por la posición del par redox de interés. Los valores de las velocidades de barrido, $v = dE/dt$, pueden variar dentro de un intervalo de $0.04V s^{-1}$ a $1000V s^{-1}$ dependiendo de las escalas de tiempo que se requieran para el experimento.

Lo que ilustra la figura B-2 en el barrido directo es un pico de corriente anódica, i_{pa} , debida a una semireacción de oxidación, mientras que en el barrido inverso se observa un pico catódico, i_{pc} , consecuencia de la reducción electroquímica del producto obtenido en el barrido directo. La voltamperometría cíclica se utiliza principalmente para caracterizar las propiedades redox de compuestos y para estudiar los mecanismos de las reacciones redox, así como para obtener información termodinámica de dichos procesos, de la cinética de las reacciones de transferencia de electrones y de las reacciones químicas acopladas.⁴⁷

Se registra la corriente en la superficie del electrodo de trabajo (figura B-2) durante el barrido de potencial de onda triangular. En el barrido entre la región a y c el potencial

aplicado llega a ser suficientemente positivo y causa la oxidación de la especie reducida, R, (ecuación B-1), en la superficie del electrodo acompañado de un rápido aumento de la corriente a medida que la concentración superficial de R se hace cada vez menor. En el punto b, las concentraciones de R y de la especie oxidada, O, son iguales. La corriente del pico empieza a disminuir (puntos c a e) cuando la concentración de R es tan pequeña, que su contribución a la corriente es despreciable comparada con la contribución de la capa de difusión, la cual sigue extendiéndose hacia el interior del seno de la solución. En el punto d, la concentración de R en la superficie del electrodo es igual a cero. En el punto e se invierte la dirección del barrido. Sin embargo, la corriente continúa siendo anódica incluso cuando el barrido se dirige a potenciales más negativos. Una vez que el potencial es suficientemente negativo, la corriente cae a cero y entonces empieza a observarse una corriente catódica. La corriente catódica resulta de la reducción de O_x que se ha acumulado cerca de la superficie durante el barrido directo. Esta corriente catódica (puntos h a j) da un pico (punto i) y después disminuye (puntos i a j) a medida que O acumulado se consume en la reacción catódica. El primer ciclo se completa cuando el potencial alcanza el valor de $E_{\lambda i}$.



La magnitud de la corriente anódica o catódica durante un barrido de potencial se relaciona con los perfiles de concentración-distancia de las especies oxidadas O_x y reducidas R (figura B-3) entre el electrodo y el seno de la solución.

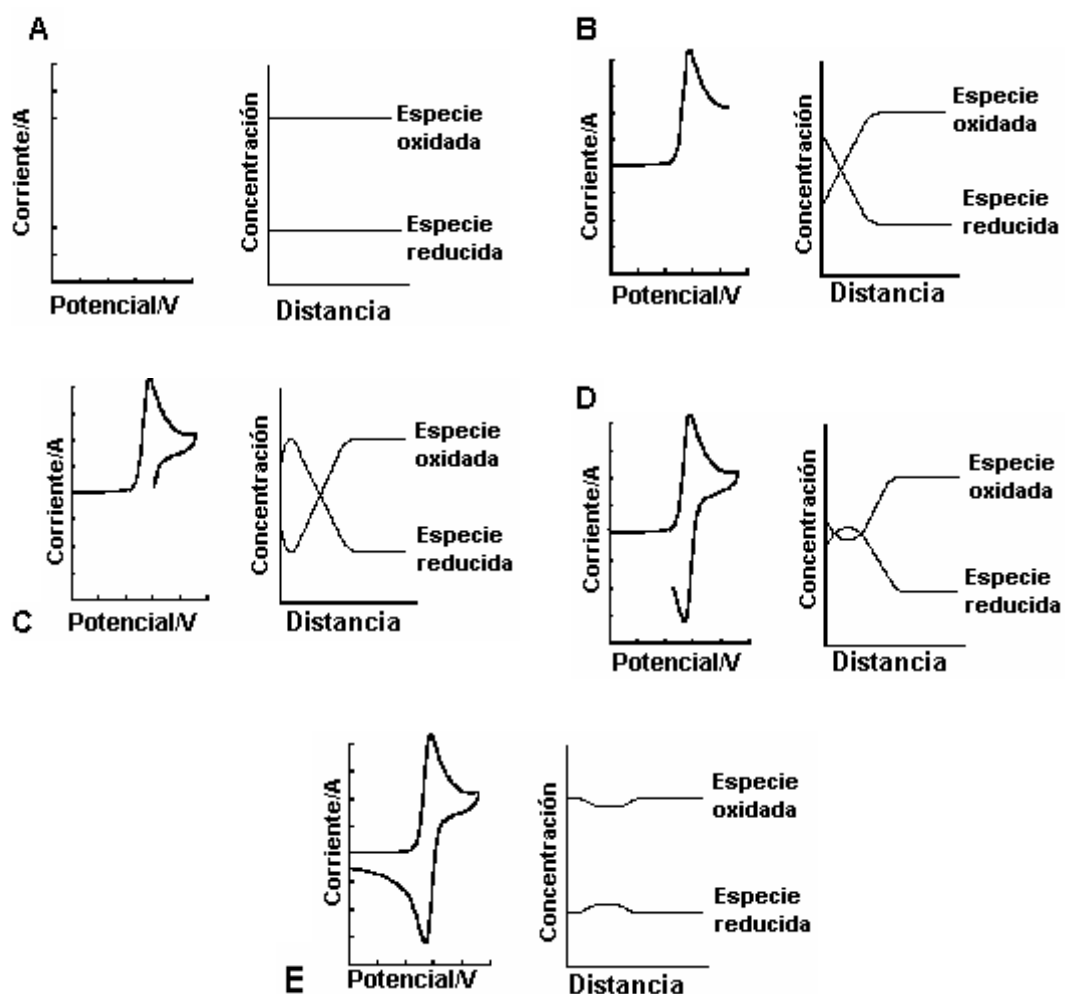


Figura B-3 Voltamperograma cíclico de 1mM O en electrolito soporte. Barrido de potencial vs. SCE. Perfiles de concentración-distancia.

Debido a que las reacciones electroquímicas son heterogéneas, la cantidad de especie electrogenerada de O_x ó R depende del área del electrodo de trabajo. Al utilizar un microelectrodo sólo la concentración interfacial del electrodo se ve afectada por las reacciones electroquímicas generando la zona conocida como capa de Nernst e induciendo la transferencia de masa del reactante por difusión. Se supone que las concentraciones más allá de esta capa límite se mantienen uniformes. Así la corriente del pico (anódico o catódico), es directamente proporcional al gradiente de

concentraciones e inversamente proporcional al espesor (δ) de la capa de difusión de Nernst, como lo muestra la ecuación B-2.²⁹

$$i = nFAD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (\text{B-2})$$

donde i es la corriente (A), n es el número de electrones transferidos por ion (equivalentes/ mol), F es la constante de Faraday (C/mol), A es el área del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s), C es la concentración (mol/cm^3), y x es la distancia desde el electrodo (cm).

Los parámetros importantes de un voltamperograma cíclico son las magnitudes de la corriente de pico anódico, i_{pa} , y catódico, i_{pc} , que dan información de la concentración de la especie electroactiva y del número de electrones transferidos. El valor del potencial de pico anódico, E_{pa} , y catódico, E_{pc} , cuyo valor corresponde respectivamente a la cantidad de energía requerida para que la oxidación o reducción ocurran. Cuando en un par redox ambas especies intercambian electrones rápidamente con el electrodo de trabajo se dice que se tiene un sistema reversible. El potencial de media onda (potencial formal de reducción) $E_{1/2}$ para un par reversible está centrado entre E_{pa} y E_{pc} (ecuación B-3).

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$$

El número de electrones transferidos , n , para un par química y electroquímicamente reversible puede ser determinado mediante la separación entre los potenciales de pico (ecuación B-4).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong 0.056 \text{ V} / n \quad (\text{B-4})$$

Para una transferencia monoelectrónica reversible se espera obtener un valor ΔE_p aproximado de 0.056 V. Una cinética lenta de transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo da lugar a la irreversibilidad del proceso que se evidencia por un aumento en la separación de los picos, $\Delta E_p > 0.056 \text{ V}/n$.

La corriente de pico para un sistema reversible se describe por la ecuación de Randles-Sevcik¹ para el barrido negativo en el primer ciclo (ecuación B-5).

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} v^{1/2} C \quad (\text{B-5})$$

donde i_p es la corriente de pico (amperes), n es el número de electrones transferidos, A es el área del electrodo (cm^2), D_o es el coeficiente de difusión (cm^2/s), C es la concentración (mol/cm^3), y v es la velocidad de barrido (V/s). De acuerdo a esto, i_p aumenta con la $v^{1/2}$ y es directamente proporcional a la concentración. Los valores de i_{pc} y i_{pa} son idénticos para un sistema reversible (ecuación B-6):

$$i_{pc}/i_{pa} = 1 \tag{B-6}$$

Sin embargo, la relación de corrientes puede ser influenciada significativamente por reacciones químicas acopladas al proceso del electrodo. La irreversibilidad electroquímica se origina por el lento intercambio del electrón de las especies rédox con el electrodo de trabajo. En este caso, las ecuaciones (B-3), (B-4), (B-5) y (B-6) no son aplicables.

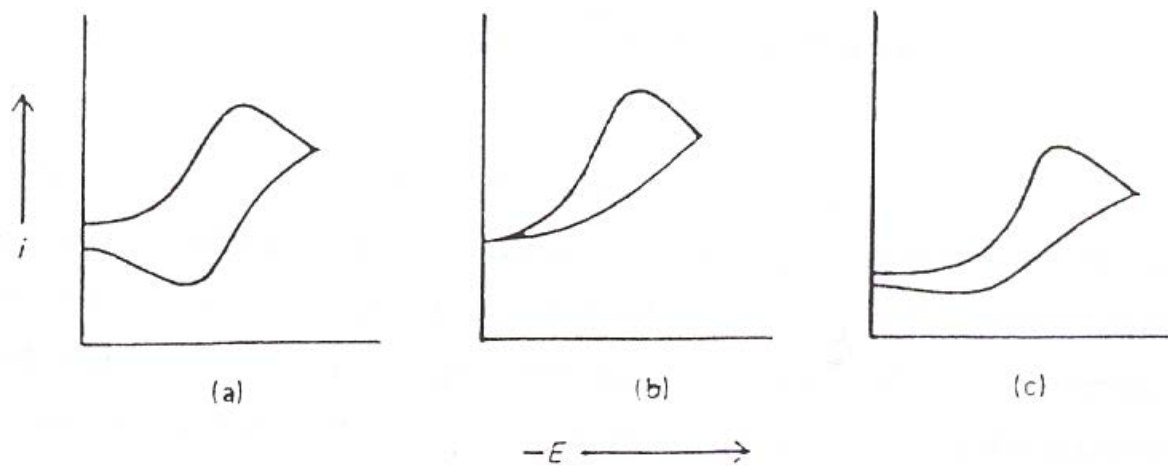
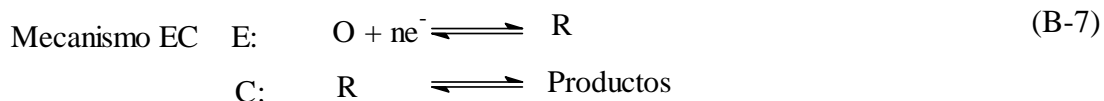


Figura B-4. Voltamperogramas cíclicos representativos. (a) Proceso reversible. (b) Proceso irreversible. (c) Proceso con reacciones químicas acopladas.

Suponiendo que el proceso de electrodo es totalmente irreversible (ecuación B-6), el voltamperograma se ilustra en la figura 1.7a. Nótese la ausencia total de picos de corriente anódica. Esto es consistente con el bajo porcentaje de reoxidación de R e inclusive es una evidencia experimental de irreversibilidad.



En la figura B-4c se observa un pico anódico menor al catódico. Si a velocidades de barrido rápidas se observa un aumento del pico anódico y a velocidades lentas disminuye, el comportamiento se asocia a una reacción química, C, la cual es una reacción subsiguiente a la transferencia de electrones, E (reacción electroquímica) (ecuación B-7)



donde R reacciona químicamente y no queda disponible para su reoxidación durante el barrido inverso.

B.II Coulometría

La coulometría es un método basado en la oxidación o reducción de un compuesto electroactivo, durante el tiempo suficiente para garantizar su conversión cuantitativa a un nuevo estado de oxidación. De esta manera este método es útil para establecer el número de electrones n involucrados en una reacción electroquímica y obtener información sobre la estabilidad de las especies generadas a escalas de tiempo grandes (minutos).⁴⁸ Las ventajas que se tienen al utilizar este método para calcular el valor de n son que no se requiere calibrar el área del electrodo de trabajo y no se requiere un conocimiento previo del coeficiente de difusión a diferencia de otras técnicas como la voltamperometría cíclica. Las desventajas que presenta es que no es de los métodos más selectivos, por ello para el análisis coulométrico, una condición necesaria es que las reacciones se efectúen en un 100% de eficiencia electroquímica, es decir los electrones no pueden utilizarse en reacciones colaterales, o de lo contrario la medición de la cantidad de carga pierde su significado.⁴⁹⁻²⁴

Para realizar una coulometría se utiliza como electrodo de trabajo, un macroelectrodo, para garantizar la completa conversión de la sustancia de interés a un nuevo estado de oxidación. Al realizar la coulometría de potencial controlado, se obtiene una curva carga-tiempo, $Q-t$, que sirve para servir para estimar el total de coulombios consumidos asociados a la cantidad de sustancia electrolizada, lo cual permite la determinación del valor de n , mediante la ley de Faraday (ecuación B-8), la cual es la base del análisis coulométrico.

$$Q^0 = nFN_0 \quad (\text{B-8})$$

donde Q^0 es el valor de carga total Q en coulombios, una vez completada la conversión ($t \rightarrow \infty$), N_0 es el número total de moles de sustancia electroactiva inicialmente presentes y es el número de electrones intercambiados.

Para validar el cálculo de n se requiere que el mecanismo observado en técnicas electroquímicas de microescala (menores de una décima de segundo), como la voltamperometría cíclica y el observado en experimentos preparativos (escala de varios minutos o más) sea idéntico, una condición difícil de verificar cuando se realizan reacciones químicas muy lentas posteriores a la transferencia electrónica, las cuales pueden o no afectar a las mediciones voltamperométricas.

Antes de iniciar un experimento coulométrico debe elegirse un potencial fijo de electrodo dentro de un intervalo en el que el pico voltamperométrico asociado a la sustancia a electrolizar alcance su valor límite y no a valores mayores; porque esto último podría conducir a la electrólisis de especies indeseables. La optimización de los tiempos de reacción depende de una agitación efectiva de la solución y de la selección de un electrodo de trabajo con una gran superficie²⁴.

B.III Espectroelectroquímica UV-vis

Las bases de la espectroelectroquímica son, en principio, simples. Si un haz de radiación electromagnética atraviesa un electrodo transparente en el que se está produciendo una reacción electroquímica, la evolución de este proceso puede ser seguido por las variaciones de absorbancia del sistema (figura B-5).

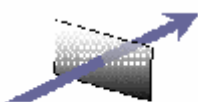


Figura B-5 Un haz de radiación atraviesa un electrodo transparente en dirección normal.

Para que lo anterior sea válido se debe satisfacer: 1) que el electrodo sea transparente a la radiación y, naturalmente, que sea conductor de la corriente eléctrica; 2) que alguna de las especies que participan en la reacción, reactivos o productos, sean capaces de interactuar con el haz de radiación.

Considerando el caso particular de la espectroscopia ultravioleta –visible, la radiación electromagnética comprende una longitud de onda, λ , entre 190 y 800 nm. Esta radiación es absorbida por las moléculas, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor.

Suponiendo que en un electrodo plano y transparente mediante una electrólisis preparativa a potencial controlado se produce la reacción (ecuación B-9) para electrogenerar *in situ* especies reactivas como los aniones radicales:



Considerando que la disolución no se agita y que la especie $R - NO_2^{\bullet-}$ generada, inicialmente ausente de la disolución, es capaz de absorber radiación ultravioleta a una longitud de onda característica, las variaciones de absorbancia detectadas a esa longitud de onda particular, son consecuencia de la aparición de una cierta concentración de $R - NO_2^{\bullet-}$ en la capa de difusión. En una primera aproximación, es posible relacionar la absorbancia +medida, A , con la concentración molar de $R - NO_2^{\bullet-}$ en la capa de difusión mediante aplicación de la ecuación de Lambert-Beer (ecuación B-10)

$$A = \varepsilon l C_o \quad (B-10)$$

donde; A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absortividad molar, l es el camino óptico determinado por la longitud de la celda y c la concentración de la especie absorbente.

Si se asume que el producto de la electrólisis es únicamente la especie $R - NO_2^{\bullet-}$ y que no sufre reacciones químicas acopladas que den como resultado otras especies que absorban radiación ultra-violeta a longitudes de onda muy cercanas a la de la especie $R - NO_2^{\bullet-}$, entonces al graficar la absorbancia como función del tiempo de electrólisis, ésta debe ser una línea recta (figura B-6).