



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADO EN QUÍMICA

**PROPIEDADES ELECTROQUÍMICAS DE FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS:
BENZNIDAZOL**

ARCE, Lida Belén

SANTA ROSA, LA PAMPA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) de La Plata, dependiente de CONICET, La Plata, y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLP; durante el período comprendido entre el 29 de junio de 2012 y 30 de mayo de 2014, bajo la dirección de CARAM, Jose; y bajo la codirección de MASTRANTONIO, Guido Enrique.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por un parasito flagelar, *Trypanosoma cruzi*, transmitido a humanos por hematófagos triatomínicos, transfusiones de sangre, o por transmisión vertical (madre-hijo). Aunque en los últimos años se han producido grandes avances en el control de la transmisión por vector y por transfusión, la transmisión congénita todavía es muy importante ⁴⁻⁶. Los fármacos disponibles en la actualidad para tratar a los pacientes con Chagas son el nifurtimox (NFX) y benznidazol (BNZ), dos nitrocompuestos.

El principal mecanismo de acción de los nitrocompuestos es a través de reacciones redox. Para el BNZ, el compuesto estudiado en el presente trabajo, se ha propuesto que su acción tripanocida es mediante la reducción del grupo nitro de dicha molécula. Por lo que se estudia el comportamiento electroquímico del BNZ mediante voltamperometría cíclica en diferentes solventes no acuosos con el objetivo de poder conocer los intermediarios de la reducción controlada del mismo.

Se demuestra la presencia de importante actividad electroquímica en solventes no acuosos, especialmente los procesos de electrorreducción. En éstos medios, la respuesta es influenciada por una gran cantidad de variables, como por ejemplo, la naturaleza del solvente, las sales del electrolito soporte, el pH del medio, entre otras. Esta variabilidad implica la reducción del BNZ mediante un proceso muy vulnerable al entorno, de manera que muy probablemente estas propiedades electroquímicas se manifiesten de un modo particular y diferente en cada uno de los entornos biológicos vinculados con sus mecanismos de acción tripanocida y/o de generación de efectos adversos en pacientes en tratamiento.

Palabras claves: Chagas, benznidazol, Voltamperometría cíclica.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by a flagellate parasite, *Trypanosoma cruzi*, transmitted to humans by blood-sucking Triatominae, blood transfusions, or by vertical transmission (mother to child). Recently there have been major advances in the control of vector transmission and blood transfusion transmission, congenital transmission is still very important. The drugs currently available to treat patients with Chagas disease are nifurtimox (NFX) and benznidazole (BNZ), two nitro compounds.

Nitro compounds main mechanism of action is via nitro-redox reactions. For the BNZ, the compound studied in this work, it is proposed that the trypanocidal action is the reduction of the nitro group of the compound. So I studied the electrochemical behavior of BNZ by cyclic voltammetry in different non-aqueous solvents with the goal of detecting the intermediate steps controlling the reduction of BNZ.

I found important electrochemical activity in non-aqueous solvents, so electroreduction processes are demonstrated. In these media, the response is influenced by many variables, such as the nature of the solvent, supporting electrolyte salts, medium pH, among others. This variability implies that the BNZ reduction is a process vulnerable to environment. Therefore these electrochemical properties are manifested in particular ways depending on the biological environments relateds to the trypanocidal action mechanisms and /or the generation of adverse effects in patients during treatment.

Key words: Chagas, benznidazole, cyclic voltammetry.

INDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

Problemática de la Enfermedad	1
-------------------------------------	---

CAPITULO 2: ANTECEDENTES GENERALES

Historia de los medicamentos	5
Comportamiento del Fármaco	9
En el parásito	13
En mamíferos	16
¿Porque la Electroquímica?	17
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18

CAPITULO 3: Métodos Electroquímicos

Generalidades	19
Estudio de las reacciones electroquímicas: Voltamperometría.....	21
Voltamperometría Cíclica	25
Reacciones Reversibles	28
Reacciones Irreversibles	30

CAPITULO 4: Materiales y métodos

Reactivos utilizados	32
Instrumental utilizado	33

CAPITULO 5: Resultados y Discusión

Comportamiento Electroquímico de BNZ en solventes no acuosos.....	36
Voltamperometría Cíclica	36
Dimetilsulfóxido (DMSO)	36
Etanol (EtOH)	42
Dimetilformamida (DMF)	44
Discusión	51
Influencia del electrolito soporte	54
Conclusiones	56
Proyecciones a Futuro	57
Bibliografía	59

Capítulo 1: Introducción

Problemática de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas afecta aproximadamente a 15 millones de personas en Sudamérica, con 7000 muertes anuales debido a sus complicaciones. La distribución geográfica de esta enfermedad es amplia, abarcando gran parte de América, con características endémicas en casi toda Sudamérica.¹

Esta enfermedad, llamada así en referencia a Carlos Chagas, quien fue el primero en describirla en 1909, es causada por un parásito flagelar, *Trypanosoma cruzi*, transmitido a humanos por hematófagos triatomíneos, transfusiones de sangre ² o por transmisión vertical (madre-hijo)⁴.

El ciclo de acción del *T.cruzi* y su forma de infección se basan en el vector biológico del protozoo, *Triatoma infestans*, vulgarmente conocido como “vinchuca”. Este ingiere sangre infectada con el protozoo, el cual en el intestino del vector se transforma en un epimastigote que se reproduce en gran número. Sigue hasta el intestino del huésped hasta transformarse en tripomastigote, sale del huésped a través de sus fecas. Al momento de picar a sus huéspedes, la vinchuca defeca introduciendo los tripomastigotes en el tejido donde se transforman en amastigotes, luego se multiplican para volver a la forma de tripomastigotes y entrar a la circulación. Por medio de la circulación sanguínea estas estructuras se distribuyen en el organismo³. Este ciclo se ilustra en la figura 1.1

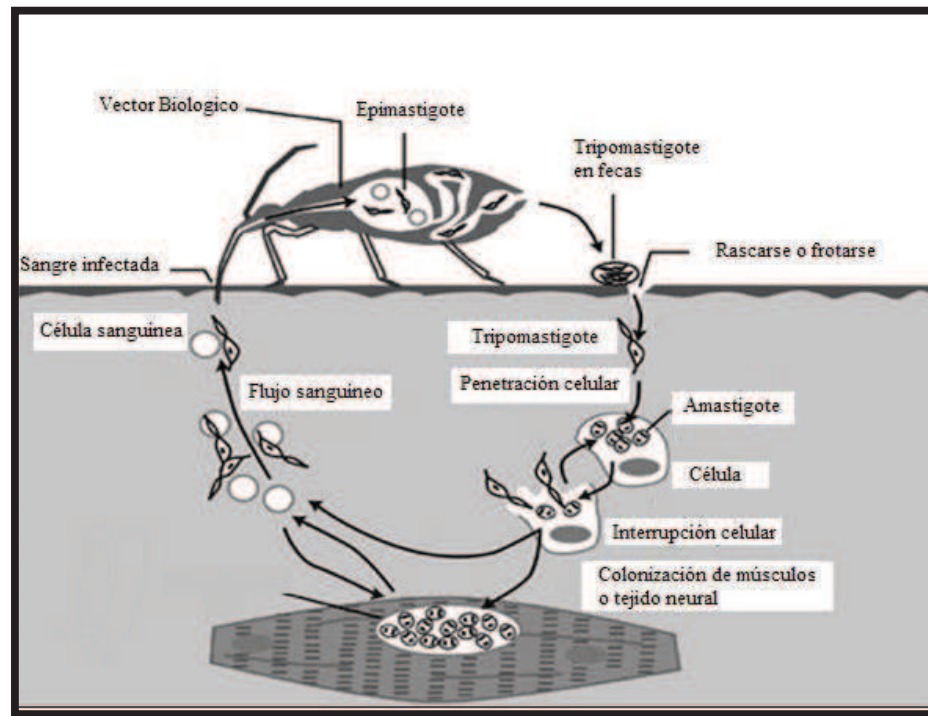


Figura 1.1: Ciclo vital del *T. cruzi* ³.

El Chagas tiene dos fases sucesivas en humanos: aguda y crónica. La fase aguda dura entre 6 y 8 semanas. Una vez terminada esta fase, la mayoría de los pacientes infectados aparentemente recuperan un estado de salud, en el cual ningún daño de órganos puede ser demostrado por métodos estándares actuales de diagnóstico clínico. La infección puede ser verificada solamente por test serológicos o parasitológicos. Esta forma de la fase crónica del Chagas es llamada forma indeterminada. La mayoría de los pacientes permanecen en esta forma de la enfermedad.

Sin embargo, después de varios años de permanencia en la fase crónica, del 20 al 35% de los individuos afectados, dependiendo de la zona geográfica, desarrollan lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo en el corazón, esófago, colon, y sistema nervioso periférico. La fase crónica dura el resto de la vida del individuo afectado.²

Aunque en los últimos quince años se han producido grandes avances en el control de la transmisión por vector y por transfusión, la transmisión congénita todavía es muy

importante⁵⁻⁷. Un estudio llevado a cabo en centros de salud de la ciudad de Buenos Aires reveló que la prevalencia de infección por *T. cruzi* alcanza al 2% de la población pediátrica estudiada⁴.

Los únicos fármacos disponibles en la actualidad para tratar a los pacientes con Chagas son el nifurtimox (NFX) y benznidazol (BNZ); aunque se encuentran en instancia de análisis clínicos nuevas drogas para el tratamiento en la fase crónica de la enfermedad⁸. NFX y BNZ están aprobadas para el tratamiento de la población pediátrica por la Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología (ANMAT) y el Ministerio de Salud de la República Argentina.

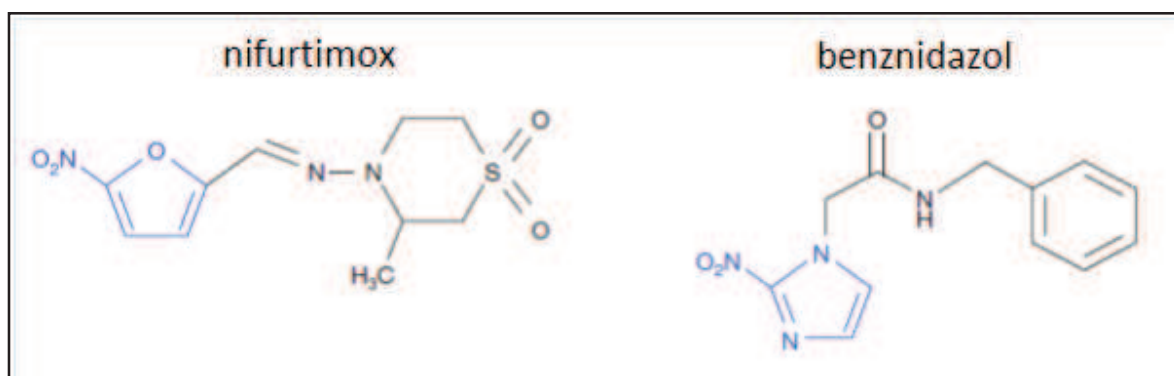


Figura 1.2 Fórmula química de benznidazol y nifurtimox

A pesar de que tanto BNZ como NFX fueron desarrollados hace más de 40 años, sus propiedades farmacológicas (metabolismo en humanos, mecanismo de acción y de efectos adversos, etcétera) no han sido estudiados en detalle. En especial, la información disponible sobre la farmacocinética en humanos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de estas drogas es rudimentaria en el mejor de los casos y virtualmente inexistente en poblaciones especiales como niños, ancianos y mujeres embarazadas o lactantes.

En pacientes con infecciones en fase aguda, independientemente de la vía de transmisión (vectorial, transplacentaria, etc.), y en fase crónica reciente (especialmente en niños y adolescentes), tanto BNZ como NFX han demostrado ser eficaces. En infección crónica del adulto, estos fármacos se encuentran en evaluación para demostrar su eficacia en la

cura de la infección y prevención de la morbimortalidad, sin resultados concluyentes hasta el momento.

Capítulo 2: Antecedentes Generales

Historia de los medicamentos antichagásicos

De los dos fármacos usados, BNZ, originalmente producido por el laboratorio Roche, que discontinuó su producción en 2004, es producido actualmente en Argentina por un consorcio que reúne al Ministerio de Salud, los laboratorios ELEA y Maprimed y a Mundo Sano. También es producido en Brasil por el Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco (LAFEPE). El medicamento cuenta con la autorización como especialidad medicinal por parte de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología (ANMAT) La presentación de este fármaco es en comprimidos de 50 miligramos de rápida disolución (además de la tradicional de 100 miligramos), lo cual facilita su administración especialmente en pediatría.¹⁰

Estos medicamentos fueron sintetizados en los años sesenta y desde entonces apenas se han desarrollado. Ambos se incluyen en la LME (Lista de Medicamentos Esenciales) de la OMS, pero no en las listas nacionales de muchos países endémicos. Se sabe además que poseen efectos secundarios graves.¹¹

De acuerdo al relato del Prof. Dr. Humberto S Lugones (Agosto 2004)¹²: “Los únicos medicamentos realmente curativos o específicos para el periodo agudo de la Enfermedad de Chagas, el NIFURTIMOX y el BENZNIDAZOL, fueron puestos al uso médico gracias a los ensayos realizados en el Centro de Chagas de Santiago del Estero.”Y continua: “En el ensayo de droga de BAYER (NFX), llamada originalmente Bay 2502, fueron 470 los casos agudos tratados. El laboratorio BAYER citó a Santiago de Chile a todos los participantes del ensayo de la nueva droga, en noviembre de 1968. Allí, la mayor experiencia fuera de la Argentina, fue el trabajo de CEDILLOS, de El Salvador, quien presentó 24 casos tratados. En consecuencia, la decisión que tomó el laboratorio de poner en circulación el tratamiento para fase aguda, fue tomada en base a la experiencia de Santiago del Estero, con el 80% de curaciones en seguimiento de más de un año, con xenodiagnóstico y serología realizadas por el Instituto

"Fatala Chabén " de Buenos Aires. En cuanto a la droga del Laboratorio ROCHE (BNZ), que encargó al Centro de Chagas de Santiago del Estero, en exclusividad, el ensayo se realizó también con la colaboración del instituto "Fatala Chabén "; en término de un año, se trataron con el Ro 7 -1051 (BNZ), algo más de cien casos, con resultados similares a los ensayos anteriores, lo que determina al Laboratorio, poner la droga al uso médico para el tratamiento del Chagas agudo. Como se advertirá, estas pruebas fueron posibles de realizarse gracias al elevado número de pacientes agudos que en ese momento manejaba el Centro de Chagas. En menos de cinco años, entre septiembre de 1966 y 1970 inclusive, se vieron 1050 casos agudos, más que los que vieron los médicos brasileños en 70 años, porque según PINTO DIAZ, hasta 1984, se vieron en Brasil, no más de 800 casos.”

“Otro importante aporte argentino fue la demostración del porcentaje de los casos inaparentes, ya supuesto por CHAGAS y MAZZA, ante la observación de los escasos casos agudos diagnosticados y la gran cantidad de casos crónicos descubiertos por serología. Fue el Dr. JUAN B. REBOSOLAN, Director del Laboratorio del Centro de Chagas quien en la década del 60, llevó a cabo la siguiente experiencia: En un área próxima a Santiago, realizó xenodiagnóstico a 197 niños de 2 años, tomados al azar. Resultaron 17 casos positivos y solo uno de ellos tenía antecedentes de edema en un ojo, meses antes, todo los demás eran niños sanos sin ningún antecedente que pudiera hacer pensar en Chagas. Con estas dos experiencias, las primeras que se realizaron en toda Latinoamérica, quedó demostrada la gran inapariencia del "período agudo".”

Como antecedentes de éstos fármacos, se pueden citar los agentes quimioterápicos empleados de 1936 a 1960, como una tentativa de tratamiento de la enfermedad de Chagas, de los cuales se destacan los derivados de las quinoleínas y varios otros antimaláricos, arsenobenzoles y otros arsenicales, fenantridinas, sales de oro, bismuto, cobre, zinc, yoduro de sodio, violeta de genciana, aminopterina, ácido paraaminosalicílico, hidrazida del ácido nicotínico, sulfonamidas, antihistamínicos, ACTH y cortisona, más de 30 antibióticos y algunos nitrofuranos con resultados negativos o discutibles.

A partir de 1961, Brener³⁵ revisó los nitrofuranos estudiados experimentalmente por Packchianian³⁶ en la infección experimental por el *T. cruzi*. Demostró, de forma clara e indudable, que la nitrofurazona (5-nitro-2-furaldehído semicarbazona) en esquema de duración

prolongada (un promedio de 53 días) con una dosis de 100 mg/kg/día curaba más de 95% de los ratones crónicamente infectados, abriendo una nueva era en la terapéutica de la enfermedad de Chagas. Al poco tiempo, Ferreira³⁷ y colaboradores también trataron 10 casos agudos de la enfermedad con nitrofurazona, “con buenos resultados y pocos efectos colaterales” pero, enseguida, verificaron que cinco de ellos volvieron a tener xenodiagnóstico positivo. Coura³⁷ y colaboradores informan, en trabajos publicados en 1961 y 1962, que trataron 14 casos crónicos con nitrofurazona (Furacin) en dosis progresivas (10, 20 y 30 mg/kg/día en la primera, segunda y tercera semana respectivamente); los efectos colaterales, en los primeros cuatros casos, fueron tan intensos (polineuropatía sensitiva) que el tratamiento tuvo que ser interrumpido. Reiniciaron el tratamiento con 10 mg/kg/día en otros 10 pacientes, 5 de ellos toleraron el tratamiento a pesar de los efectos colaterales (anorexia, pérdida de peso, parestesias y polineuropatía sensitiva) durante 60 días; uno de esos pacientes con infección crónica reciente (18 meses) toleró el tratamiento con 20 mg/kg/día durante 53 días. De los seis pacientes tratados por un período prolongado (más de 50 días), dos fueron considerados curados, basados en la negativación persistente del xenodiagnóstico y en la reacción de fijación del complemento (reacción de Guerreiro y Machado), y jamás volvieron a ser positivos. Cançado³⁸ y colaboradores, en 1964, también trataron cinco pacientes crónicos con nitrofurazona con una dosis de 10 mg/kg/día en períodos variables con tolerancia de 10 a 34 días, con falla terapéutica. La conclusión final fue la de que la nitrofurazona podría ser curativa pero los pacientes no toleraban los efectos colaterales en las dosis y tiempo necesarios para la cura.

Al final de la década del 60 e inicios del 70, dos nuevos fármacos surgieron con mejores perspectivas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas tanto por el potencial curativo, particularmente para la fase aguda, como por la tolerancia: el NFX, un nitrofurano: 3-metil-4(5'-nitrofurfurilideno-amino)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (Bayer 2502) comercializado bajo el nombre de Lampit y el BNZ (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) (RO 7-1051) comercializado bajo el nombre de Rochagan® en Brasil y Radanil® en Argentina. El NFX, desarrollado por Bock y colaboradores, y el BNZ, desarrollado por Richle³⁹, se mostraron activos *in vitro* e *in vivo* contra el *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos con ambos fármacos variaron de acuerdo con la fase de la enfermedad, duración del tratamiento, edad de los pacientes y con el área geográfica de origen. Los mejores resultados fueron obtenidos en la fase aguda de la enfermedad, en niños y pacientes con infección reciente, usándose NFX con una dosis de 8 a 10 mg/kg/día o BNZ 5 a 7,5 mg/kg/día de 60 a 90 días. En la fase crónica, con pacientes adultos, los mejores resultados fueron obtenidos en el sur de Brasil, Argentina y Chile, por lo tanto, en el Cono Sur, probablemente debido al tipo de cepa del *T. cruzi* de esa región. En síntesis se puede decir que el porcentaje de cura fue de 60 a 80% en la fase aguda y de 10 a 20% en la fase crónica, de acuerdo con los diversos autores y áreas geográficas. Algunos autores que obtuvieron “altos porcentajes de cura” en la fase crónica se basaron en la negatividad del xenodiagnóstico o de la PCR, que pueden ser negativos en más del 50% de los pacientes con reducción de parasitemia, aunque no se encuentren curados.

Los efectos colaterales más frecuentes del NFX fueron anorexia, pérdida de peso, excitabilidad psíquica o somnolencia y manifestaciones digestivas como náuseas, vómitos y, ocasionalmente, cólicos intestinales. Los efectos colaterales del BNZ pueden ser clasificados en tres tipos: (i) manifestaciones de hipersensibilidad como dermatitis con erupción cutánea (generalmente entre el 7° y 10° día de tratamiento), edema periorbital o generalizado, fiebre, linfadenopatía y dolores musculares y articulares; (ii) depresión de la médula ósea, entre las cuales neutropenia, agranulocitosis y púrpura trombocitopénica; (iii) polineuropatía periférica representada por parestesias y polineuritis.

Considerando que el ergosterol es el principal esteroide del *T. cruzi*, en la última década las investigaciones se inclinan al desarrollo de un inhibidor eficaz de ese esteroide. Urbina y colaboradores desarrollaron el DO870 que curaba un alto porcentaje de animales infectados con *T. cruzi* a corto y largo plazo. Recientemente, Molina⁴⁰ y colaboradores demostraron que el triazólico posaconazol (SCH 56592 Schering-Plough) inhibe la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la síntesis del ergosterol hasta 100 veces más que el DO870, inclusive de cepas resistentes al NFX y BNZ. En este momento, el posaconazol está en fase inicial de experimentación en seres humanos.¹³

Comportamiento del fármaco BNZ

Los compuestos químicos en sistemas biológicos pueden ser activados a intermediarios reactivos por mecanismos enzimáticos y/o no enzimáticos. Los iones metálicos, tales como el hierro y el cobre pueden facilitar el proceso de autooxidación de algunos xenobióticos; o agentes reductores como el ácido ascórbico intervienen en la regeneración del compuesto original, estableciéndose un ciclo redox no enzimático.

Sin embargo, la mayoría de los procesos por los cuales se generan radicales libres es a través de la catálisis enzimática. En general, la probabilidad de que un compuesto pueda ser reducido enzimáticamente depende de su potencial de reducción, por lo que, compuestos con alta afinidad electrónica son más fácilmente reducidos por sistemas biológicos que otros.

El sistema del citocromo P450 microsomal cataliza la biotransformación reductiva de algunos xenobióticos como los nitrocompuestos, como lo hace en una nitroreducción aromática, cuando la presión de oxígeno es muy baja.

Debido a la transferencia de equivalentes de reducción en las reacciones catalizadas por el citocromo P450, algunos xenobióticos aceptan uno o dos electrones. Es decir, el sustrato acepta los electrones y se reduce, en lugar de hacerlo el oxígeno molecular. En el caso de los nitrocompuestos, los equivalentes de reducción disminuyen el estado de oxidación del nitrógeno y el grupo nitro forma la amina mediante una serie de reacciones secuenciales. En la reducción están involucradas las llamadas nitrorreductasas, entre ellas muchas flavoenzimas y la NADPH citocromo P450 reductasa, además del citocromo P450.

Los potenciales redox muy bajos, la baja especificidad del sustrato y las uniones fuertes de estos sistemas con el ligando hacen que transfieran los electrones a xenobióticos, resultando una biotransformación reductiva en lugar de una oxidación, que es lo más frecuente.¹⁴

La formación de intermediarios reactivos puede demostrarse utilizando espectroscopia de spin electrónico (ESR), sin embargo, el espectro se obtiene solo bajo anaerobiosis dado que en presencia de oxígeno, el intermediario reactivo se reoxida rápidamente al sustrato original.

NFX y BNZ actuarían a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. El grupo nitro de ambas drogas es reducido a un grupo amino por la acción de nitroreductasas, con la formación de varios radicales libres intermediarios y metabolitos electrofílicos. Este proceso, comienza con una reacción catalizada por una NADPH-citocromo P450 reductasa, que actúa sobre el grupo nitro del tipo de moléculas R-NO₂, produciendo un radical nitroanión intermediario (R-NO₂^{•-}) ¹⁹⁻²⁰. Este radical sufre un reciclado redox con una molécula de oxígeno, la cual es parcialmente reducida y regenera la droga²¹. El anión superóxido (O₂^{•-}) sufre una dismutación por una superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El anión superóxido (O₂^{•-}) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en presencia de Fe²⁺ forma el radical libre hidroxilo (reacción de Haber-Weiss). Estos radicales libres, principalmente el OH[•], se unen a los lípidos, proteínas, y ADN, dañándolos.

De acuerdo a algunas de las teorías planteadas, el proceso in vivo comenzaría con una reducción catalizada por una flavoenzima que actúa sobre el grupo nitro formando el radical nitroanión (RNO₂^{•-}) (ver Figura 2.1).

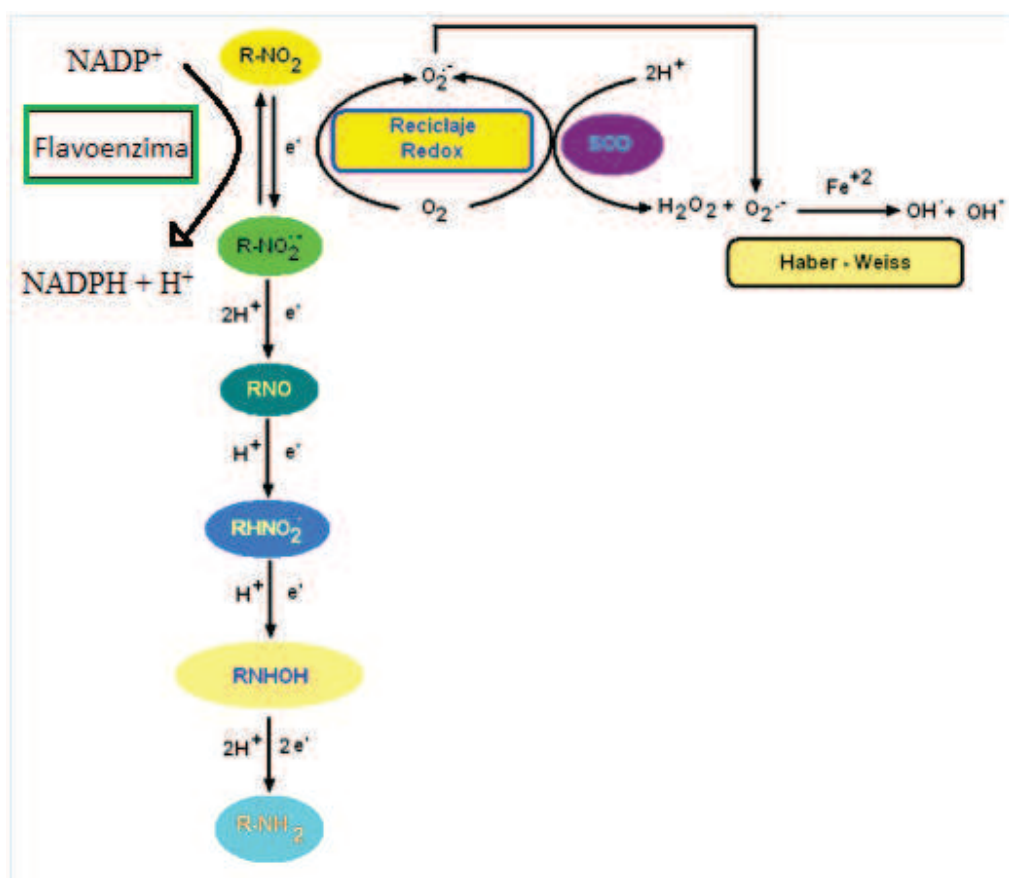


Figura 2.1: Ciclo redox y etapas de la nitroreducción de nitrocompuestos²⁵

La toma de un electrón por parte de un nitrocompuesto (RNO_2), que tienen la capacidad de aceptar 6 electrones, genera el $RNO_2^{\bullet-}$ que, en condiciones aeróbicas, le transfiere el electrón al O_2 regenerando el RNO_2 y produciendo $O_2^{\bullet-}$.

Por otro lado la incorporación de dos electrones al RNO_2 genera intermediarios nitrosos extremadamente reactivos, y la reducción por un electrón de éstos, genera a su vez el radical hidronitróxido, que deriva luego de una segunda reducción a hidroxilamina (ver Figura 2.2)

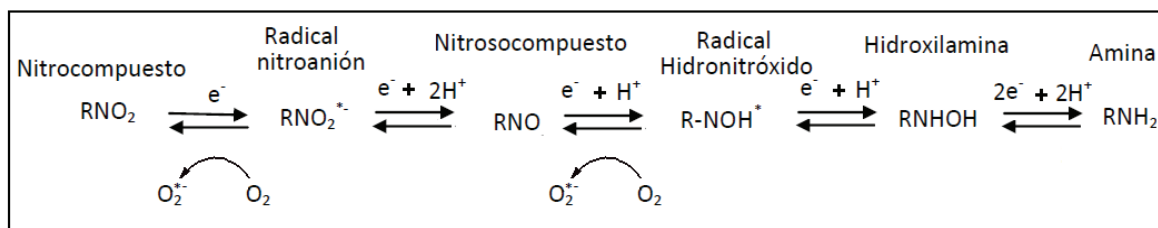


Figura 2.2 Reducción de un nitrocompuesto que no ingresa a un ciclo redox

En ambos casos, si el ciclo redox y/o la generación de intermediarios reactivos continuaran por tiempo indeterminado, los mecanismos de defensa celulares se verían excedidos permitiendo la acumulación de estas especies radicales y el daño a las biomoléculas.

Una vez que se ha formado el $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ se puede observar un aumento en la generación de radicales libres dependiendo de la oxigenación de la célula, o puede resultar un metabolismo en varias etapas enzimáticas. No solo puede existir cooperación entre sistemas enzimáticos si no que también pueden darse las reacciones puramente químicas.¹⁴

Cuando NFX es adicionado a las células infectadas de *T. cruzi*, se detecta un espectro característico en ESR correspondiente a un radical nitroanión. Estos y otros experimentos sugieren que la reducción intracelular de NFX, generando el radical libre nitro, seguida por el ciclo redox y la producción de O_2 y H_2O_2 , sería el principal mecanismo de acción de NFX contra *T. cruzi*¹⁷.

El efecto tripanocida del BNZ no depende de los radicales oxigenados, a diferencia de lo que ocurre con NFX¹⁷. La generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 a concentraciones de inhibición del crecimiento del epimastigote no se ha observado. Es probable que los metabolitos reducidos de BNZ estén involucrados en los efectos tripanocidas por la unión covalente con macromoléculas (Figura 2.3).^{9,16}

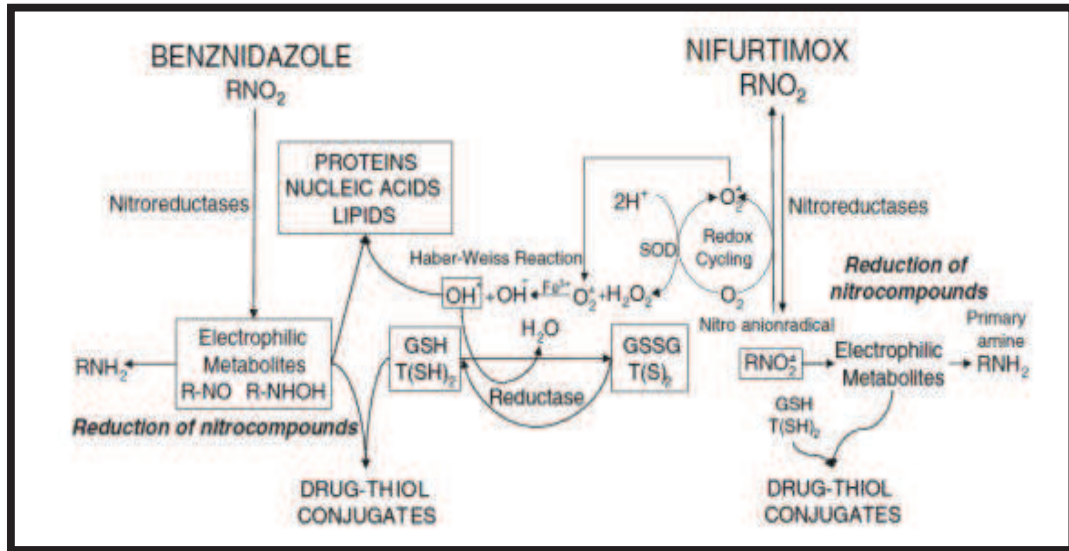


Figura 2.3 Efecto tripanocida de BNZ por unión a macromoléculas²

En el parásito:

Generalmente, los compuestos nitroheterocíclicos funcionan como prodrogas y la mayoría sufre una activación para mediar sus efectos citotóxicos. El paso clave en este proceso es la reducción del grupo nitro, el cual está unido al anillo aromático. Dos clases de enzimas, nitroreductasas tipo I y tipo II, pueden catalizar esta reacción. Las nitroreductasas tipo I son proteínas FMN / NAD(P) H-dependientes, restringidas en gran parte a procariotas. Median la transferencia de dos electrones a un grupo nitro orgánico, formando un intermediario nitroso, y promueven a una segunda reducción de dos electrones para generar hidroxilamina. Este derivado puede interactuar directamente con macromoléculas biológicas, llevando al daño celular, o experimentar un proceso posterior para generar agentes citotóxicos. En contraste, las nitroreductasas tipo II, capaces de encontrarse en otros organismos, no sólo procariotas, median la reducción de un electrón del grupo nitro, produciendo un radical nitroanión. En presencia de oxígeno, esta molécula es reoxidada volviendo al compuesto original con la producción de concomitantes de aniones superóxidos.

La mayoría de las prodrogas nitroheterocíclicas puede sufrir activación por ambas nitroreductasas tipo I y II, llevando a la confusión en cuanto a cómo ciertos compuestos median su acción citotóxica. En el caso de BNZ, han sido propuestos dos mecanismos que acontecen para lograr su actividad tripanocida. El primero, involucra nitroreductasas de tipo II generando estrés oxidativo en el parásito a través de la formación del anión superóxido. Evidencias indirectas para esta vía, demuestran que cualquier perturbación de esta enzima conduce a un desbalance del metabolismo del anión superóxido que es tóxico para el parásito.

La adición de BNZ a extractos de *T. cruzi* no parece apuntar a la producción de niveles significativos de especies reactivas de oxígeno, sugiriendo que un mecanismo alternativo puede ser responsable de la actividad tripanocida de esta prodroga. Una nitroreductasa designada NTR, juega un rol importante en el metabolismo de la droga nitroheterocíclica tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei*, como células con niveles reducidos de nitroreductasas tipo I exhiben resistencia a varios agentes nitroheterocíclicos, incluyendo BNZ, mientras que la sobreexpresión confiere hipersensibilidad²².

El metabolismo de los compuestos nitroheterocíclicos por las nitroreductasas tipo I puede guiar a la formación de varios productos finales. Análisis de fragmentos indican picos que corresponden a isómeros cis/trans del 4,5-dihidro-4,5-dihidroimidazol derivado, reportado previamente por ser el producto de la reducción electroquímica del BNZ. Estos isómeros están formados como resultado de la reducción de 4 electrones del BNZ a hidroxilamina por la vía de un intermediario nitroso que, bajo condiciones normales, experimenta una reacomodación a través de un ion nitrenium para formar un hidroxil derivado (Figura 2.4). El hidroxil derivado puede entonces aceptar agua para producir el dihidro-dihidroxi más estable como producto final. Ha sido demostrado que esta vía ocurre durante la reducción anaeróbica de 2-nitroimidazoles en sistemas mamíferos.²²

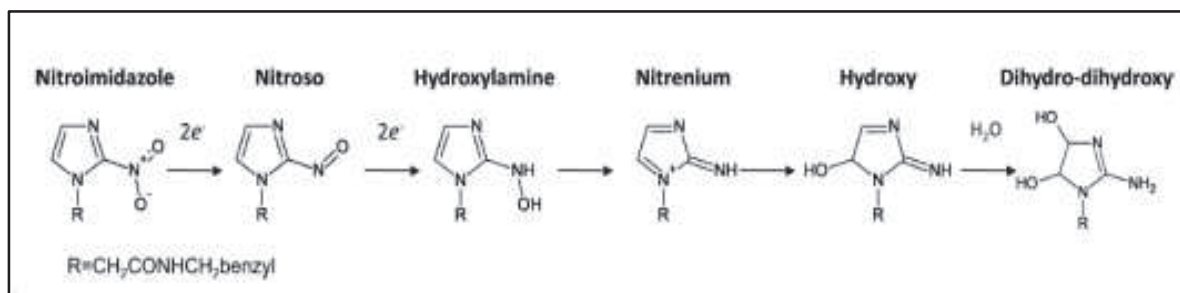


Figura 2.4 Vía de reducción del BNZ a través de un intermediario nitroso

Estos descubrimientos, en conjunto con aquellos que examinan la susceptibilidad de parásitos diseñados o seleccionados para expresar niveles alterados de la nitroreductasa tipo I²³ demuestran que la toxicidad selectiva de BNZ puede ser atribuida a la expresión de esta enzima por los tripanosomas, e indica que esta prodroga media gran parte de su actividad antiparasitaria a través de la producción de metabolitos citotóxicos.

El metabolismo del BNZ por las nitroreductasas tripanosomales tipo I procede vía una serie de intermediarios de vida corta para producir 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol; este, lentamente se disocia para liberar glioxal. Este patrón de reducción es idéntico al reportado previamente después de la reducción electroquímica del BNZ bajo condiciones neutrales, y análogo al que se observó durante la reducción anaerobia mediada por la citocromo P450 reductasa de 2-nitroimidazole misonidazol²⁴. A través de esta vía se producen algunas fracciones potencialmente citotóxicas y mutagénicas. Por causa de su naturaleza transitoria, Hall y Wilkinson no pudieron analizar los efectos de este intermediario, pero por analogía con derivados equivalentes obtenidos desde otros nitroimidazoles, consideraron que la forma de hidroxilamina del BNZ, podría reaccionar con ácidos nucleicos y proteínas, mientras el ion nitrenium podría conjugarse con tioles libres²². Igualmente, muchas de las propiedades potencialmente tripanocidas podría ser atribuido al glioxal, el producto final de la reducción de BNZ mediada por TbNTR. Este dialdehído altamente reactivo puede promover múltiples efectos deletéreos en células por reaccionar con aminoácidos de cadena lateral, llevando a la inhibición enzimática, entrecruzamiento de proteínas, degradación de proteínas alterada, y puede formar aductos con ácidos nucleicos, promoviendo entrecruzamiento del ADN y mutación²⁵

En mamíferos:

Se analizaron muestras de plasma obtenidas de pacientes pediátricos bajo tratamiento con BNZ, utilizando HPLC/MS/MS. Las dos especies detectadas, en las tres muestras estudiadas, pueden ser asociadas indudablemente a moléculas de BNZ y a N-bencilacetamida (BAA), siendo la segunda un fragmento de la droga inicial²⁷.

De los resultados obtenidos, dos hipótesis pueden ser formuladas: la primera de ellas consiste en relacionar la presencia de N-bencilacetamida con el metabolismo hepático de BNZ; la segunda hipótesis tiene que ver con la posible actividad antitripanosomal de estos metabolitos, así como su rol en el desarrollo de efectos secundarios, frecuentemente asociados con la droga patrón.

Estos resultados, junto con la mayoría de la información disponible, indican que es altamente probable que BAA derive de una serie de reacciones metabólicas desde BNZ, y que sea un producto metabólico estable.

La vía para esta transformación debería comenzar con una reducción completa del grupo nitro, similar a la descrita para las nitroreductasas de tipo I. Este hipotético producto proporciona grupos funcionales para una rápida oxidación enzimática y el consecuente clivaje, produciendo compuestos intermediarios. Finalmente, siguiendo la oxidación de la estructura molecular, el anillo de imidazol se rompe. El grupo bencilo, con un núcleo aromático muy estable, sería la estructura más inerte en este proceso.

Hipotéticamente, el proceso finaliza en la formación de BAA, el cual, debería formarse en el hepatocito a través de una secuencia no específica de reacciones, probablemente con la intervención de P450 y/o nitroreductasas.²⁷

La hipótesis actual intenta explicar la toxicidad de los nitrocompuestos sobre parásitos (actividad anti.tripanosomal) y mamíferos (*advers drugs reactions*, ADRs), la cual requiere reducción enzimática del grupo nitro con generación de intermediarios reactivos. Por otra parte los compuestos nitroheterocíclicos generalmente actúan como prodrogas y deben sufrir activación para mediar sus efectos citotóxicos²⁸.

¿Por qué la electroquímica?

Las distintas hipótesis planteadas respecto al comportamiento de los nitrocompuestos, tanto de su actividad tripanocida como de los efectos adversos producidos en pacientes tratados con fármacos derivados de dichos compuestos, se asemejan en la premisa de que éstos actúan debido a una reducción electroquímica en su estructura molecular. En algunos de los trabajos citados, se observa la reducción del grupo nitro del compuesto hasta la obtención de la hidroxilamina¹⁴ a través de diferentes intermediarios reactivos, mientras que otros trabajos postulan al glioxal como producto final²⁶ sin descartar la formación de la hidroxilamina y su unión con ácidos nucleicos y proteínas. Se mencionan distintos intermediarios de estas vías metabólicas que se obtienen por la transferencia de uno o más electrones y probablemente por la presencia o ausencia de O₂.

Además de su uso en enfermedades bacterianas y parasíticas, los nitroimidazoles se han utilizado en la quimioterapia del cáncer, como agentes citotóxico y radiosensibilizadores. Estas dos aplicaciones, además de la toxicidad aeróbica crónica que pueden producir, están relacionadas con la afinidad electrónica que poseen, sugiriendo además que los procesos redox están involucrados en cada uno de estos fenómenos.¹⁴

Así, se observa la importancia de los procesos redox en la activación de los nitrocompuestos para ejercer su acción tóxica. Por este motivo, en el presente trabajo se utilizan técnicas electroquímicas para el estudio de los procesos de reducción del BNZ. Las reacciones electroquímicas producen transferencias de cargas, los productos de estas transferencias de cargas suelen experimentar reacciones posteriores. Las técnicas electroquímicas dinámicas generan estos intermediarios, y pueden detectar y analizar sus reacciones posteriores, lo que resulta útil para determinar mecanismos de reacción.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo del presente trabajo fue realizar un aporte al conocimiento que se tiene del comportamiento de los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Si bien, son fármacos que surgieron hace más de cuarenta años, la información registrada en cuanto a su forma de actuar en el organismo humano es escasa. Por esta razón, se buscó la posibilidad de conocer *in vitro* características principales de la forma de reacción de uno de los medicamentos usados, BNZ, para que sean comparadas con los resultados obtenidos de otro grupo de trabajo, dentro del mismo proyecto de investigación.

Objetivos específicos

Caracterizar el comportamiento electroquímico del BNZ en distintos solventes no acuosos, mediante el uso de voltamperometría cíclica.

Buscar intermediarios de reducción del compuesto, debido a que, de acuerdo a la bibliografía, es la forma de actuar en sistemas biológicos.

Analizar cuál es el comportamiento en cuanto a la óxido-reducción *in-vitro*, para estudiarlo en medios no biológicos, y relacionarlos con éstos.

Capítulo 3: Métodos Electroquímicos

Generalidades

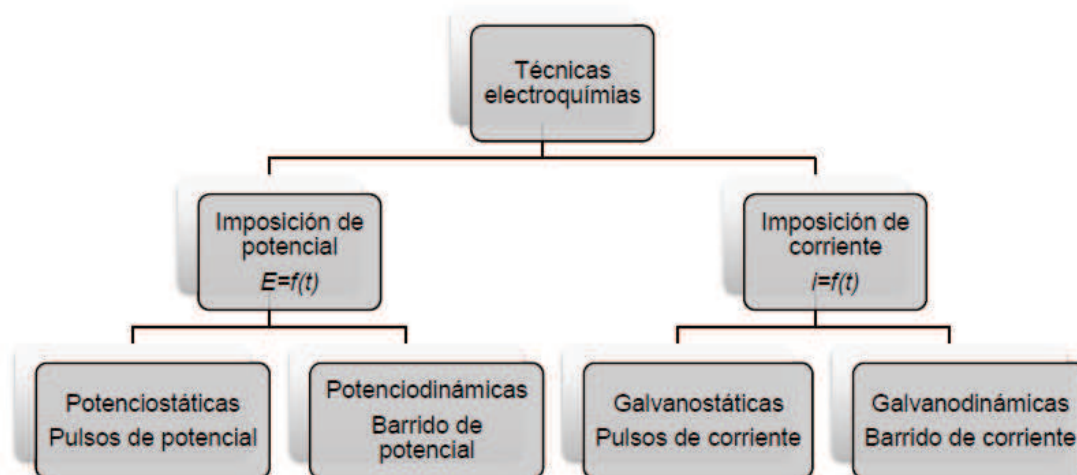
La *electroquímica* es la disciplina química que trata el estudio de los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de la interfase formada entre dos fases, generalmente un electrodo y una disolución en contacto con él.

La *electroquímica analítica* puede definirse como el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor – disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa, con el objetivo de resolver un problema de tipo químico.

Los procesos de reacción son el conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación del tipo eléctrico. De todos los procesos de reacción, el principal es la reacción electroquímica y la magnitud de su respuesta dependerá de los demás eventos que la acompañen. Éstos transcurren durante la imposición de la perturbación y dependen del tiempo y la manera en que ésta se mantiene. Al cesar la perturbación se alcanza un nuevo estado de equilibrio.

De acuerdo al tipo de perturbación que se imponga será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtendrá para caracterizar a las moléculas, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación. Si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor – disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo en la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema²⁹ como muestra el diagrama 3.1.

Diagrama 3.1 Técnicas electroquímicas



El interés en la electroquímica de las sustancias orgánicas ha crecido continuamente en las últimas décadas. Sus técnicas se aplican al análisis y síntesis de compuestos orgánicos, a la dilucidación o confirmación de estructuras, al estudio de intermediarios y a la obtención de información mecanística de las posibles reacciones químicas homogéneas que anteceden o suceden a la(s) transferencia(s) de carga. Son importantes también sus posibilidades en la investigación de la naturaleza de la actividad catalítica, en el estudio de las relaciones entre estructura y electroactividad, en electropolimerizaciones y en el estudio de sistemas redox biológicos.

Las síntesis por vía electroquímica frecuentemente tienen buenos rendimientos y se llevan a cabo a temperatura más baja que los procesos térmicos comparables. Cuentan además con la ventaja de usar equipos simples, relativamente poco costosos y de fácil control automático. Los procesos electroquímicos suelen tener una mayor selectividad que los que usan compuestos químicos como agentes oxidantes o reductores debido a la existencia de un parámetro adicional tal como el potencial de electrodo.

Puesto que los productos de reacción son generados en o cerca de la interfase, muchas técnicas electroquímicas dinámicas pueden, no sólo generar los intermediarios, sino

también detectar y analizar las reacciones homogéneas o electroquímicas posteriores de estos resultando de gran utilidad en el análisis de mecanismos de reacción.

Finalmente puede decirse que los procesos electrosintéticos son ambientalmente benignos pues disminuye la posibilidad de formación de subproductos y productos secundarios; además, la posibilidad de trabajar principalmente a temperatura ambiente, favorece la selectividad de ciertas reacciones solo por modificación del potencial aplicado. Por otro lado, hay muchas reacciones que sólo pueden llevarse a cabo electroquímicamente, por ejemplo, reacciones que involucran el acoplamiento de dos electrófilos o dos nucleófilos, que químicamente serían imposibles o muy dificultosos pues involucrarían muchas etapas.

La electroquímica se ha convertido en una poderosa herramienta de síntesis, aunque su implantación industrial avanza lentamente. La incorporación de la electrosíntesis orgánica a las líneas de producción de la industria química permite nuevas oportunidades de enfrentarse a los desafíos tecnológicos que el mundo industrial impone en busca de sistemas eficientes, pero sustentables. Existe un número relativamente importante de reacciones electrosintéticas de moléculas orgánicas. El costo de estos procesos es similar al de los procesos térmicos usados comúnmente, pero en general con menor daño ambiental. La electrosíntesis es un aspecto sumamente importante de la electroquímica, poco desarrollado en nuestro país y en franco crecimiento en el mundo debido a la creciente preocupación por aspectos ecológicos de las actividades de producción de sustancias químicas.

Estudio de las reacciones electroquímicas. Voltamperometría

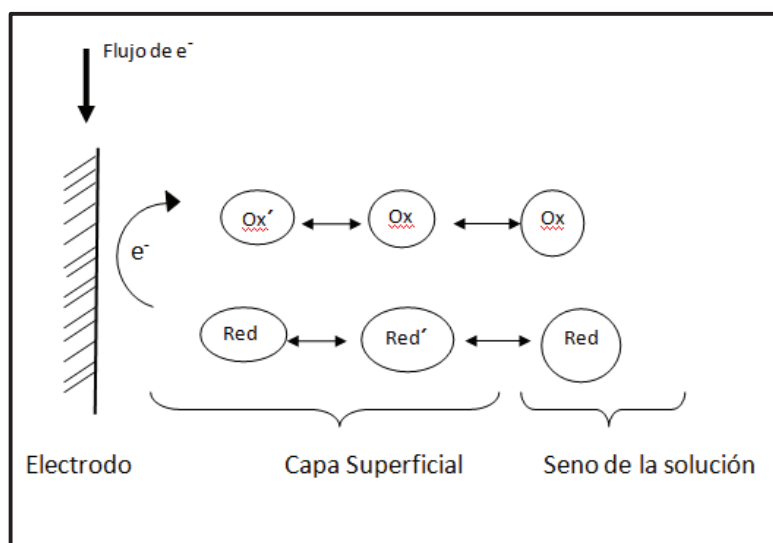
Una reacción electroquímica se puede definir como una reacción redox en la que el intercambio de electrones tiene lugar en un electrodo.



El cambio químico es producido por el intercambio de electrones realizado entre un electrodo y un aceptor o donador de electrones en una disolución. Se diferencia de

una reacción química redox en que el donador o receptor de electrones, es el electrodo (al que se comunica un potencial eléctrico) donde se realiza la transferencia electródica, cambiando de un medio homogéneo (reacción química) a un medio heterogéneo (reacción electroquímica).

Esquema 3.1. Esquema de una reacción electródica con formación de productos intermedios (Ox', Red').



La voltamperometría es un método electroanalítico en el que la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones de polarización total de concentración³⁰.

En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la transformación de una o más especies electroactivas, el cual comprende la reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa como etapas principales.

El proceso electroquímico puede estar controlado por el transporte de masa (es decir por la rapidez con que se le suministra materia al electrodo) o por la velocidad de transferencia de carga. Por ello, comúnmente se habla de procesos controlados por transporte (de masa) o por cinética (de transferencia de carga).

Polarización:

Cuando se limita la velocidad a la cual tiene lugar el proceso global ($Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$) de una hemirreacción, y por lo tanto la magnitud de la intensidad de corriente tiende a disminuir o mantenerse constante. Este proceso puede deberse a varias causas:

- ❖ Polarización por concentración: cuando la etapa de transferencia de masa (que implica el movimiento de la forma Ox desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo, o de la forma reducida desde el electrodo hasta el seno de la solución) limita la velocidad de la reacción global, y por lo tanto la corriente.
- ❖ Reacción de polarización: Algunas reacciones de semi-celda provienen de una reacción química intermedia en las que se forman especies como Ox' o Red'; este producto intermedio es ahora el participante en el proceso de transferencia de masa. Si la velocidad de formación o de descomposición de estos productos intermedios limita la intensidad de corriente, se habla de polarización (ver esquema 3.1).
- ❖ Polarización por adsorción, desorción o cristalización: cuando la velocidad de estos procesos físicos limita la intensidad de corriente.
- ❖ Polarización por transferencia de carga: la limitación de la corriente surge de la lenta velocidad de transferencia de electrones (e^-) desde el electrodo a las especies oxidadas en la capa superficial, o desde las especies reducidas al electrodo.

A su vez, el transporte de masa se puede llevar a cabo por los siguientes mecanismos:

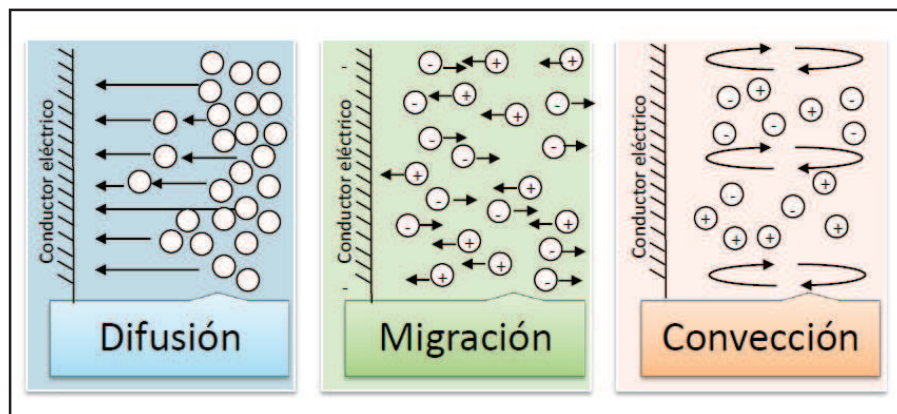
Difusión: cuando se establece una diferencia de concentración, los iones o moléculas se mueven desde la región de mayor concentración a la de menor concentración.

Migración: cuando los iones se mueven bajo la influencia de un campo electrostático. Las atracciones o repulsiones electrostáticas entre una especie iónica concreta y el electrodo se hacen menores si la concentración total de electrolito en la disolución es mayor; y puede

aproximarse a cero cuando la especie reactiva es una pequeña fracción (1/100) de la concentración total de iones con una carga dada.

Convección: el transporte de materia se realiza por movimientos forzados por medios mecánicos, ej. agitación. También existe convección natural por diferencia de temperatura o de densidad.

*Esquema 3.2. Formas de Transporte de masa*²⁹



La polarización por concentración se observa cuando la migración, la difusión y la convección son insuficientes para transportar el reactivo a o desde la superficie del electrodo a la velocidad exigida por la intensidad de corriente teórica. Esta polarización está influida por:

- Concentración del reactivo: ↑ polarización a ↓ [reactivo]
- Concentración total de electrolito: ↑ polarización a ↑ [electrolito]
- Agitación mecánica: ↑ polarización a ↓ agitación
- Tamaño del electrodo: ↑ polarización a ↓ superficie del electrodo

En la mayoría de los casos, la electrólisis se efectúa bajo condiciones tales, que la difusión sea el proceso fundamental en el transporte de la especie electroactiva; la migración y la convección se minimizan por la adición de un exceso de electrolito soporte y evitando el movimiento de agitación y gradientes de temperatura.

Voltamperometría Cíclica:

Una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción es la voltamperometría cíclica, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos.

La señal es de tipo triangular (único o repetitivo). El potencial varía entre dos valores preestablecidos. Aumenta linealmente desde un valor inicial (E_i) hasta un máximo y después disminuye linealmente hasta el potencial final (ver figura 3.1a). La variación del potencial con el tiempo se denomina velocidad de barrido (v). Puede utilizarse en diferentes tipos de electrodos.

$$E = E_i \pm vt$$

Los potenciales a los que tiene lugar la inversión del barrido de potencial se llaman potenciales de cambio o de inversión.

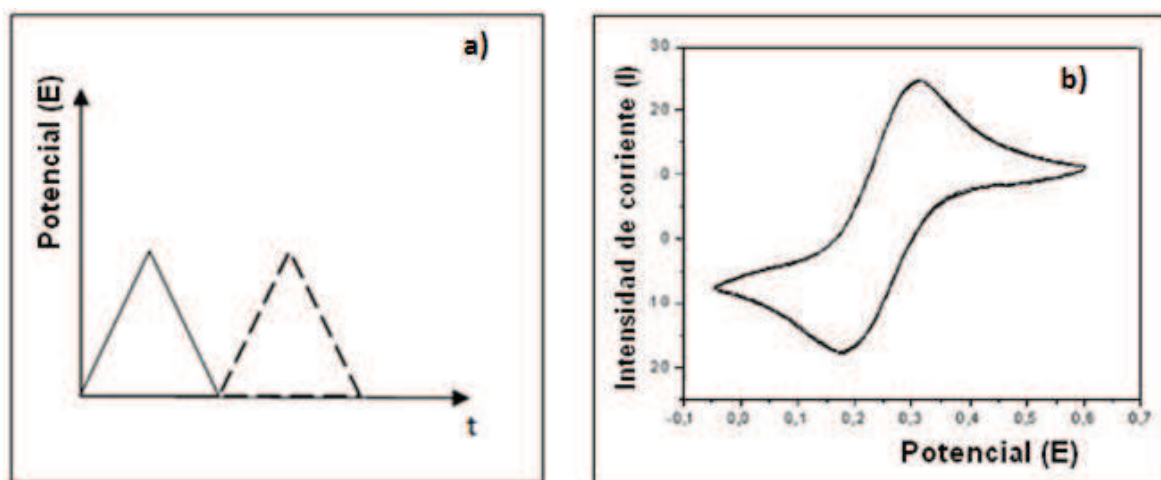


Figura 3.1 Señal tipo triangular. a) Perturbación. b) Respuesta del sistema.

Las respuestas corriente-potencial obtenidas de esta manera se denominan voltamperogramas (Figura 3.1b). En ellos se pueden observar picos de corriente o potencial cuyo análisis permite adquirir información sobre distintos aspectos de los procesos involucrados. La voltamperometría de procesos controlados por difusión es esencialmente una polarografía. La diferencia en las respuestas puede verificarse a través de la variación de la velocidad de barrido.

El potencial aplicado puede ser fijo o variable. En este último caso es posible aplicar ondas de diversas formas: triangulares, cuadradas o sinusoidales. Los voltamperogramas obtenidos en una experiencia particular son registrados mecánicamente (registrador de papel) o almacenados digitalmente.

La voltamperometría cíclica consiste en aplicar al electrodo de trabajo, de la celda arriba descrita, un potencial (relativo al electrodo de referencia) que se desarrolle desde un potencial inicial E_i hacia un potencial E_λ durante un tiempo $t = \lambda$ y luego se invierta la dirección de barrido hasta volver al potencial inicial, conservando una velocidad de barrido (v) constante. El potencial en cada instante de tiempo será (suponiendo que la dirección de barrido es hacia potenciales decrecientes):

$$\text{para } 0 \leq t \leq \lambda \quad E = E_i - \nu t$$

$$\text{para } \lambda \leq t \leq 2\lambda \quad E = E_i - 2\nu\lambda + \nu t$$

Pueden cambiarse el sentido inicial del barrido de potencial y la amplitud de éste, así como también la velocidad de barrido de todo el ciclo o de alguna de sus partes por separado usando los controles del generador de barrido.

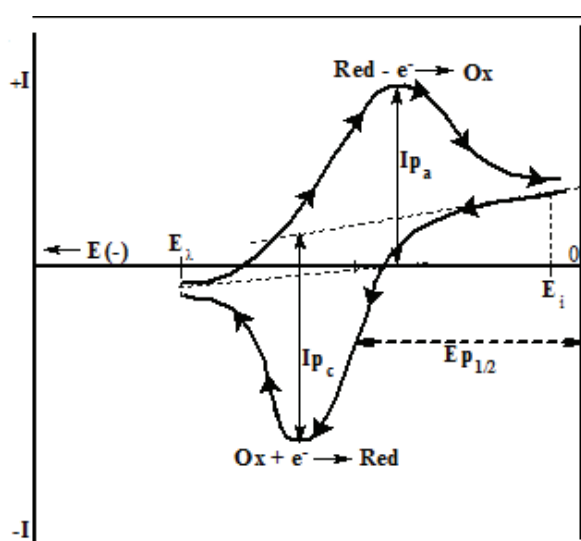
Los voltamperogramas (Figura 3.2) tienen ciertas características cualitativas típicas que se describen a continuación para una celda conteniendo una solución de una sustancia (Ox) que puede electroreducirse según $\text{Ox} + e \rightleftharpoons \text{Red}$

Mientras al cambiar el potencial del electrodo no se alcance el valor adecuado para transferir, por ejemplo, un electrón desde el electrodo al sustrato **Ox** en solución, el continuo cambio de potencial causará una corriente (generalmente pequeña, llamada corriente no faradaica) de carga del capacitor variable constituido por la interfase entre el electrodo y la solución. Cuando el potencial sea suficiente, comenzará a manifestarse la corriente (llamada corriente faradaica) debida a la electroreducción del sustrato. La concentración de **Ox** disminuirá en la interfase mientras que la de **Red** aumentará. Como la difusión es la única forma de transporte de materia que el diseño del experimento permite (dado que se trabaja con soluciones no agitadas, se emplean tiempos cortos y altas concentraciones de electrolito soporte), la velocidad de difusión de **Ox** hacia el electrodo aumentará y junto con ella la corriente de reducción. Sin embargo el aumento de gradiente de concentración tiene un límite ya que al mismo tiempo el potencial del electrodo se hace cada vez más negativo y la velocidad de reducción aumenta. En esas condiciones se alcanza un punto en el cual la concentración de **Ox** sobre el electrodo es cero y el gradiente se extiende hacia el seno de la solución disminuyendo su valor así como el del flujo de **Ox** hacia el electrodo y el valor de la corriente de reducción. De esta manera, la corriente de reducción alcanza entonces un valor máximo (pico catódico) y luego disminuye (ver figura 3.2).

Cuando se han alcanzado potenciales más negativos que los del pico catódico queda adyacente al electrodo una solución diferente de la existente en el seno de la solución.

En la cercanía del electrodo la concentración de **Red** es igual a la original de **Ox**. Si ahora se invierte el sentido de barrido de potencial se repetirá lo arriba descrito en sentido inverso y se observará un pico anódico correspondiente a la electrooxidación de **Red** a **Ox**. Surgen así los parámetros característicos de los voltamperogramas: corrientes de pico catódica (I_{pc}) y anódica (I_{pa}) con sus correspondientes potenciales E_{pc} y E_{pa} .

Figura 3.2 Esquema de un voltamperograma típico



Reacciones Reversibles

Un proceso de transferencia de electrones se comportará en forma reversible si la velocidad de éste es suficientemente alta como para que se mantengan las concentraciones de equilibrio de las especies electroactivas en la superficie del electrodo mientras el potencial va cambiando durante el barrido. Se cumplirá en este caso la ecuación de Nernst. La resolución de las ecuaciones que gobiernan estos procesos lleva a relaciones útiles que sirven para establecer algún tipo de diagnóstico acerca de los mecanismos involucrados³⁴.

La ecuación 3.1 relaciona la corriente de pico, i_p , con parámetros experimentales para procesos reversibles, a 25°C

$$i_p = 2.687 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_0^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot C_0 \quad \text{ecuación 3.1}$$

donde n es el número de electrones puestos en juego en el proceso, A es el área del electrodo (cm^2), ν es la velocidad de barrido de potencial ($\text{V} \cdot \text{seg}^{-1}$), D_0 es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en un medio dado ($\text{cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$), y C_0 su concentración ($\text{moles} \cdot \text{cm}^{-3}$). La corriente de pico se expresa en Amperes.

Si se considera el mismo ejemplo anterior: $\text{Ox} + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Red}$ y se supone que se comienza un barrido de potencial en el sentido decreciente de potencial en una solución que contiene sólo la sustancia Ox, el pico será el correspondiente a la electroreducción $\text{Ox} + \text{e}^- \longrightarrow \text{Red}$. Para un electrodo de trabajo dado ($A = \text{constante}$) y una combinación sustrato - solvente constante ($D_0 = \text{constante}$), $i_p \cdot \nu^{-1/2} \cdot C_0^{-1}$ es una constante (denominada generalmente función corriente).

El potencial de pico, E_p , es independiente de la velocidad de barrido y está relacionado con el potencial reversible de la cupla redox por la ecuación (a 25,0 °C):

$$E_p = E^0 - 0,0285/n \quad \text{ecuación 3.2}$$

Al invertir el barrido, se observa el pico correspondiente a la reacción inversa $\text{Red} \longrightarrow \text{Ox} + \text{e}^-$. La separación entre los picos catódico y anódico (ΔE_p) para un proceso reversible es de $0,059/n$ V a 25,0 °C y la intensidad de corriente del pico anódico es igual a la del pico catódico (ver figura 3.2)

Reacciones Irreversibles

Si la velocidad de la transferencia electrónica es suficientemente lenta comparada con la velocidad de barrido de potencial, de modo que las concentraciones en la interfase del electrodo de las especies electroactivas no pueden alcanzar los valores dados por la ecuación de Nernst, el proceso es irreversible. Se obtienen las siguientes expresiones para la corriente y el potencial de pico:

$$i_p = 3.01 \times 10^5 \cdot n \cdot (\alpha \cdot n_\alpha)^{1/2} \cdot A \cdot D_o^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot C_o \quad \text{ecuación 3.3}$$

$$E_p = E^o - \frac{R \cdot T}{\alpha \cdot n_\alpha \cdot F} \left[0.780 + 0.5 \ln \frac{\alpha \cdot n_\alpha \cdot D \cdot F \cdot \nu}{R \cdot T} - \ln k_0^o \right] \quad \text{ecuación 3.4}$$

donde n_α es el número de electrones intercambiados hasta el paso determinante de la velocidad inclusive, α es el coeficiente de transferencia de carga y k_0^o , la constante de velocidad específica de la transferencia electrónica en el potencial de electrodo estándar E^o . Se observa que $i_p \cdot \nu^{-1/2} \cdot C_o^{-1}$ es también una constante en las mismas condiciones arriba indicadas.

Si el proceso es completamente irreversible la reacción inversa no ocurre y no hay pico de corriente ni, en realidad, corriente faradaica alguna en el barrido inverso.

La separación entre procesos reversibles e irreversibles depende de las condiciones experimentales (por ejemplo de la relación entre la velocidad de barrido y la velocidad de la transferencia de carga). Los casos de transición se denominan cuasi-reversibles. En ellos ΔE_p aumenta con ν , y la forma, posición y relación de intensidades de los picos depende de α , k_0^o y ν .

Aunque se pueden obtener datos cuantitativos con la voltamperometría cíclica, uno de los motivos de su amplia difusión y empleo es la posibilidad de visualizar rápidamente los aspectos cualitativos generales de los procesos de electrodo y de las reacciones

homogéneas asociadas a ellos. La conducta de un sistema puede observarse sobre un amplio dominio de potencial en un único voltamperograma; muchos intermediarios pueden detectarse directamente y a veces es posible identificarlos por los valores de potencial a los cuales se reducen u oxidan. También se acostumbra obtener voltamperogramas en un amplio rango de velocidades de barrido e intervalos de potencial. Comúnmente, en los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos y por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial podemos observar como estos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primero y los barridos subsecuentes se determina cómo los procesos representados por los picos están relacionados, al mismo tiempo que de la dependencia de la velocidad de barrido y amplitud del pico explica el papel de la adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro del proceso en estudio³¹.

Capítulo 4: Materiales y Métodos

Reactivos utilizados:

La preparación de las soluciones y los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo dentro de una caja de guantes bajo atmósfera de nitrógeno seco. Los solventes y demás reactivos fueron de grado analítico y se purificaron por métodos estándar¹⁵.

Los solventes empleados fueron Dimetilformamida (DMF), Dimetilsulfóxido (DMSO) y Etanol (EtOH). Se secaron con tamices moleculares tipo 4A activados y almacenados en la caja de guantes.

Los electrolitos soporte utilizados fueron perclorato de sodio (NaClO_4), perclorato de tetraetil amonio (TEAP) y perclorato de litio (LiClO_4). Fueron secados al vacío a 150°C durante varias horas.

La droga utilizada como muestra fue BNZ (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida). Obtenida del laboratorio Hoffman la Roche, Alemania.

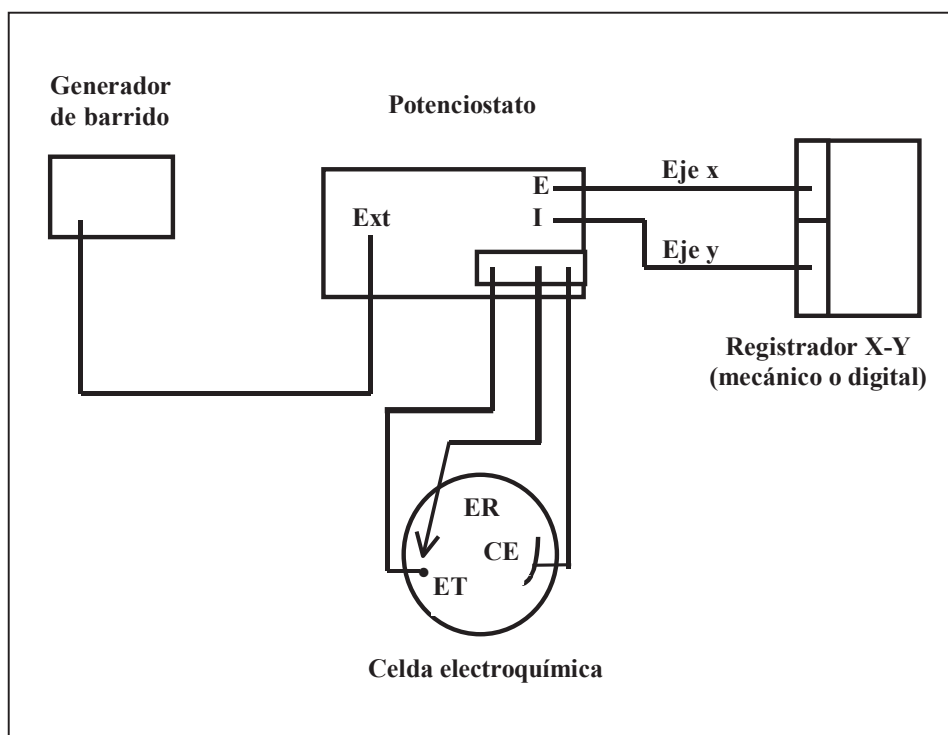
Instrumental utilizado:

Los experimentos de voltamperometría cíclica (VC) se realizaron en una celda de vidrio convencional no dividida con entrada y salida de nitrógeno seco (ver figura 4.1). El electrodo de trabajo (ET) fue un disco de carbón vítreo de diámetro 3 mm encapsulado en teflón y el contraelectrodo (CE) fue una chapa de Pt 2 cm^2 . Un electrodo de Ag^+ (0.1 M, ACN) /Ag se empleó como electrodo de referencia (al cual están referidos todos los potenciales informados). Antes de cada medición electroquímica el ET fue pulido con alúmina

de hasta 1 μm y luego colocado en un baño ultrasónico con agua. El secado final se realizó con gas nitrógeno seco.

La disposición de un equipo estándar para la aplicación de esta técnica electroquímica se muestra en el esquema 4.1. Para medir las características de corriente-potencial correspondientes a un solo electrodo (**ET**), se coloca en la celda un tercer electrodo (electrodo de referencia, **ER**) ubicado cerca del primero. El electrodo restante cuyas características se desea que no influyan en la medida se denomina contraelectrodo (**CE**).

Esquema 4.1 Esquema de un dispositivo estándar para la realización de experiencias de Voltamperometría Cíclica



La celda se conecta a un potencióstato el cual aplica un potencial (fijo o variable) entre el **ET** (o electrodo indicador) y el **ER**. Este potencial se mantiene independientemente de los cambios que pudieran ocurrir en la celda. Para lograr esto, este equipo establece una corriente que circula entre el **ET** y el **CE**. El potencial aplicado, previamente seleccionado en el potencióstato o informado a éste por el generador de barrido, se compara con la diferencia de potencial entre el **ET** y el **ER**. La circulación de la corriente mencionada asegura que ambos potenciales sean iguales.

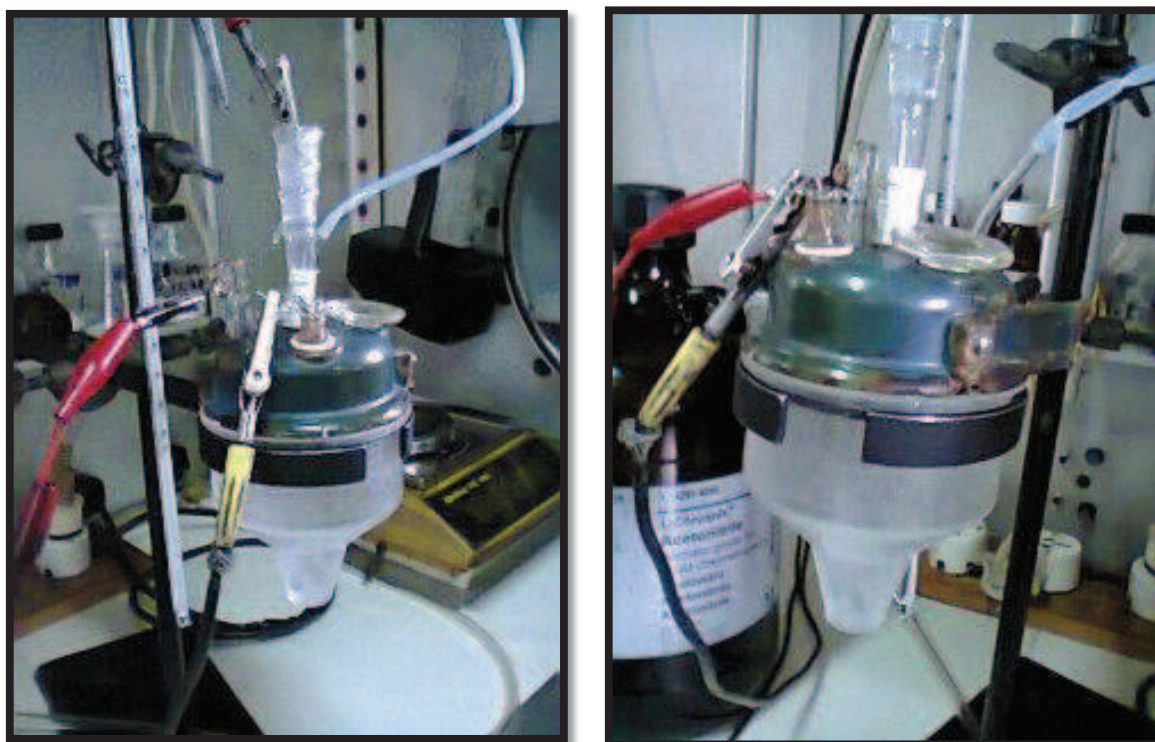


Figura 4.1. Celda electroquímica

Marcas de los equipos.

Caja seca: DRI-Train HE-193-1 Vacuum /Atmosphere Corporation (Figura 4.2).

Potenciostato. LYP M2

Generador de onda triangular LYP

Adquisidor digital WinPCChrom



Figura 4.2. Caja seca. DRI-Train HE-193-1 Vacuum /Atmosphere Corporation

Capítulo 5: Resultados y Discusión

Comportamiento electroquímico de BNZ en solventes no acuosos

Voltamperometría Cíclica:

Como se mencionó anteriormente, una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción, en donde intervienen procesos de óxido reducción, es la voltamperometría cíclica, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos.

El estudio llevado a cabo para el presente trabajo de tesina permitió la caracterización del BNZ en distintos solventes.

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Medio neutro

En DMSO se detectan dos procesos electroquímicos bien diferenciados, el primero a un potencial de 1,3V, el segundo a un potencial que ronda los 1,8V (ver figura 5.1).

El análisis fue enfocado en el primer proceso, debido a que el segundo proceso se da en forma más compleja y escapa a los objetivos del presente trabajo.

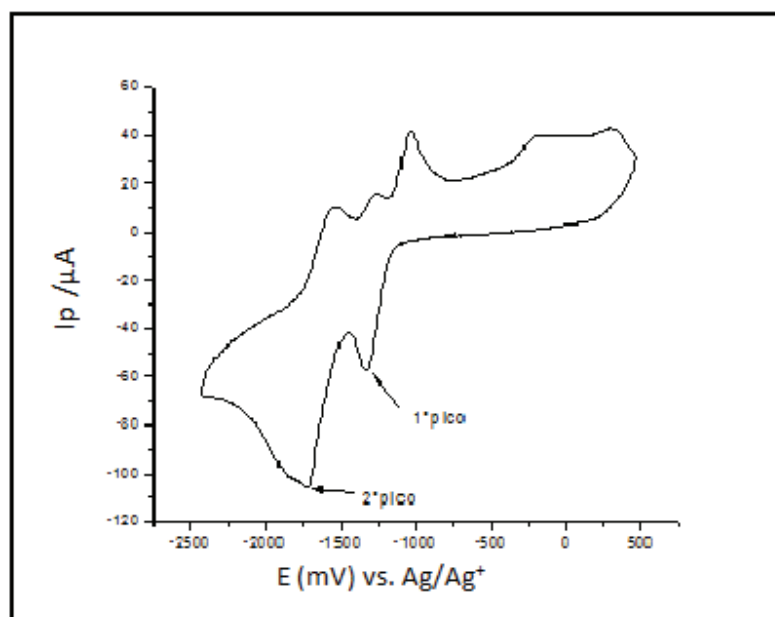
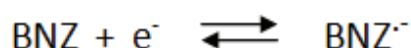


Figura 5.1 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO en medio neutro. Electrolito soporte NaClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg^{-1} .

En el primero de éstos, se observa un proceso de transferencia de electrones (ver esquema 5.1) del tipo cuasi-reversible.

En base a los antecedentes en literatura, mencionados en el capítulo 2 del presente trabajo, acerca de compuestos similares es posible establecer como primer paso de la electroreducción del BNZ la formación del anión radical según la ecuación:

Esquema 5.1 Primer proceso de electroreducción



Este proceso es el que tiene lugar en el máximo de corriente detectado a 1,3V. Las relaciones cinéticas obtenidas a partir de la VC (Figura 5.1) son las que se muestran en las figuras 5.2, 5.3 y 5.4. De éstos gráficos se puede inferir que a velocidades medias y bajas ($0,03$ a $0,3\text{V seg}^{-1}$) el sistema tiene un comportamiento que tiende a ser reversible (es decir el potencial de pico tiende a ser independiente de la velocidad de barrido), pero a velocidades

medias y altas el comportamiento se acerca más al de un sistema cuasi-reversible. Esto sucede porque a bajas velocidades, en el 1° pico, el proceso electroquímico se lleva a cabo a velocidades mayores que la velocidad de barrido, pero a medida que ésta última velocidad aumenta, la reacción electroquímica no alcanza a acomodar sus concentraciones para mantenerse reversible.

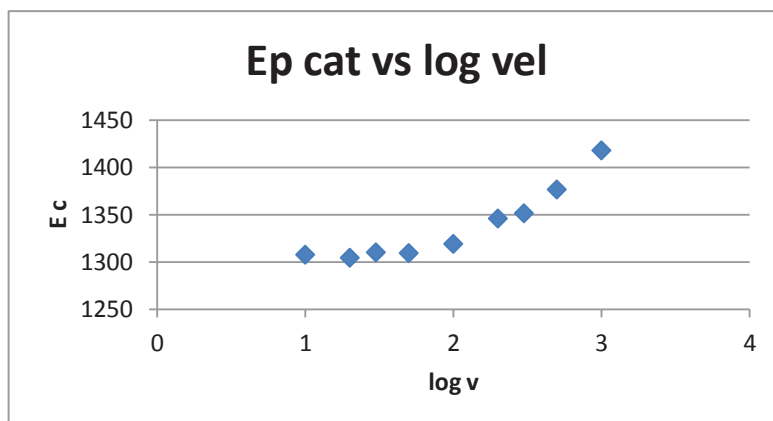


Figura 5.2 Dependencia del potencial del pico catódico (E_c) con la velocidad de barrido de potencial, para BNZ (3,9mM) en DMSO. Medio neutro.

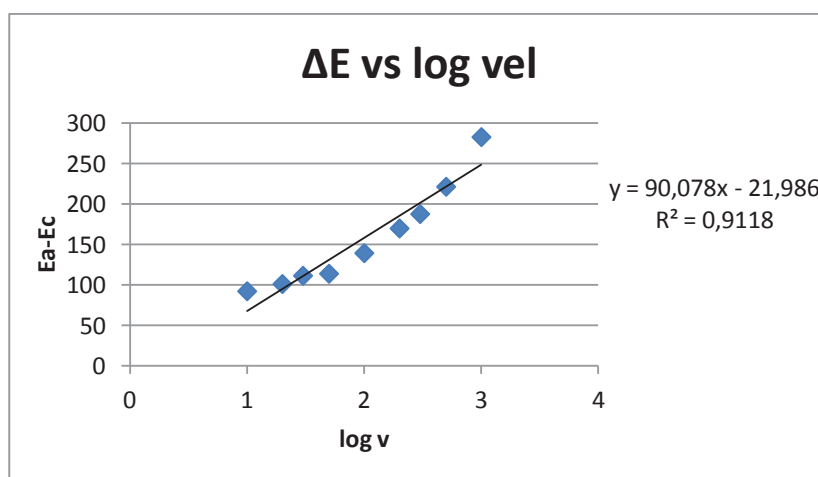


Figura 5.3 Dependencia de la diferencia de potencial (ΔE) entre el potencial del pico anódico (E_a) y el potencial del pico catódico (E_c), con la velocidad de barrido de potencial, para BNZ (3,9mM) en DMSO. Medio neutro.

Para un sistema de comportamiento reversible el gráfico de $I_p = f(v^{1/2})$ presenta el perfil de una línea recta. En el caso en estudio también se observa una gráfica de línea recta (ver figura 5.4), pero la relación I_{pa}/I_{pc} no es igual a la unidad a ninguna velocidad de barrido, lo que no permite calificar al sistema como uno de transferencia electrónica del tipo puramente reversible.

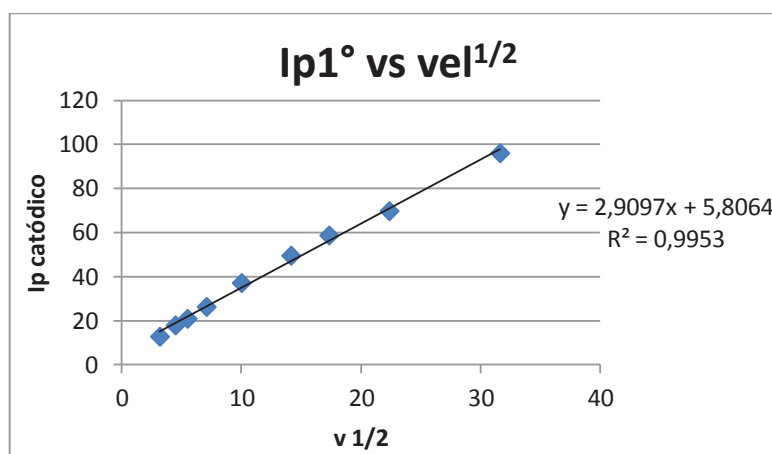


Figura 5.4 Dependencia de la intensidad de la corriente de pico catódico (I_p) con la velocidad de barrido de potencial para BNZ (3,9mM) en DMSO. Medio neutro.

Una utilidad importante de estas relaciones es la obtención del coeficiente de difusión de la especie electro activa en el medio en estudio. Efectivamente a partir de la relación 3.1 y del gráfico de la Figura 5.4 se obtiene el siguiente valor $1,41E^{-6}cm^2 seg^{-1}$.

Con Ácido trifluoroacético (TFA)

En medio ácido la respuesta es sustancialmente diferente. En primer lugar, el proceso se hace irreversible, ya que tanto a velocidades bajas como elevadas no se observan picos en la región anódica (figura 5.5). Esto puede deberse a que los productos de reducción en medio ácido son irreversibles, o a que estos productos de reducción participan luego en una reacción química dando compuestos sin actividad electroquímica en esta zona de potencial. En segundo lugar se observa un pequeño desplazamiento del potencial de pico hacia valores positivos

respecto a lo observado en medio neutro ($E_p = 1,3$ V en medio neutro frente a 1,2V con agregado de TFA 49,1mM). Este corrimiento aumenta con el aumento de la concentración de ácido hasta llegar a un límite. Y finalmente el otro fenómeno que se observa es el aumento de la intensidad de corriente también respecto a medio neutro.

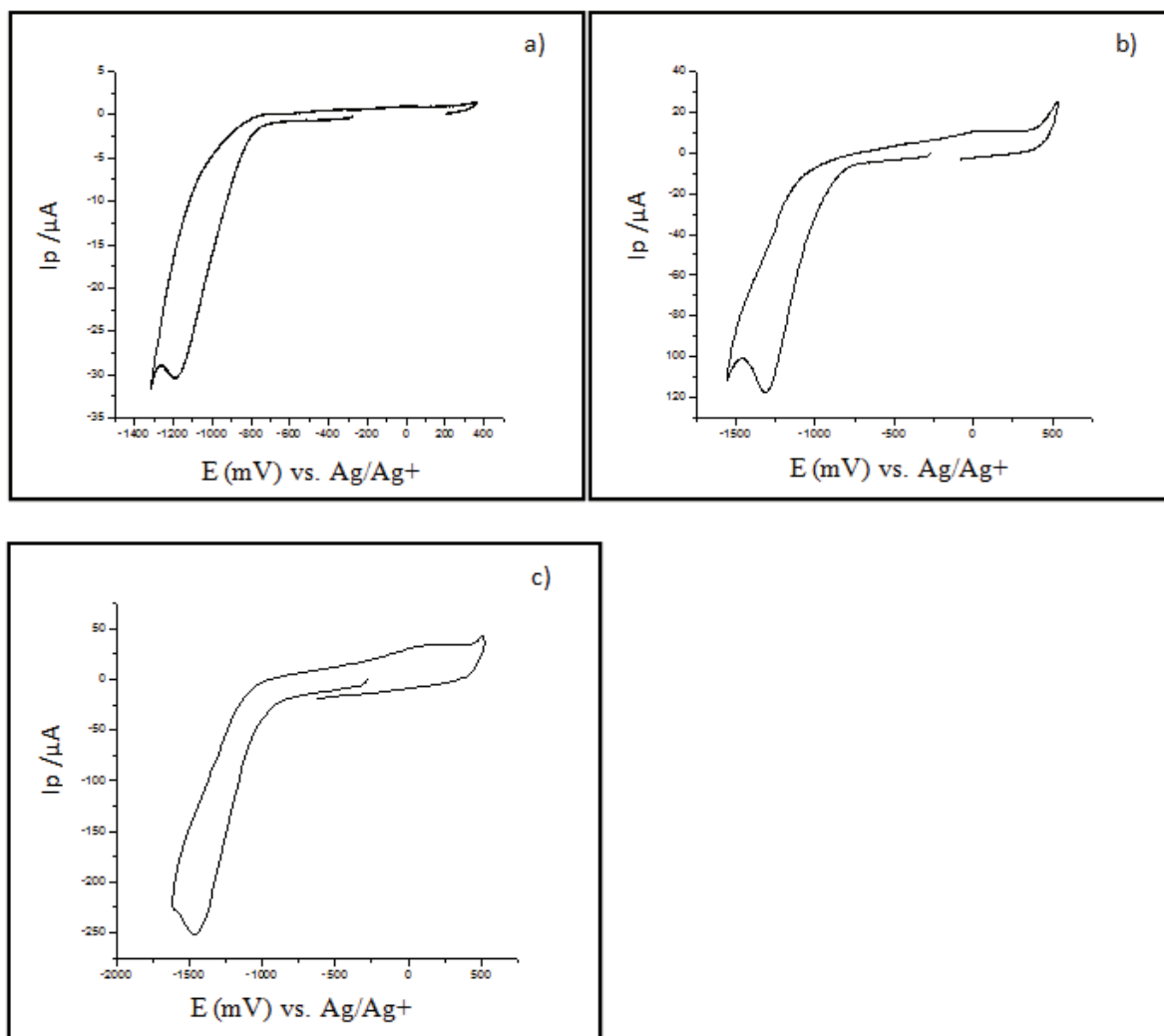


Figura 5.5 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO con TFA (49,1mM) a distintas velocidades de barrido. a) 10 mV seg^{-1} -b) 200 mV seg^{-1} - c) 1000 mV seg^{-1}) Electrolito soporte NaClO_4 0,1M.

La transferencia total de electrones se realiza en un solo proceso, generando un único pico de reducción. Por lo que la I_p será mayor que en medio neutro, debido a que la intensidad de corriente es proporcional al total de electrones intercambiados. Así, se observa que los gráficos $I = f(v^{1/2})$ para cada uno de los medios (ver figura 5.6), tienen pendientes similares, pero en medio ácido se obtiene una intensidad de corriente mayor.

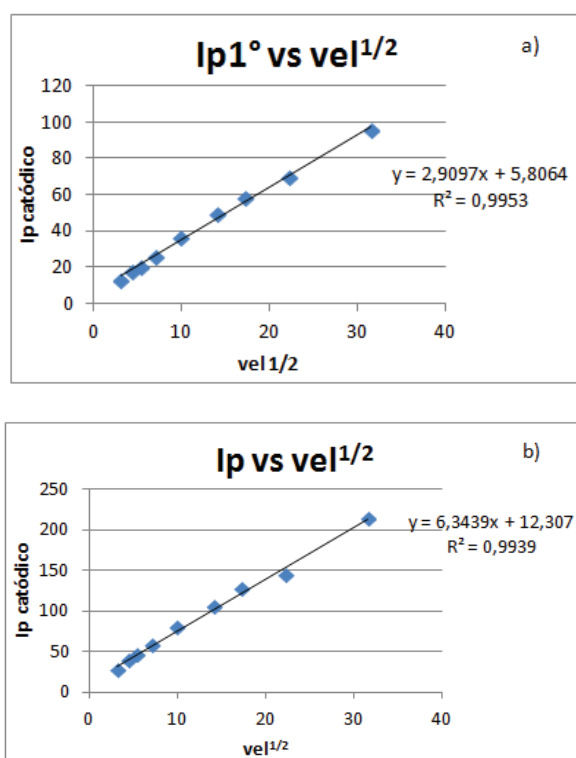


Figura 5.6 Dependencia de la intensidad de la corriente de pico catódico (I_{pc}) con la velocidad de barrido de potencial para BNZ (3,9mM) en DMSO, a) en medio neutro b) con TFA 49mM.

Estos datos pueden ser relevantes si se desean realizar experiencias preparativas (como por ejemplo una electrólisis preparativa) para obtener alguno de los productos de reducción del BNZ para estudios posteriores. En medio neutro, en DMSO (Figura 5.1) se ven bien diferenciados dos primeros procesos electroquímicos a -1,3 y -1,8 V, de manera que si se quiere obtener uno de éstos productos se lleva a cabo una electrólisis preparativa al potencial del producto buscado. Por otro lado, si se busca obtener el producto de la transferencia

máxima de electrones (esquema 5.1), es importante tener en cuenta que en medio ácido el potencial de reducción es mas anódico, es decir, se logra éste producto a potenciales menores que en medio neutro, lo que implica un menor gasto de energía.

Etanol (EtOH)

Se llevaron a cabo experiencias similares en EtOH en medio neutro empleando perclorato de litio (LiClO_4) como electrolito soporte. En los V.C (Figura 5.7) se observa que el sistema tiende a un comportamiento irreversible aunque se puede percibir una ligera señal en el barrido inverso en algunos casos. No se observa en los voltamperogramas picos en la región anódica al realizar un barrido en dirección anódica. Pero en un barrido anódico posterior, sí se observa un pequeño pico anódico (ver figura 5.7a) que corresponde por lo tanto a la reoxidación de la sustancia que se produjo en la región catódica. En medio ácido y neutro se observa la presencia de un único proceso de electrorreducción (ver figura 5.7a y 5.7c). Pero en medio básico, el comportamiento es ligeramente diferente ya que logra observarse que el proceso se produce en dos o más etapas (ver figura 5.7b).

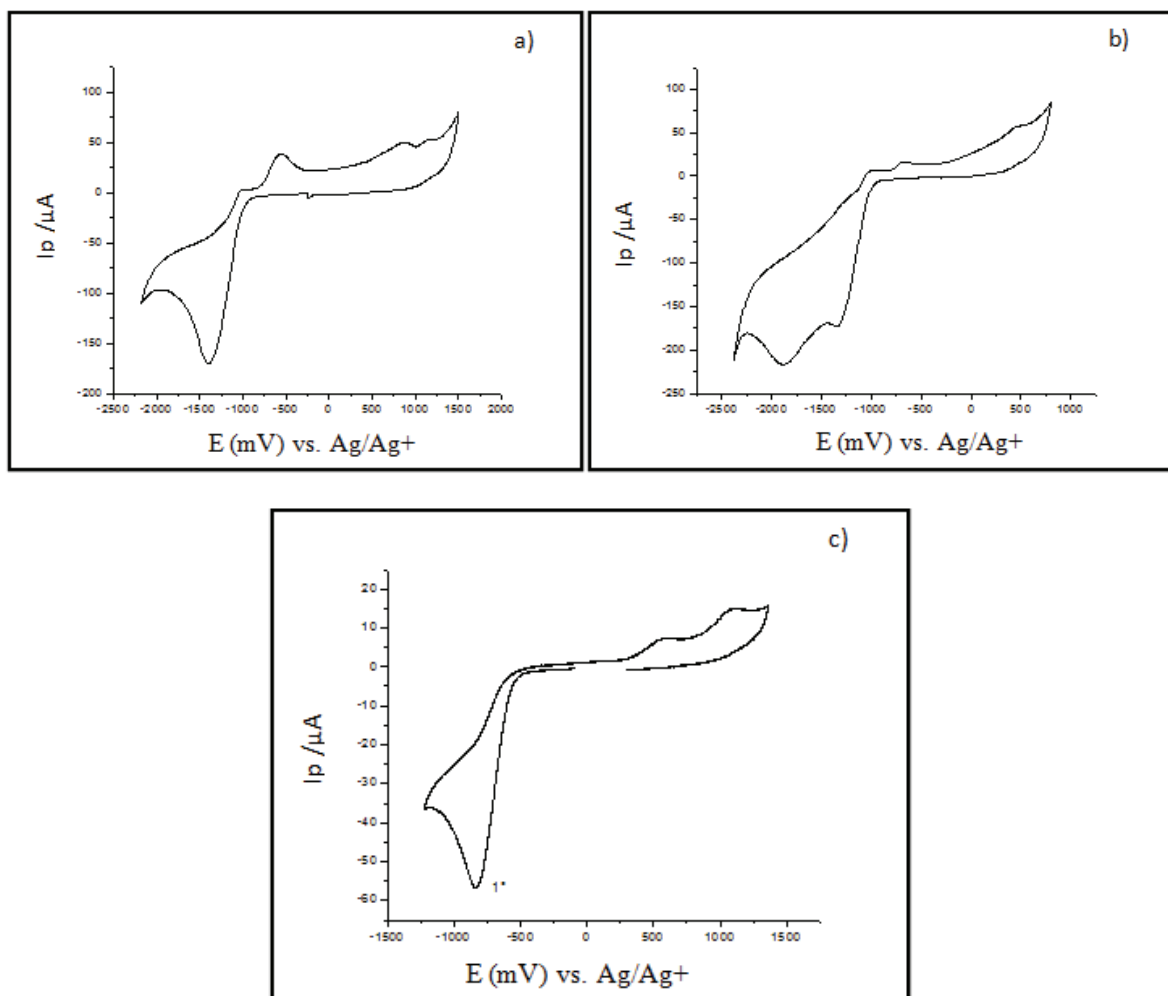


Figura 5.7 Voltamperograma cíclicos de BNZ (3,9mM) en etanol en a) medio neutro; b) con KOH (2,5mM); c) con TFA (40mM/ velocidad de barrido 20mV seg^{-1}).Electrolito soporte LiClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 200 mV seg^{-1}

Se puede inferir a partir de éstos V.C que los procesos involucrados en ellos tienen una o más reacciones químicas asociadas, debido a que puede notarse que a valores menores de la velocidad de barrido el pico en la región anódica es proporcionalmente más pequeño (respecto al pico catódico) (ver figura 5.8a) que a altas velocidades, lo que indicaría que la reacción química tiene mayor preponderancia que el proceso electroquímico. A valores mayores de la velocidad, el pico en la región anódica cobra mayor importancia (ver figura 5.8b), debido a que la transferencia electrónica se lleva a cabo a una velocidad de barrido que no permite que se produzca en tanta proporción, como a bajas velocidades, la reacción química asociada.

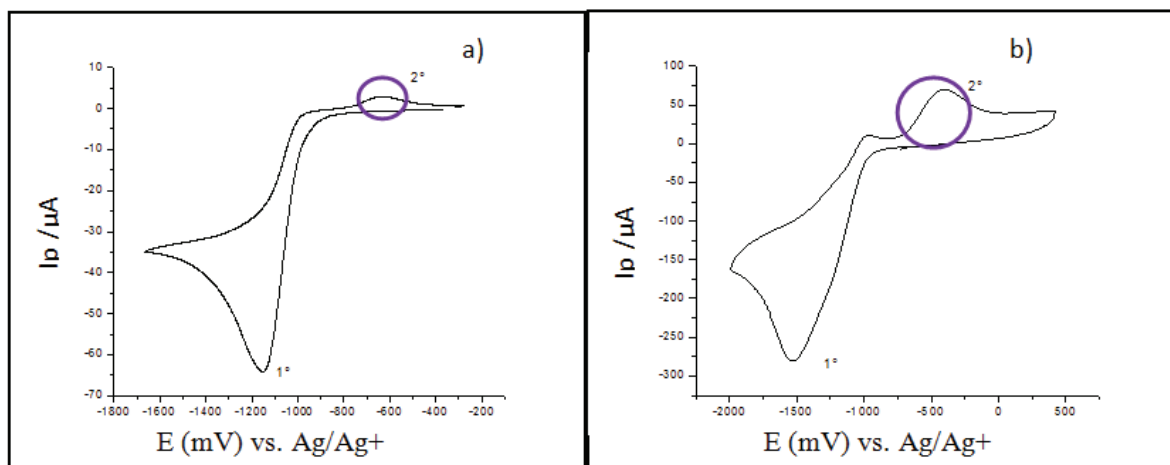


Figura 5.8 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en etanol a una velocidad de barrido de a) 10 mV seg⁻¹; b) 500 mV seg⁻¹. Electrolito soporte LiClO₄ 0,1M.

Dimetilformamida (DMF)

Medio neutro y medio ácido

La respuesta del BNZ en DMF en medio neutro es cualitativamente similar al caso del DMSO (Figura 5.1). Los dos procesos se detectan en este caso a -1,37 y -1,72 V y son de características cuasi reversibles. Cuando a una solución de BNZ en DMF se le agrega TFA comienza a aparecer un pico más anódico conocido como “prepico” (ver figura 5.9). Este prepico aumenta en intensidad a medida que aumenta la concentración de ácido. Simultáneamente se verifica la disminución paulatina de los dos picos originales. Cuando la concentración de ácido es mucha mayor que la del sustrato, el V.C. muestra un único pico el cual ya no varía más con posteriores agregados de ácido.

Los procesos que ocurren en el 1^{er} pico de reducción se adaptan a un esquema general del tipo:



A medida que aumenta la concentración de protones por el agregado del ácido y la aparición del “prepico” (ver figura 5.9) la reacción puede seguir el siguiente mecanismo:

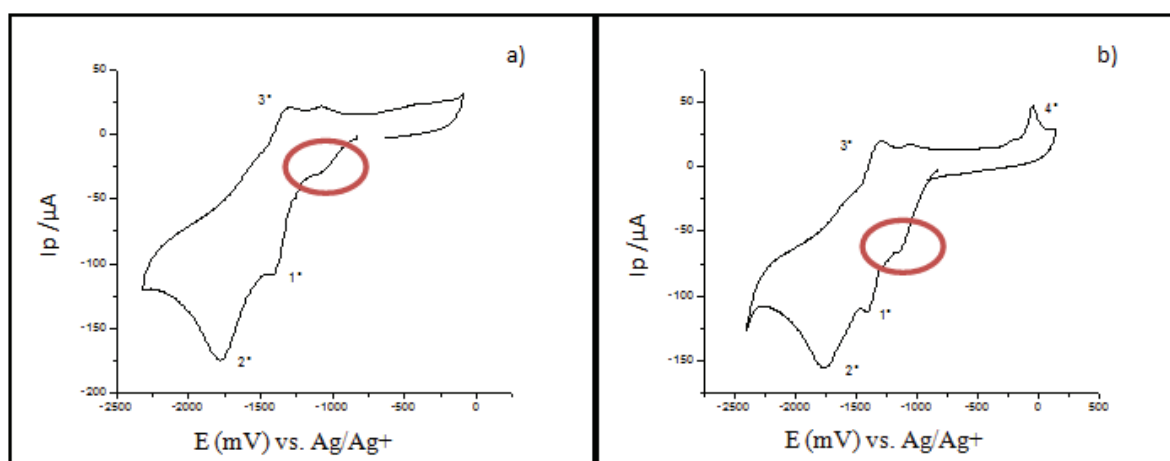


Figura 5.9 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMF con a) agregado de TFA 1,28mM; b) agregado de TFA 3,41mM. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg⁻¹.

Cuando la [A] (concentración de la especie A) es mayor a la [H⁺] (concentración de protones) se produce la reacción en 2 pasos (reacción 5.1 y reacción 5.1-5.4). El proceso más anódico corresponde al esquema descrito (reacción 5.1 a 5.4), mientras que el segundo corresponde a la reducción de la concentración excedente del sustrato (reacción 5.1). Pero a

medida que aumenta la $[H^+]$, se ven favorecidas las reacciones 5.2 a 5.4 a expensas de la reacción 5.1. Esto se observa en el voltamperograma como el “ensanchamiento” del 1^{er} pico, aunque en realidad es el crecimiento del prepico (ver figura 5.10)

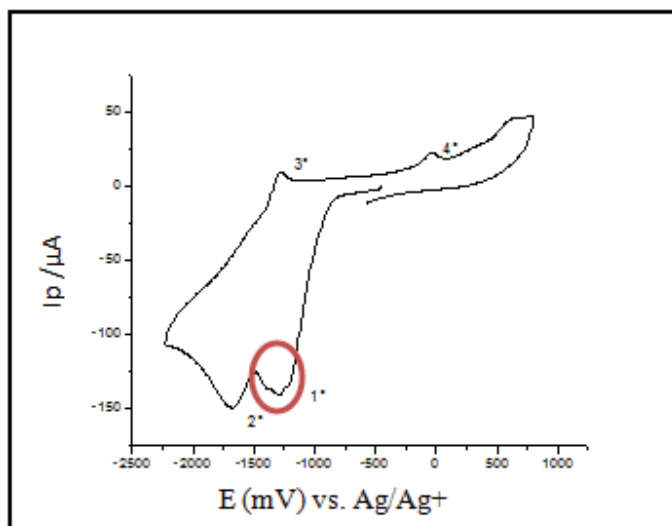


Figura 5.10 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMF con agregado de TFA 7,67mM. Electrolito soporte $NaClO_4$ 0,1M. Velocidad de barrido: $200mV\text{ seg}^{-1}$.

A medida que continúa aumentando la concentración de TFA deja de observarse la reacción en dos etapas, al punto que, a concentraciones de 39,6mM, se produce la reacción global en una sola etapa (ver figura5.11), lo que puede verse en el voltamperograma como un solo pico en la región catódica.

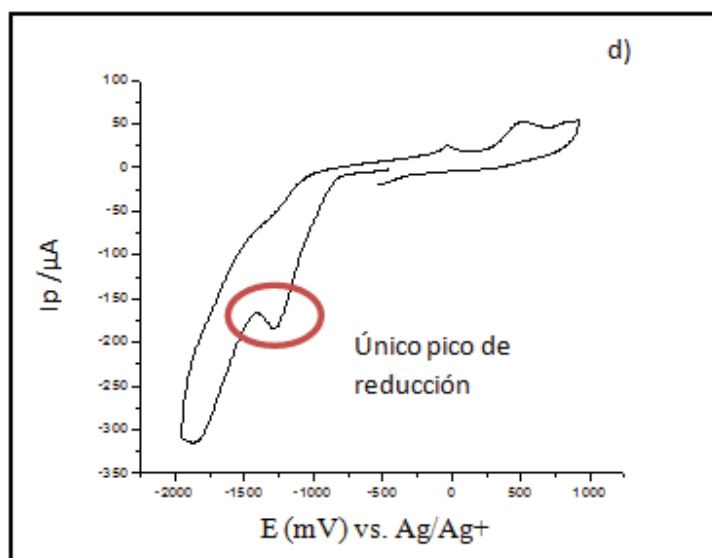
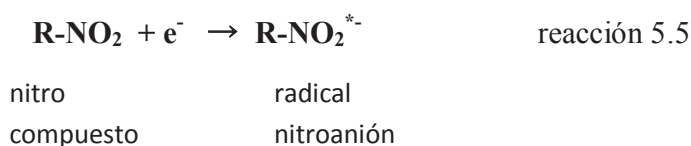


Figura 5.11 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMF con TFA 39,6mM. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg⁻¹.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, algunos de ellos descritos en el capítulo 2 del presente trabajo, se puede inferir que el proceso de reducción en el 1^{er} pico (y prepico cuando [H⁺] < [R-NO₂]) corresponde a la reacción de formación del radical nitro anión³²:



En el 2^o pico más catódico, o en el único pico cuando [H⁺] >> [R-NO₂] pueden suceder las siguientes reacciones observándose un solo pico de reducción



Y es posible que la reacción continúe hasta la formación de la amina correspondiente en etapas posteriores:



Medio básico (con hidróxido de potasio (KOH))

A diferencia del comportamiento con ácido, cuando se agrega KOH a una solución de BNZ en DMF, tanto el 1^{er} pico de reducción como el 2^{do} disminuyen progresivamente (Figura 5.12) hasta casi desaparecer (Figura 5.13). En este último caso, con altas concentraciones de KOH (33mM) se observa además, actividad en la región anódica (ver figura 5.14) por la presencia de un máximo a +0,15 V de características irreversibles.

En estas condiciones, con el posterior agregado de ácido para neutralizar el medio, no se observa regeneración de los picos de reducción originales, lo que confirma que el BNZ reacciona en forma irreversible en medio básico (ver figura 5.14).

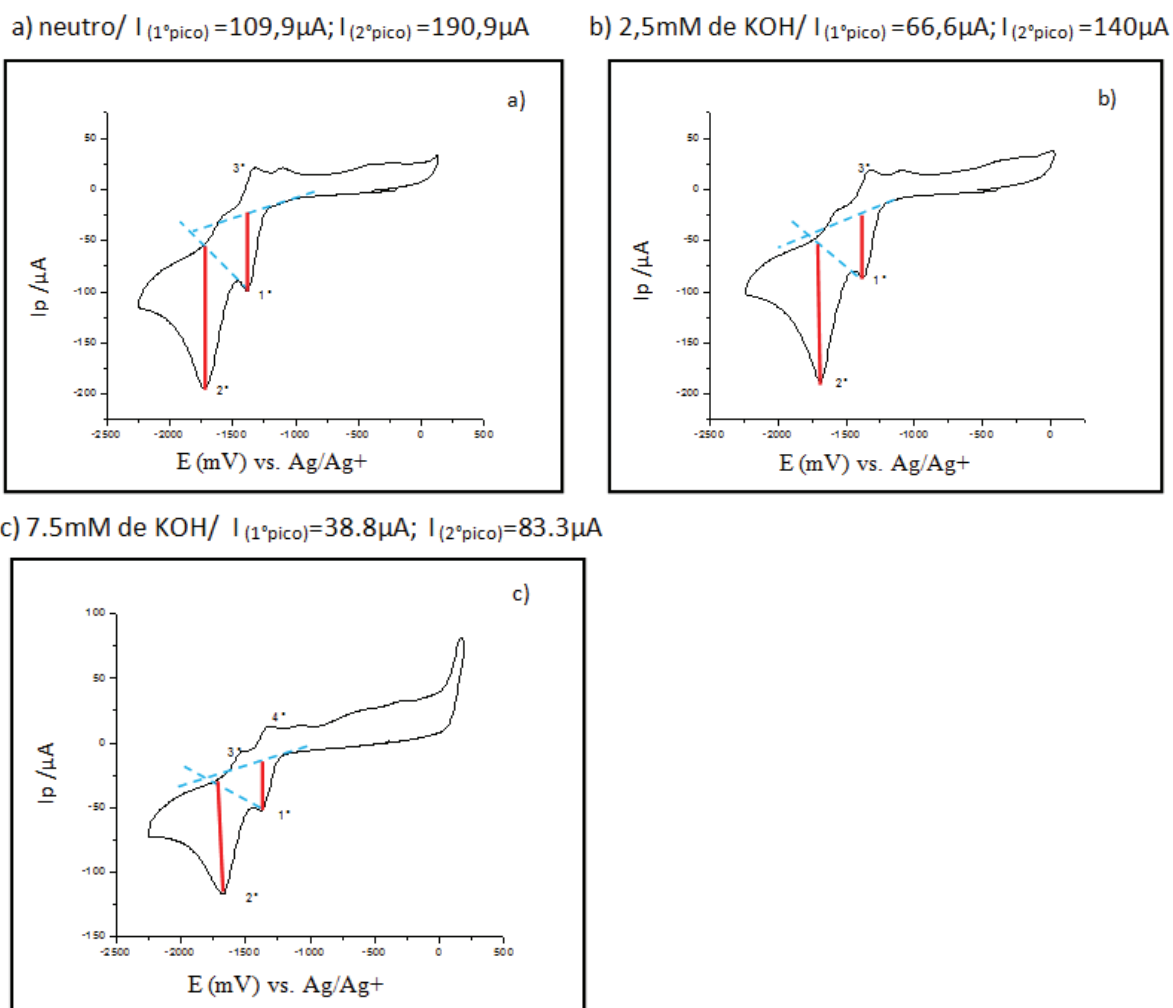


Figura 5.12 Voltamperograma cíclico BNZ (3,9mM) en DMF en a) medio neutro; b) con agregado de KOH 2,5mM; c) con agregado de KOH 7,5mM. Electrolito soporte NaClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg^{-1} .

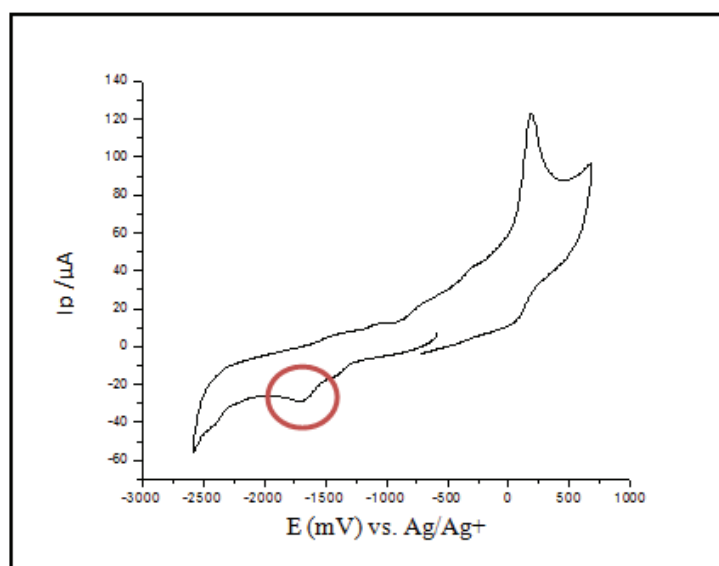


Figura 5.13 Voltamperograma cíclico BNZ (3,9mM) en DMF con KOH 33mM. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg⁻¹.

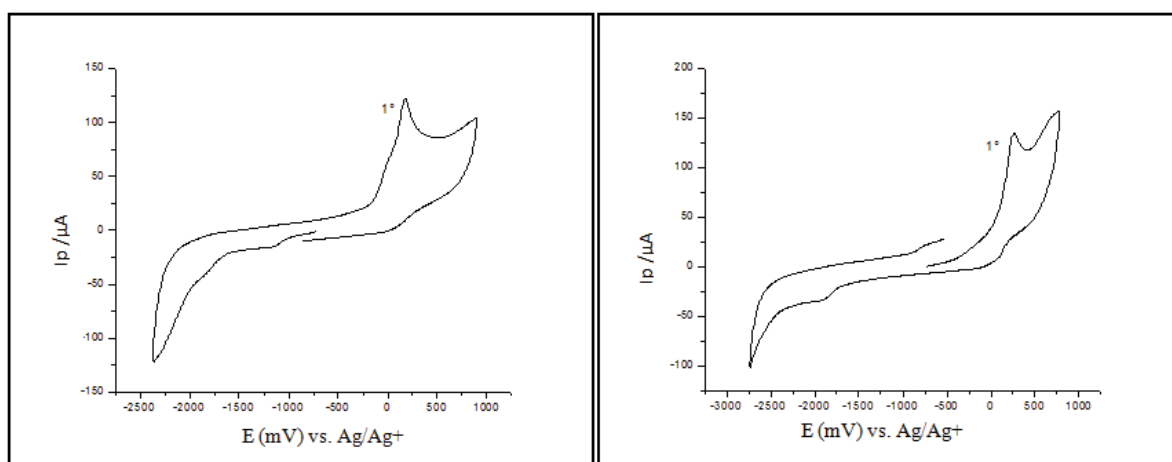


Figura 5.14 Voltamperograma cíclico BNZ (3,9mM) en DMF con agregado inicial de KOH 33mM y posterior agregado de TFA 28mM a) barrido catódico; b) barrido anódico. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg⁻¹.

Discusión:

Como fue mencionado en el cap. 2 del presente trabajo, la bibliografía postula dos vías de reducción electroquímica en sistemas biológicos *in vitro* para NFX; a través de un ciclo redox con la formación de peróxidos y superóxidos, que permitiría su principal acción tripanocida, y otra, a través de un intermediario nitroso¹⁷⁻²⁰, como resultado de la reducción de 2 e⁻. Esta vía, luego continúa hasta formar la amina como producto final. Para BNZ se postula la segunda vía, por no obtener producción de superóxidos o peróxidos¹⁷⁻²⁰, productos propios del ciclo redox; y se supone que la hidroxilamina presente en la vía desde nitroso a amina, se une a macromoléculas, ejerciendo así su acción tripanocida.

De acuerdo a los resultados obtenidos en DMSO en medio neutro, se puede suponer que la primera reducción corresponde a una transferencia mono electrónica, obteniéndose el radical nitroanión, el cual es relativamente estable a bajos potenciales catódicos, pero que posteriormente, y mayores potenciales forma el intermediario por la transferencia de un segundo electrón. En medios biológicos, éste intermediario continúa hasta la formación de una hidroxilamina, que es la que puede unirse a ácidos nucleicos y proteínas²².

Una importante cantidad de variables influyen en éste comportamiento general, algunas de ellas fueron estudiadas.

La Tabla 5.1 muestra el potencial del primer proceso de reducción electroquímica del BNZ en distintos solventes y medios.

Tabla 5.1 Potenciales de pico para la primera señal de electroreducción del BNZ en solventes no acuosos, en diferentes medios. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg⁻¹.

	ε	DN	Neutro	Ep (potenciales de pico/volt)					
				Medio ácido Ep (concentración TFA/mM)			Medio básico Ep (concentración KOH/mM)		
DMF	36,7	26	1,41	1,41 (1,28)	1,28 (7,67)	1,26 (39,6)	1,38 (2,5)	1,38 (7,5)	1,7 ^a (33)
DMSO	46,7	30	1,34/1,36	1,31 (49,1)			—		
ETOH ^b	24,3	19	1,40	1,14 (20)	0,97 (40)		1,34 (2,5)	1,37 (10)	1,29 (60)

a) a altas concentraciones, no se produce reducción significativa, se observa un pequeño pico a 1703.4v

b) llevados a cabo con LiClO_4 ya que el NaClO_4 es insoluble en etanol.

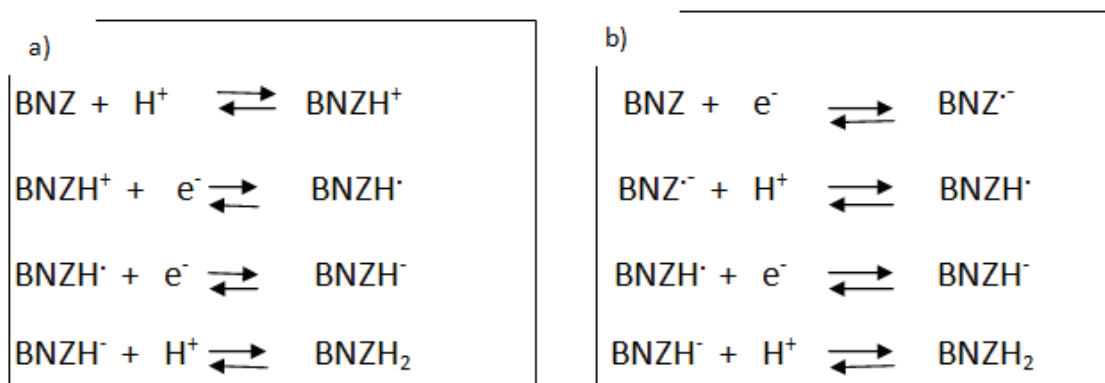
La variación de la respuesta voltamperométrica en los distintos solventes, puede racionalizarse si se tienen en cuenta algunas de las propiedades físicas de los mismos. Por ejemplo, si una determinada reacción química o electroquímica que involucre especies cargadas se va a ver influenciada por el parámetro constante dieléctrica que nos da una orientación acerca de la estabilidad de estas especies y por lo tanto puede determinar el curso de la reacción. Sin embargo, los solventes empleados comúnmente en electroquímica son relativamente polares y de constantes dieléctricas relativamente altas. (Tabla 5.1). Debido a esto, no se encuentran para los solventes estudiados, grandes diferencias en los potenciales del primer proceso de reducción.

Pero en donde se observa un efecto importante del solvente es en la diferencia de los potenciales de reducción cuando los V.C. se realizan en presencia y en ausencia de ácido. Efectivamente, en la Tabla 5.1 puede verse que la diferencia ($\Delta E_{\text{acid}} = E_{\text{pc1, acid}} - E_{\text{pc1}}$) varía de 5 mV (dependiendo de la velocidad de barrido) para DMSO hasta 560 mV para etanol. Esta conducta puede racionalizarse si se emplean algunos parámetros empíricos utilizados comúnmente para explicar la influencia de los solventes en las reacciones químicas³³. En particular, algunos de ellos se usan como una medida de la fuerza de los solventes como ácidos o bases de Lewis tales como el llamado número donador de Gutman, DN, el cual es una medida cuantitativa de la acidez de Lewis. En la Tabla 5.1 se observa que cuanto mayor es el DN del solvente, menor es la separación ΔE_{acid} . Un DN grande (DN DMSO = 30, $\Delta E_{\text{acid}} = 5$ mV) implica una fuerte solvatación de los protones del ácido lo cual provoca a su vez un decrecimiento en la velocidad de protonación y por consiguiente un desplazamiento pequeño del potencial de pico. Un DN menor (DN EtOH = 19, $\Delta E_{\text{acid}} = 560$ mV) produce el efecto contrario.

Otros mecanismos alternativos son posibles para la protonación en medio ácido. Como se mencionó anteriormente, en DMSO la transferencia de electrones puede ocurrir luego de la protonación del fármaco (esquema 5.1a) Esto genera que el proceso electroquímico se observe a valores menores de potencial en relación al potencial al que aparece ésta primera reducción en medio neutro debido a que la dificultad en reducir una especie cargada

positivamente (BNZH^+) es menor que para reducir una especie neutra (BNZ). Pero también puede existir un mecanismo alternativo, ya descrito, en el cual la transferencia electrónica se lleve a cabo generando primero el radical, como en el esquema 5.1b, y luego ocurrir la protonación de éste continuando con un esquema de reacción similar al esquema 5.1a.

Esquema 5.1 Esquemas posibles para la primera etapa de electroreducción del BNZ en medio ácido.



En ambos casos, la transferencia total de electrones se realiza en un solo proceso, generando un único pico de reducción.

Analizando en forma cualitativa la basicidad de la molécula del BNZ, se observa que los centros básicos posibles que tiene son los cuatro átomos de nitrógeno. Como es sabido, el grupo amida, es prácticamente neutro como ácido o como base; mientras que el grupo nitro es totalmente neutro. Uno de los átomos de nitrógeno del anillo imidazol es prácticamente neutro desde el punto de vistas acido-base debido a que participa en la aromaticidad del anillo (sexteto de electrones π). El otro átomo de nitrógeno del imidazol, con un par de electrones no compartido, es ligeramente básico por lo cual el imidazol normalmente se protona en medio ácido. Pero la presencia del grupo nitro fuertemente electronegativo, provoca una fuerte atracción de los electrones del resto de la molécula, de manera que el par de electrones no compartido del nitrógeno en el anillo imidazol, estará aún menos disponible, reduciendo así su basicidad. El resultado final de estas consideraciones es que la molécula de BZN resulta ser prácticamente neutra.

Por otro lado, el TFA es un ácido relativamente fuerte en medio acuoso, pero es mucho más débil en solución no acuosa. Por ésta razón, suponemos que en las primeras etapas de reducción en medio ácido, se lleva a cabo primero el proceso de transferencia electrónica generando el anión-radical (el cual ahora si es una base fuerte) y luego ocurre la protonación de éste (ver esquema 5.1b)

Por el contrario en medio básico, como cabría de esperar, la electroreducción se ve dificultada (se produce a potenciales más catódicos) debido la menor estabilización del posible anión-radical formado.

Influencia del electrolito soporte

La influencia de la naturaleza del electrolito soporte se analizó en los diferentes solventes empleados. Se describe a continuación las observaciones que ocurren en DMSO. La 1° transferencia electrónica en DMSO (Figura 5.15), usando perclorato de sodio como electrolito soporte (NaClO_4 ; $E = 1,33 \text{ V}$) es menor que la misma transferencia electrónica usando tetraetil amonio perclorato (TEAP; $E = 1,45 \text{ V}$). Esto ocurre debido a la diferente capacidad de complejación del electrolito soporte. Ambos electrolitos tienen catión 1^+ por lo que la capacidad de complejación estará dada principalmente por el tamaño del catión. Cationes de menor tamaño tienen mayor capacidad de complejación debido a la menor dispersión de su carga. Así, el Na^+ tendrá más capacidad de complejación que el $^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$.

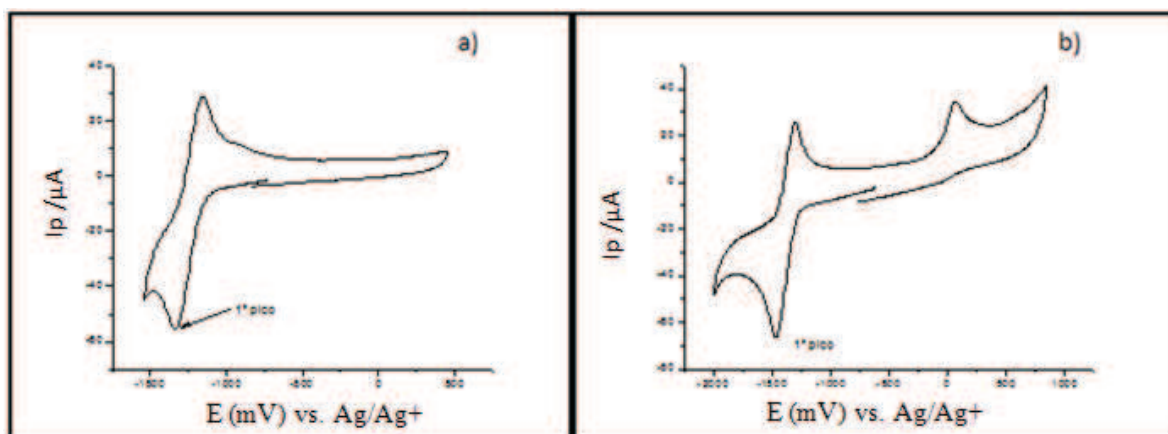


Figura 5.15 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO en medio neutro con a) NaClO_4 0,1M como electrolito soporte y b) TEAP 0,1M como electrolito soporte. 1° transferencia electrónica. Velocidad de barrido 200mV seg^{-1} .

Aun así, la diferencia en la 1° transferencia no es tan marcada como en la segunda transferencia (Figura 5.16), en la cual ocurre un corrimiento más importante del potencial (en NaClO_4 $E= 1,72\text{V}$; mientras que en TEAP, $E= 2,08\text{V}$) debido a que en la 2° transferencia electrónica el compuesto está doblemente cargado, así la complejación es mucho mayor.

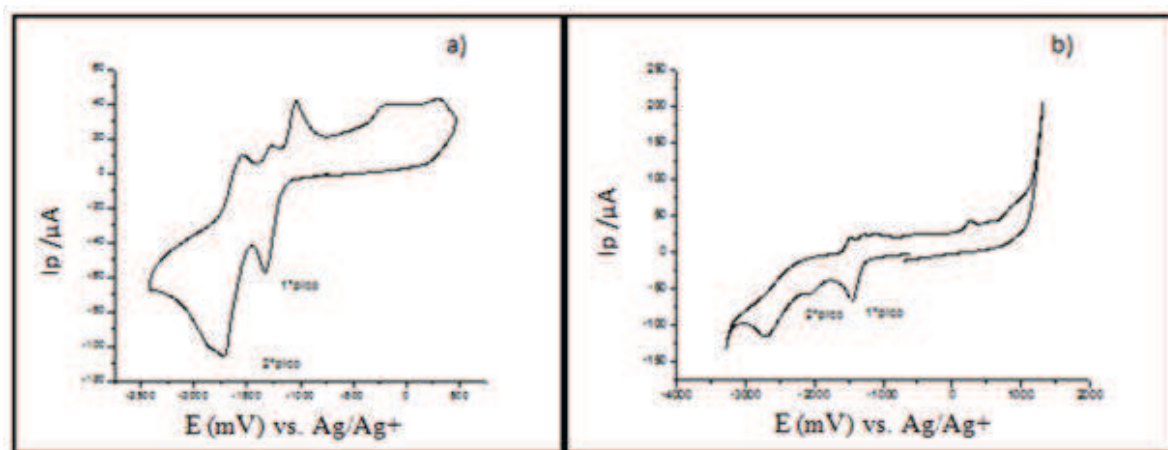
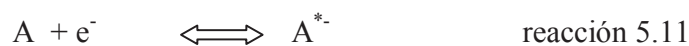


Figura 5.16 Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO en medio neutro con a) NaClO_4 0,1M como electrolito soporte y b) TEAP 0,1M como electrolito soporte. 2° transferencia electrónica. Velocidad de barrido 200mV seg^{-1} .

La complejación que lleva a cabo el catión del electrolito (C^+) soporte influye en el desplazamiento de la reacción 5.11, complejando el producto de ésta, favoreciendo la reacción 5.12



Cuando el catión del electrolito soporte tiene menor capacidad de complejación, como ocurre con el TEAP, la reacción 5.12 ocurre en menor extensión. Por el contrario, un fuerte interacción con Na^+ con formación de A^-Na^+ (1ra transferencia electrónica), o $A^{2-}(Na^+)_2$ (2da transferencia electrónica) produce un desplazamiento de los máximos a potenciales más catódicos dificultando además la reacción 5.13.



Conclusiones:

Se demuestra la presencia de importante actividad electroquímica en solventes no acuosos, especialmente los procesos de electrorreducción. En éstos medios, la respuesta es influenciada por una gran cantidad de variables, como por ejemplo, la naturaleza del solvente, las sales del electrolito soporte, el pH del medio, entre otras.

Por ejemplo, en medio neutro se observan varios procesos de electrorreducción, los que pueden ser asociados a las distintas etapas de reducción del grupo nitro. Los estudios

del presente trabajo se centraron mayoritariamente en los procesos de la primera etapa de reducción. Se establecieron así condiciones de reversibilidad y condiciones electrocinéticas, y una primera aproximación al mecanismo involucrado en dicha etapa.

En medio ácido, como cabe de esperar, la electrorreducción se ve facilitada en comparación con medio neutro, por un mecanismo que involucra a los protones (H^+).

En general, se observa una variabilidad interesante de los potenciales de reducción de la sustancia, asociada a los múltiples factores aquí estudiados. Es decir, el BNZ se reduce mediante un proceso muy vulnerable al entorno. Esto implica que muy probablemente estas propiedades electroquímicas se manifiesten de una manera particular y diferente en cada uno de los entornos biológicos vinculados con sus mecanismos de acción tripanocida y/o de generación de ADRs. Éstos son por ejemplo los distintos entornos de los sitios activos de las enzimas involucradas en estos fenómenos.

Proyecciones a futuro:

En base a los resultados obtenidos, las tareas que se necesitan para continuar las investigaciones serían las de establecer los productos de reducción electroquímica, que se pueden generar en cantidades preparativas mediante técnicas tales como electrólisis a potencial controlado, seguidas de técnicas analíticas, como las cromatográficas y sus variantes, y técnicas espectroscópicas.

También es posible ampliar el horizonte de respuestas electroquímicas mediante el empleo de otras variables que influyen en el comportamiento voltamperométrico del BNZ tales como la temperatura de reacción, y el material del electrodo empleado como electrocatalizador. Son dos parámetros a tener en cuenta en futuras investigaciones.

Bibliografía:

- 1) WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease & World Health Organization. Report of the WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2005. World Health Organization, Geneva. 2005.
- 2) Moncayo A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo>.
- 3) Muñoz R.A. Estudio de la capacidad antichagásica de nuevos derivados de 5-nitroindazolonas. Memoria para optar al Título de Químico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, 1995. 12-13p.
- 4) Berenstein A. et al. Estudio de prevalencia de enfermedad de Chagas en Centros de salud de la ciudad de Buenos Aires. En: Congreso de Pediatría (34to, 2006, Córdoba, Argentina).
- 5) WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease & World Health Organization. Second report of the WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series (905) Brasilia, 20–28 November 2000.
- 6) Altcheh, J., Biancardi, M., Lapena, A., Ballering, G., Freilij, H. Congenital Chagas Disease: Experience in the Hospital de Niños Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (38 Suppl 2): 41-45, 2005.
- 7) Urbina J.A., Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. (19): 495-501, 2003.
- 8) Paula Leighton. Ensayan droga contra Chagas por primera vez en 40 años. SciDev Agencia de Noticias. <<http://www.scidev.net/es/news/ensayan-droga-contra-chagas-por-primera-vez-en-40-a-os.html>>

- 9) Maya J. D., Cassels B. K., Iturriaga-Vásquez. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Review. Elsevier. 2006
- 10) BaireSalud < <http://www.baires-salud.com.ar/actualidad-45/argentina-produce-el-farmaco-para-tratar-el-chagas-3676.html>>
- 11) Cañas M. Noticias de América Latina. Novedades en los medicamentos para el Chagas, Nifurtimox y Benznidazol. Boletín Fármacos; 9(1). 2006.
- 12) Primer Congreso De Enfermedad Endémicas. (1º; 6 y 7 de Agosto de 2004; Consejo de Médico de Santiago del Estero) Enfermedad de Chagas: Aportes de la escuela argentina desde Mazza a nuestros días. Indiferencia, desinterés y deficiente conocimiento de la enfermedad en general y de la clínica Agudo en particular. Humberto S Lugones.
- 13) FioCruz La historia de la terapéutica de la enfermedad de Chagas < <https://portal.fiocruz.br/>>.
- 14) Bartel L.C. Estudio de los efectos laterales tóxicos de fármacos antichagásicos en tejido mamario de rata. Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional de San Martín. 2009
- 15) Perrin D.D., Armarego W.L.F., Purification of Laboratory Chemicals, *Oxford, Pergamon Press*, 1988.
- 16) Castro J.A, Diaz de Toranzo E.G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomedical and Environmental Sciences*. Jun;1(1):19-33.1988.
- 17) Docampo, R., Moreno S.N., et al. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochemical Pharmacology (30) Issue 14, 15 July Elsevier 1981, p1947-1951.
- 18) Docampo, R., Moreno S.N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Diseases*. 6(2): 223-38. 1984

- 19) Docampo, R., Stoppani A.O. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. 197(1): 317-21. Oct 1. 1979
- 20) Docampo, R., Stoppani A.O. Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. *Revista Medicina Buenos Aires* 40 Suppl 1: 10-6. 1980
- 21) Mason, R.P., Holtzman, J.L. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 67(4):1267-74 (1975)
- 22) Hall B. S., Wilkinson S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Ene 2012 vol. 56 no. 1 115-123
- 23) Baker N, Alsford S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Mar 2011; 176(1): 55–57.
- 24) Heimbrook D.C, Sartorelli A.C; Panicucci R, McClelland R.A. Biochemistry of misonidazole reduction by NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. *Molecular Pharmacology* Feb 1986 vol. 29 no. 2 168-172
- 25) Cáceres M.A. Inhibición de la síntesis de glutatión como estrategia para potenciar el efecto de drogas antichagásicas en modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Chagas. Tesis para optar al grado de Dr. en Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2007.
- 26) Wilkinson S.R., Taylor M.C., Horn D., Kelly J.M., Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:5022–5027.

- 27) Marson M.E., Moscatelli G., Moroni S., Alcheh J., García-Bournissen F., Mastrantonio G.E. Identification of N-benzylacetamide as a major component of human plasmatic metabolic profiling of benznidazole. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (aceptado 2014); doi: 10.1007/s13318-014-0195-8
- 28) Castro J.A, Montalto de Mecca M, Bartel L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human and Experimental Toxicology*. Ago 2006. vol. 25no. 8 471-479.
- 29) Baeza Reyes A., García Mendoza A.J. Principios de Electroquímica Analítica. UNAM 6/1/2011
- 30) R.L. Pecsok y L.D. Shields. "Métodos Modernos de Análisis Químicos". Editorial Limusa. 1973. cap 22, pag 625-657
- 31) Ortíz R; Martínez Y.; Hernández R. Técnicas Electroanalíticas. Parte II Voltamperometría. 2011
- 32) Squella Serrano J.A. Comportamiento electroquímico de nitrocompuestos: síntesis y reducción electroquímica de 4-nitroimidazoles sustituidos y su comparación con 2- y 5-nitroimidazoles. Memoria para optar al grado de Doctor en Química. Chile. Universidad de Huelva. 2008
- 33) Schmid R. Effect of Solvent on Chemical Reactions and Reactivity. Handbook of Solvent, George Wypych (Editor), ChemTec Publishing, Toronto, Ontario M1E 1C6, Canada, pp. 738.
- 34) Bard A.J., Faulkner L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Inc. (2nd ed.), 2001.
- 35) Brener, Z. Atividade terapêutica de 5 Nitro-2Furaldeido-Semicarbasona (Nitrofuazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 1962. 3(1)
- 36) Packchanian: Estado actual da terapêutica específica da doença de Chagas. Prata, A. (Editor) *Revista Goiana de Medicina.*, 1963. 9(supl): p. 109-121.

- 37) Coura, J.R, Ferreira. Experiências com a Nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*. 1963. 9(supl): p. 99-107
- 38) Cancado R. Formas clínicas da doença de Chagas. Em "Doença de Chagas" editado por PRATA, A. - J. Romeu Cançado, Belo Horizonte, 1968
- 39) Carrizo P. "Metabolismo Hepatico del Nifurtimox, un nitrofurano antichagastico". Tesis presentada para optar el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires -1995- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires <.www.digital.bl.fcen.uba.ar>
- 40) Molina et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul; 42(7):1771-7.