



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química y Farmacia**

**Patrocinante: Dr. Luis J. Nuñez Vergara**  
**Químico Farmacéutico**  
**Universidad de Chile**

**Co-patrocinante: Dr. J. Humberto Dölz V.**  
**Químico Farmacéutico**  
**Universidad Austral de Chile**

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE 1,4 DIHIDROPIRIDINAS Y  
SU REACTIVIDAD CON EL RADICAL SUPERÓXIDO**

**Tesis de grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al  
Título de Químico Farmacéutico**

**PAOLA ISABEL ARELLANO RISCO**

**Valdivia – Chile**

**2005**

*A mi niña Josefa.....*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer a Dios por darme la fortaleza e inteligencia para poder llevar a cabo esta obra y permitirme llegar a ser lo que tan anheladamente soñé.*

*A mis padres que siempre me inculcaron que en la vida hay que luchar y trabajar para llegar a ser alguien y conseguir lo que uno desea.*

*A mi hermana Mónica, tus palabras siempre fueron un apoyo tranquilizador en los momentos difíciles.*

*Javier, mi compañero alentador, me enseñaste que en la vida hay que perseverar y que con esfuerzo todo se puede lograr.*

*Quisiera dar un sincero agradecimiento al Dr. Luis Nuñez Vergara por todo el apoyo y preocupación en el desarrollo de mi tesis.*

*Un agradecimiento especial a Soledad Bollo, gracias por la paciencia y gran ayuda que me brindaste en todo, sin lugar a dudas no lo hubiera podido lograr sin ti. A Arturo Squella y a todo el laboratorio de Bioelectroquímica que me integraron como parte de su equipo y aportaron sus granitos de arena con su conocimiento y amistad.*

*A los docentes que ayudaron en mi formación profesional y personal en especial al Dr. Humberto Dölz por su dedicación y por enseñarme como debe ser un buen farmacéutico, al Dr. Ricardo Ugarte por sus consejos en aquellos años de estudiante donde se necesita más de alguna palabra de aliento y amistad.*

*A todas aquellas personas que me acompañaron en el día a día en mi paso por Valdivia, en especial a Wendy Subiabre, Alexia Garrido, Mixy Reyes, Gerardo Muñoz, Karina Castro, siempre tendrán un lugar especial por ser mis grandes amigos.*

*Quisiera agradecer a la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por recibirme para desarrollar este proyecto de investigación y a FONDECYT por el financiamiento del proyecto.*

## 1. RESUMEN

La presente memoria de título reporta la caracterización anódica de los derivados 2,6 – dimetil - 3,5 - diisopropil - 4 -(orto-, meta-, para-) - nitroaril - dihidropiridina y su reactividad con el radical superóxido.

Tanto en medio prótico (Et/Br: 30/70, KCl) como aprótico (DMF) y utilizando la técnica de voltametría de pulso diferencial, los compuestos exhiben un único pico debido a la oxidación del anillo dihidropiridínico.

Del estudio con electrodo de disco rotatorio, se estableció una dependencia lineal entre la corriente límite y la velocidad de rotación, lo que permitió calcular los respectivos coeficientes de difusión e indicar que el proceso es controlado por difusión.

De los estudios por cromatografía líquida de alta eficiencia, empleando detector UV y detector electroquímico, se obtuvo los tiempos de retención de cada derivado y posibles productos post-reactividad con oxígeno.

Dada la reactividad con el radical superóxido de cada derivado se concluye que éstos presentan un potencial efecto antioxidante.

## 2. SUMMARY

The present title memory reports the anodic characterization of the 2,6-dimethyl-3,5-diisopropyl-4-(ortho-, meta-, para-)nitroaryl-dihydropyridine derivatives and its reactivity with the superoxide radical.

In protic (Et/Br : 30/70, KCl) and aprotic (DMF) media and utilizing the Differential pulse and cyclic voltammetry techniques, the compounds showed an irreversible single peak, due to the oxidation of the dihydropyridine ring.

From the rotating disk electrode studies a linear dependence between the limiting current and the rotating rate was found, to permit the assessments of the respective diffusion coefficients and to indicate that the oxidation process is diffusion-controlled.

From the high performance liquid chromatography (HPLC) studies both, with the diode array and electrochemical detectors, the retention times of the each derivative were obtained and product possible post-reactivity with the oxygen.

The reactivity between the superoxide radical with each derivative permits to us conclude that those compounds to present a potential antioxidant effect.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los fármacos 1,4-dihidropiridínicos (1,4-DHP) se han utilizado ampliamente en terapia antihipertensiva. Estos fármacos se unen a sitios específicos que permiten la modulación de los canales lentos de calcio, regulando de esta manera la entrada de calcio al citoplasma (Katz A., 1985). De esta forma, las 1,4-DHP regulan la contracción vascular permitiendo un mejor control de la presión arterial (lo que explica su efecto antihipertensivo). Además, son eficaces en el tratamiento del asma y del espasmo intestinal, entre otros (Shwartz., et al., 1984; Wingard L., et al., 1991; Goodman et al., 1996).

Algunos autores consideran al anillo 1,4-DHP sustituido en posición 4 con un grupo arilo, como el farmacóforo y por lo tanto esencial para la actividad farmacológica. También se le asigna cierta relevancia estructural a la presencia de grupos ésteres en las posiciones 3 y 5 del anillo. Con relación al anillo dihidropiridínico, se ha establecido que éste presenta una mayor probabilidad hacia la conformación bote, permitiendo una mejor interacción fármaco-receptor (Goldmann et al., 1991).

Por otra parte, se ha establecido que la oxidación del anillo dihidropiridínico juega un rol fundamental en este tipo de moléculas. Su importancia se debería a los siguientes factores:

- Las 1,4-DHP se metabolizan hepáticamente a partir de la oxidación del anillo dihidropiridínico (Baarnhielm C., et al., 1986; Boker R., et al., 1986; Lee J., et al., 1988). Dicha oxidación provoca el término del efecto farmacológico antagonista de los canales de calcio y eventualmente otros efectos biológicos que estuvieran relacionados con la integridad del anillo 1,4-DHP.
- Se ha establecido que este tipo de compuestos presenta además de su efecto farmacológico antihipertensivo clásico, cierta actividad antioxidante (Mak T., et al., 1992; Van Ámsterdam F., et al., 1992), la que también podría verse afectada por procesos de oxidación hepática.

Los mecanismos que podrían dar cuenta del potencial efecto antioxidante de estas moléculas, podrían ser los siguientes:

(a) Mecanismos que involucran transferencia de electrones y/o carga.

- Transferencia de electrones, desde la 1,4-DHP hacia una especie radicalaria.
- Transferencia de un átomo de hidrógeno, desde la 1,4-DHP hacia una especie radicalaria.

(b) Mecanismo asociado al bloqueo de los canales lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Es conocido que el sistema Calcio-calmodulina modula la actividad de una serie de enzimas que participan en los procesos que generan estrés oxidativo. En consecuencia, los compuestos 1,4-DHP al impedir la entrada de calcio a la célula estarían bloqueando estos procesos.

En relación con los efectos antioxidantes de 1,4-DHP, los estudios realizados hasta ahora revelan que éstos no dependen del efecto bloqueador de canales, ya que estudios efectuados en sistemas *in vitro* que carecen de dichos canales, han mostrado que el efecto antioxidante persiste (Mason R., et al., 1999).

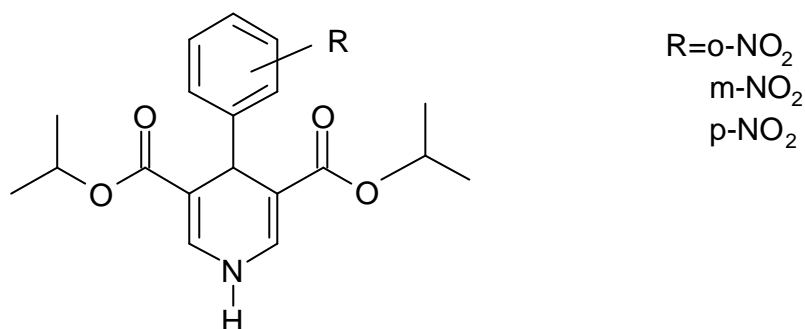
Por otro lado, estudios realizados en el Laboratorio de Bioelectroquímica (Ortiz et al., 2002) han demostrado que la interacción del anillo 1,4-DHP del Nisoldipino, con anión superóxido es de tipo transferencia de protones desde la posición 4 del anillo dihidropiridínico al superóxido como primera etapa en la desactivación de este radical.

Desde esta perspectiva, el estudio de la oxidación de 1,4-DHP ha sido objeto de variadas investigaciones tendientes a dilucidar los factores que afectan la oxidación de estas estructuras y que estarían relacionados con su actividad biológica. Sin embargo, los estudios respecto al mecanismo de oxidación se han basado en compuestos con clara desvinculación estructural de aquellos utilizados terapéuticamente. Por lo tanto, aparece como un desafío interesante la caracterización electroquímica de nuevos compuestos estructuralmente relacionados con aquellos utilizados en la terapéutica actual.

Dadas las características que ofrecen las técnicas electroquímicas, aparecen como las más indicadas para el estudio de procesos redox en moléculas orgánicas. La presente tesis se basa en el estudio del mecanismo electroquímico de oxidación de



derivados de 1,4-DHP, específicamente se estudiaron 3 moléculas, todas con los sustituyentes en el anillo 1,4-DHP iguales, excepto el anillo aromático en posición 4, el que tuvo con sustituyentes en R un grupo nitro (en posiciones o-, m-, p-)(Figura1). Se plantea la caracterización electroquímica anódica de cada molécula, estableciendo mecanismos de oxidación electroquímica, el estudio de la reactividad del núcleo 1,4-DHP con el anión superóxido y finalmente la influencia del grupo nitro sobre los parámetros determinados.



**Figura 1 :** 2,6-dimetil-3,5-diisopropil-4-(orto-, meta-, para-)nitroaril-dihidropiridina

A partir de la información que se obtenga en esta tesis, se podrá contribuir al conocimiento de las 1,4-DHP en cuanto a las variaciones estructurales introducidas en posición 4 del anillo dihidropiridínico y su efecto en las características de oxidación y por lo tanto, en su potencial efecto antioxidante reflejado en la interacción directa con el anión superóxido.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar electroquímicamente el comportamiento anódico de las 1,4-dihidropiridinas con especial énfasis en el estudio del efecto de la posición que presenta el grupo nitro respecto del anillo 1,4-DHP (orto, meta y para) sobre la oxidación del anillo 1,4-dihidropiridínico y las interacciones de éste anillo con el radical superóxido.

## 4.2 Objetivos Específicos

1. Dilucidación del comportamiento electroquímico anódico de cada 1,4-DHP en dos medios de reacción, prótico y aprótico ( $n^{\circ}$  de electrones y protones involucrados, reversibilidad, tipo de proceso, etc.).
2. Obtención de información acerca de la química de solución de cada 1,4-DHP: equilibrios ácido-base,  $pK_a$ , zonas óptimas de pH para respuesta máxima de corriente y efecto del solvente.
3. Evaluación de reactividad de las 1,4-DHP con el radical superóxido.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Compuestos en estudio

Estos compuestos fueron sintetizados previamente en el laboratorio de Bioelectroquímica (Santander et al, 2003)

Peso molecular: 404 g/mol

Nomenclatura: 2,6 – dimetil – 3,5 – diisopropil – 4 – (o, m, p – nitroaril) dihidropiridina

#### 5.1.2 Reactivos

(a) Soluciones tampón:

(a).1 Tampón Britton-Robinson 0.1 M. Preparado a partir de una solución de ácido bórico 0.1 M, ácido acético 0.1 M y ácido fosfórico 0.1 M, enrasando a un volumen de 1 L con agua destilada.

(a).2 Tampón Fosfato 0.05M pH 3. Preparado a partir de fosfato ácido disódico dihidratado, del que se pesaron 7.0978 g y se disolvieron en agua purificada tipo Milli-Q, completando un volumen de 1 L. El pH fue ajustado con ácido fosfórico.

(b) Solventes:

Agua Milli-Q

Etanol absoluto p.a., Merck

Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a., Merck

Dimetilformamida (DMF) p.a., Merck

Otros reactivos:

Ácido clorhídrico (36%) p.a., Equilab

Perclorato tetra butil amonio (PTBA), p.a., Fluka

Superóxido de potasio ( $\text{KO}_2$ ) p.a., Sigma

Hidróxido de sodio (NaOH), p.a., Merck

(c) Reactivos para limpieza de electrodos:

(c).1 Suspensión de Alúmina. Se preparan dos suspensiones de Alúmina sobre un paño, una de 0.3 micras y otra de 0.05 micras a partir de Buehler USA. En cada una de éstas se frotó el electrodo para limpiar su superficie.

### 5.1.3 Material de vidrio:

Todo el material de vidrio volumétrico utilizado fue clase A.

- Pipetas aforadas de 5-10 mL, marca Brand
- Probetas graduadas de 20-50 mL
- Vaso de pp de 100-250-500 mL, marca Rasotherm
- Vaguetas

**5.1.4 Micropipetas: Labopette, Hirschschmann Labogerate, de volumen variable entre 50 y 1000  $\mu$ L**

**5.1.5 Jeringa de inyección para HPLC: Hamilton 810650 de 100  $\mu$ L. Hamilton Co. Reno.Nov**

**5.1.6 Electrodo de trabajo:**

- Electrodo de carbón vítreo BAS modelo MF 2052, diámetro 6 mm y largo 7.5 cm.
- Electrodo de carbón vítreo RDE MF 2066 de diámetro 6 mm y largo 2.5 cm.

**5.1.7 Celda Voltamétrica.**

Celda de medición BAS MR-1208 (5-15 mL), equipada con un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, un electrodo de platino como electrodo auxiliar (BAS-1032 [7.5 cm] ) y un electrodo modelo BAS-5B (Ag/AgCl) de 7.5 cm de largo y 6 mm de diámetro como electrodo de referencia para el estudio voltamétrico.

Celda de medición BAS RDE MR-3760 (20-50 mL), equipada con los mismos electrodos antes mencionados, con diferencia solo en el tamaño del electrodo de carbón vítreo, el cual es de un diámetro de 6 mm y largo 2.5 cm, para el estudio sobre disco rotatorio.

### **5.1.8 Equipos de uso general**

- A. Balanza analítica de precisión, Precisa 40SM-200, sensibilidad 0.01mg.
- B. Baño de ultrasonido, Branson 2210.
- C. Agitador magnético, Heidolph MR 3002.
- D. Medidores de pH
  - Microprocessor pH meter WTW pH 537
- E. Sistema voltamétrico
  - Equipo electroquímico BAS CV-50W acoplado a un computador GATEWAY 2000 con procesador pentium (P5-133).
  - Equipo electroquímico BAS 100B acoplado a un computador GATEWAY con procesador celeron (win 98).
- F. Sistema espectrofotómetro compuesto por:
  - Espectrofotómetro UV-Visible ATI Unicam UV3 acoplado a un computador DTKComputer 486, con programa de adquisición y tratamiento de datos Vision, versión 2.11
- G. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia compuesto por:
  - Bomba: Waters 600 Controller Millipore.

- Detector de pulso electroquímico: Waters 464 Pulsed Electrochemical Detector Millipore 464000539.
- Detector con arreglos de fotodiodos: Waters 996 Photodiode Array Detector Model, con conexión en línea con computador pentium II, con programa de adquisición y tratamiento de datos Millenium, versión 2.1 software.

H. Sistema Milli-Q, para la obtención de agua ultra pura.

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Preparación de soluciones:**

- Solución Buffer

Solución buffer Britton-Robinson 0.1 M

Preparada con 6.7 mL de ácido fosfórico 0.1 M, 5.7 mL de ácido acético 0.1 M y 6.1833 g de ácido bórico 0.1 M enrasando a un volumen de 1 litro con agua destilada, obteniéndose un tampón 0.1 M.

- Para realizar el estudio electroquímico de las 1,4-dihidropiridinas, se usaron los siguientes medios de trabajo:

#### a) Medio prótico:

- Para voltametría de pulso diferencial se utilizó una mezcla Britton-Robinson/EtOH (70/30), pesándose la cantidad necesaria de DHPs para obtener una concentración de 0.1 mM. Para ello se pesaron aproximadamente 0.004 g de



cada DHP y se solubilizaron en 10 mL de etanol. Luego de ésta solución se tomó 1 mL, se le agregaron 2 mL de etanol y se completo hasta un volumen final de 10 mL con tampón Britton-Robinson.

- Para voltametría cíclica se utilizó una mezcla Britton-Robinson/EtOH (60/40) y se pesó la cantidad necesaria de DHPs para obtener una concentración de 1 mM. Para ello se pesaron aproximadamente 0.004 g de cada una de las DHP y se solubilizaron con 4 mL de etanol para luego completar hasta un volumen final de 10 mL con tampón Britton-Robinson.

- Para voltametría sobre electrodo de disco rotatorio se utilizó una mezcla Britton-Robinson/EtOH (70/30) y se pesó la cantidad necesaria de DHPs para obtener una concentración de 0.1 mM, para lo cual se pesaron aproximadamente 0.001 g de cada DHP y se solubilizaron en 7.5 mL de etanol para luego completar hasta un volumen final de 25 mL con tampón Britton-Robinson.

b) Medio aprótico:

100% DMF + 0.342 g de PTBA 0.1 M: Se pesaron aproximadamente 0.004 g de cada una de las DHP y se les transfirió a un matraz aforado de 10 mL, se agregaron los 0.342 g de PTBA como electrolito de soporte enrasando con DMF.

### **5.2.2. Estudios voltamétricos**

a) Estudio de estabilidad:

A cada compuesto en estudio se determinó su estabilidad en el tiempo. Los experimentos se realizaron a pH 3, pH 7 y pH 11, en presencia de luz y a temperatura ambiente, registrándose voltamogramas cada 30 minutos. El barrido de potencial abarcó un rango variable entre 0 mV y 1400 mV.

b) Estudio de la influencia de pH:

A cada compuesto en estudio se le determinó su comportamiento electroquímico en el rango de pH 2-12. Se utilizó para ello la técnica de voltametría de pulso diferencial, empleando un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo. El barrido de potencial abarcó un rango variable entre 0 mV y 1400 mV.

Se prepararon diluciones de 0.1 mM, en 30% etanol y 70% tampón Britton-Robinson 0.1 M (10 mL) para cada dihidropiridina.

Para el estudio de la influencia de pH, se procedió a incrementarlo en 0.5 unidades a partir de un valor de 2.0 hasta un valor final de 12.0, utilizando para ello soluciones de NaOH. Después de cada medición, la superficie del electrodo se limpió con agua y se pulió utilizando suspensiones de alúmina.

c) Estudio de la influencia de la velocidad de rotación:

Por voltametría lineal se realizó el estudio de la influencia de la velocidad de rotación sobre la corriente límite, empleando el electrodo de disco rotatorio. Se trabajó

con soluciones de concentración 0.1 mM, 30% de etanol y 70% con tampón Britton-Robinson, que se obtuvo al enrasar con éste último a 10 mL, a pH 3, pH 7 y pH 10.

Para el estudio de la influencia de la velocidad de rotación, se procedió a incrementarla en 200 unidades, a partir de un valor inicial de 0 rpm hasta un valor de 1000 rpm, y a partir de ahí se incrementó en 500 unidades hasta un valor final de 10000 rpm.

#### Cálculo del Coeficiente de Difusión (D)

De acuerdo a la teoría para electrodo rotatorio, la corriente límite para procesos controlados por difusión (D) se rige por la siguiente ecuación (Gileadi E., 1993):

$$i_{lim} = 0,62 \cdot n \cdot F \cdot D^{2/3} \cdot v^{1/6} \cdot \omega^{1/2} \cdot C^0 \quad \text{Ec.1}$$

haciendo,

$$B = 0,62 \cdot n \cdot F \cdot D^{2/3} \cdot v^{1/6} \cdot C^0 \quad \text{Ec.2}$$

se tiene:

$$i_{lim} = B \cdot v^{-1/2} \quad \text{Ec.3}$$

$i_{lim}$  = corriente límite

$\omega$  = velocidad de rotación =  $n^0$  de electrones transferidos

F = constante de Faraday

D = coeficiente de difusión

V = viscosidad cinemática =  $0.01 \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$

C = concentración

B = pendiente

d) Estudio por voltametría cíclica:

Para cada uno de los compuestos se realizó estudios en medio prótico, utilizando como medio una mezcla de tampón Britton-Robinson/etanol (60:40) a pH 3, pH 7 y pH 11. Para el medio aprótico se utilizó perclorato de tetra butil amonio como electrolito soporte. Todas las soluciones fueron preparadas a una concentración de 1mM.

Las soluciones se transfirieron a una celda voltamétrica, utilizando como electrodo de trabajo el electrodo de carbón vítreo, variando la velocidad de barrido entre 0.05 V/s y 1 V/s.

Test diagnóstico para un proceso irreversible

- 1.- No existe pico de vuelta.
- 2.-  $E_p$  es función de la velocidad
- 3.- Gráfico  $I_p$  v/s  $v^{1/2}$  es lineal
- 4.- Gráfico  $I_p$  v/s C es lineal

Cálculo de coeficiente de transferencia (a) (Glosser D., 1994)

$$a = 1.857 \cdot RT / n_a \cdot (E_p - E_{p/2}) \cdot F$$

Sabiendo que:  $2.303 \cdot RT / F = 0.059$

$n_a$ : electrones transferidos en la etapa determinante, es decir, 1

### 5.2.3 Estudio espectrofotométrico

- Estudio de pH:

Se prepararon diluciones de cada compuesto a una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M, en 30% de etanol y tampón Britton-Robinson 0.1 M (10 mL). El estudio se realizó a tres pHs distintos: 3.0; 7.0 y 11.0. Se abarcó un rango de longitud de onda entre 200 y 500 nm. El blanco empleado fue etanol 30% y tampón Britton-Robinson 0.1 M 70% (10 mL).

### 5.2.4 Estudio por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para cada compuesto estudiado se prepararon soluciones de concentración 0.1 mM.

Se ensayaron distintas proporciones de la fase móvil metanol/tampón fosfato 0.05 M pH 3, hasta llegar a obtener la proporción más apropiada para

las compuestos estudiados, que resultó ser 65/35, siendo las condiciones optimas de trabajo.

Se realizaron mediciones al inicio del experimento y a lo largo de 120 minutos, registrándose los cromatogramas UV ( $\lambda=268\text{nm}$ ) y EQ ( $E=1200\text{mV}$ ) cada 30 minutos.

### **5.2.5 Estudio de la reactividad de las 1,4-DHP con el radical superóxido**

Para el estudio de la reactividad de cada compuesto con el radical superóxido se utilizó la técnica de voltametría de pulso diferencial, empleando un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo. Para ello se hicieron dos o tres experimentos a cada dihidropiridina.

Preparación de la solución de superóxido

a) A cada solución de dihidropiridina de concentración 0.1 mM en DMSO, PTBA 0.1 M, se le fueron agregando diferentes concentraciones de superóxido y se fue registrando un voltamograma cada vez que se agregó el superóxido. Se pesaron 0.035g de  $\text{KO}_2$  y 0.3g de eter corona, lo que nos da una concentración de 0.1 M de superóxido. Luego a los 10 mL de cada DHP se fueron agregando cantidades de superóxido de manera de ir aumentando su concentración. Se

registraron voltamogramas en un rango de concentración de superóxido que fue desde 0 hasta  $5 \times 10^{-3}$  M

b) En el siguiente experimento se utilizó una solución de superóxido 3 mM a la cual se le fueron agregando diferentes concentraciones de cada DHP.

Se parte con una solución de superóxido de 10 mL a la que se le agregan cantidades de DHP de manera de ir aumentando su concentración. Se registraron voltamogramas en un rango de concentración de cada DHP que fue desde 0 hasta 1 mM. Se pesaron 0.2 g de cada DHP y se utilizó 0.3 g de PTBA como electrolito de soporte.

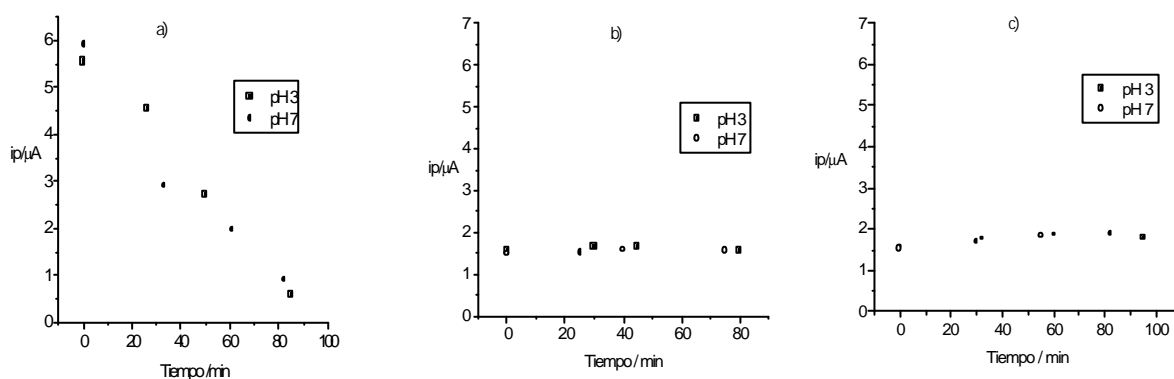
c) También se estudiaron soluciones de superóxido en DMSO, PTBA 0.1M a diferentes tiempos luego de ser electrogenerado, para lo cual se utilizaron 0.03 g de superóxido, 0.3 g de eter corona y 0.3 g de PTBA, y se registraron voltamogramas en un rango de tiempo desde 0 a 30 minutos cada 10 minutos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Oxidación en Medio Prótico (Tampón Britton-Robinson/Etanol 70:30)

#### 6.1.1. Estudios de Estabilidad

Con el objeto de establecer la estabilidad de los compuestos en Medio Prótico, se utilizó Voltametría de Pulso Diferencial. Los experimentos se realizaron a pH 3, pH 7 y pH 11 para cada una de las dihidropiridinas, en presencia de luz, a temperatura ambiente y registrándose voltamogramas cada 30 minutos, durante dos horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2:



**Figura 2** Evolución de la corriente de pico anódica en función del tiempo para los derivados a) *orto*, b) *meta* y c) *para*, en tampón Britton-Robinson/etanol (70:30). Técnica: Voltametría de Pulso Diferencial; Concentración de 1,4-DHP 0.1mM.

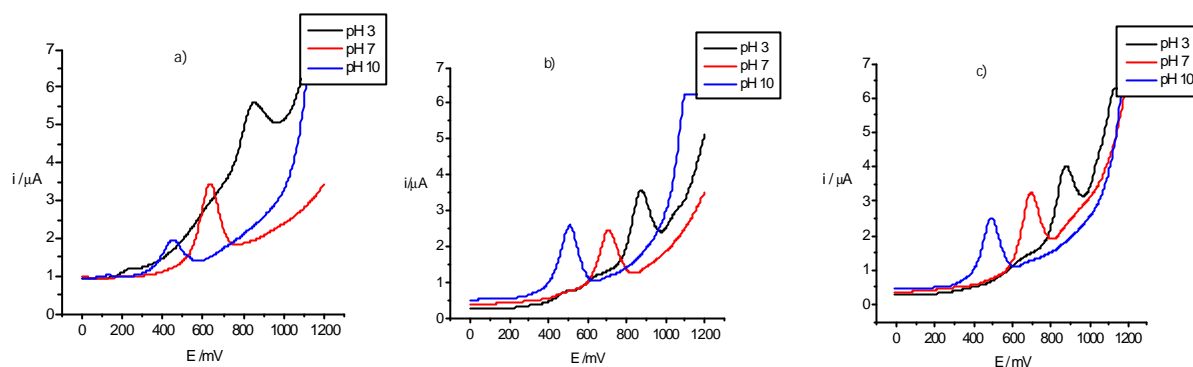


Tal como observa en la figura 2, los derivados para-Nitro-DHP y meta-Nitro-DHP no se degradan en el tiempo. En contraste, el derivado orto-Nitro-DHP en todos los pHs estudiados la solución es inestable. Sobre la base de estos resultados, se decidió que para el derivado orto-Nitro-DHP no se trabajaría más allá de 10 minutos con la solución, para lo cual cada 1 unidad de pH se preparó una nueva solución (en el estudio de pH), además se protegió la solución de la luz y se conservó en hielo entre cada medición.

#### **6.1.2. Caracterización voltamétrica de las 1,4-dihidropiridinas**

Todas las 1,4-DHP fueron estudiadas en solución tampón Britton-Robinson 0.1M : etanol (70:30); a una concentración de 0.1 mM, empleando electrodo de carbón vítreo, con la técnica de Voltametría de Pulso Diferencial. En primer término se efectuó un estudio sobre la influencia del pH en la oxidación de los tres derivados. Los compuestos mostraron una respuesta voltamétrica bien definida, observándose sólo una señal anódica en el rango de potencial entre 400 y 1200 mV.

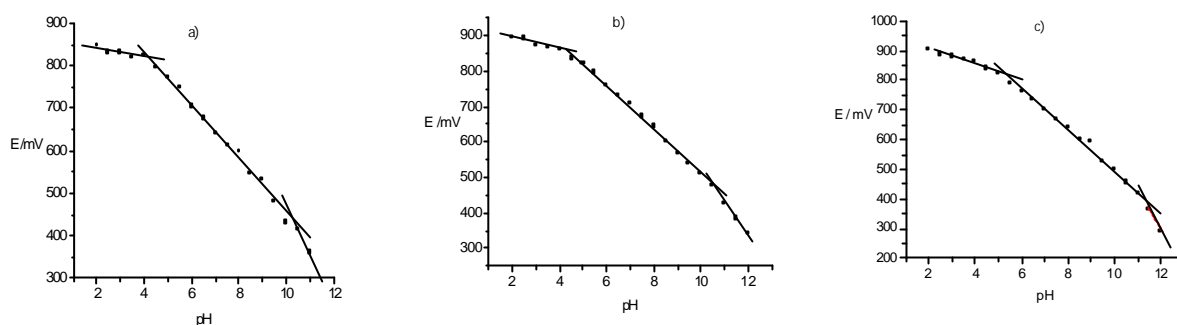
En la figura 3 se muestran los voltamogramas de los tres derivados a 3 pHs distintos, apreciándose por un lado picos bien definidos los que a medida que aumenta el pH, sufren un desplazamiento hacia potenciales menores. Esto permite deducir que en medio alcalino estos productos son más fáciles de oxidar.



**Figura 3: Dependencia del potencial con el pH para los compuestos a) *ortho*, b) *meta* y c) *para*. Voltametría de Pulso Diferencial en Medio prótico. Concentración 0.1 mM**

Para más detalle, en la figura 4 se encuentran representados el potencial de pico con respecto del pH para cada DHP, pudiendo apreciarse que todas presentan tres tramos de dependencia lineal en el rango de pH estudiado (2-12) por lo tanto se observan 2 puntos de quiebre. Estos puntos de quiebre, alrededor del pH 4-5 y pH 10-12, indicarían cambios en el mecanismo del proceso electrodo, inducidos por cambios en la especie electroactiva con el pH del medio. Por otro lado, el último quiebre podría deberse a un pKa voltamétrico correspondiente al nitrógeno dihidropiridínico.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros que caracterizan los tramos lineales, con los respectivos puntos de quiebre para los 3 compuestos.



**Figura 4:** Comportamiento del potencial de pico en función del pH para los compuestos a) *orto*, b) *meta* y c) *para*; Medio Prótico; Concentración 0.1mM

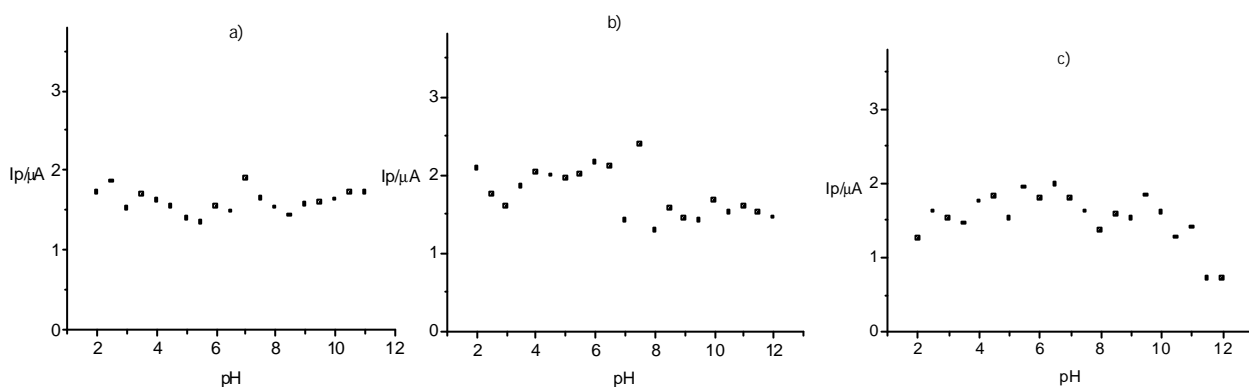
**Tabla 1: Dependencia entre el potencial de pico y el pH**

	TRAMO	ORTO	META	PARA
Pendientes (mV/pH)	1 <sup>er</sup>	-12.0	-19.2	-25.1
	2 <sup>o</sup>	-63.7	-61.8	-67.9
	3 <sup>er</sup>	-112.0	-88.0	-144.0
pH de quiebre I		4	4	5
pH de quiebre II		10.5	10.5	11

En relación al comportamiento de la corriente de pico con el pH, como se muestra en la figura 5, para el isómero *orto* los valores de las corrientes de pico se mantienen independientes. Para el isómero *meta* se observa una zona en que la corriente es independiente del pH (pH2-pH7), para luego disminuir con el incremento de pH ( 2 zonas independientes del pH, pero una con una menor corriente). Por último, para el isómero *para* se observa que los valores de las corrientes de pico se mantienen

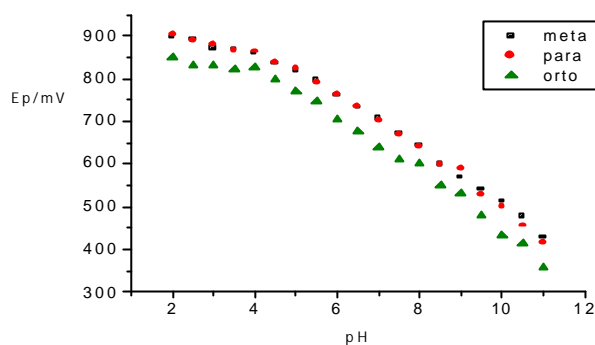
prácticamente independientes de los cambios de pH, situación que cambia sobre pH 11, en donde se observó una disminución de las corrientes (pH 11-pH 12).

El único patrón de comportamiento observable, es la independencia de la corriente con el pH en medio ácido, lo que hace pensar que la corriente límite es controlada por la difusión de la especie electroactiva a la superficie del electrodo (Skoog D. et al., 1989)



**Figura 5:** Dependencia de la corriente límite en función del pH para los tres isómeros a) *orto*, b) *meta* y c) *para*; Voltametría de Pulso Diferencial; Concentración 0.1 mM

En la figura 6 se muestra una comparación de los potenciales de oxidación de los 3 compuestos, donde se puede apreciar que el isómero *orto* es el que se oxida con mayor facilidad, no habiendo en todo el rango de pH estudiado una diferencia en cuanto a la oxidación para los isómeros *meta* y *para*.

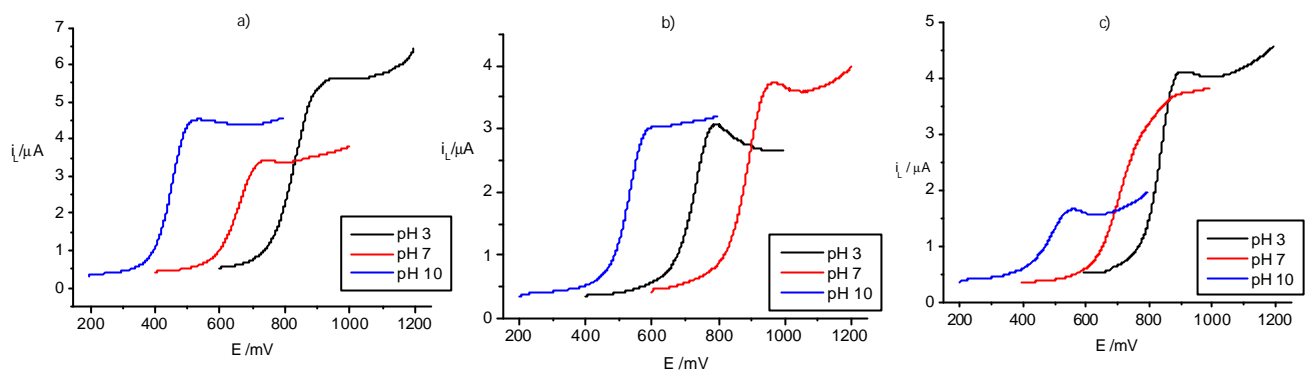


**Figura 6: Potencial de pico con respecto al pH de los tres isómeros; Voltametría de Pulso Diferencial; Concentración 0.1mM**

### **6.1.3. Caracterización por Voltametría de Barrido Lineal sobre electrodo de disco rotatorio**

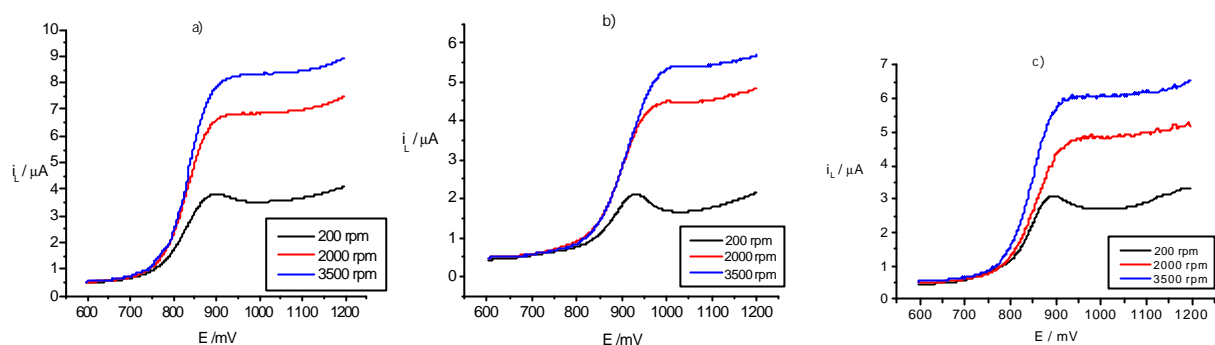
Por Voltametría lineal se realizó el estudio de la influencia de la velocidad de rotación sobre la corriente límite, empleando un electrodo de disco rotatorio. Se trabajó con soluciones de concentración 0.1 mM a pHs 3.0, 7.0 y 10.0.

En la figura 7 observamos los voltamogramas sobre electrodo de disco rotatorio para cada una de las dihidropiridinas, a una velocidad de rotación fija de 1000 rpm. Como se observa en éstas figuras todos los compuestos producen una sola onda, la cual está afectada por un máximo, que se debería a un fenómeno de adsorción que se experimenta en la superficie del electrodo.



**Figura 7:** Evolución de la onda voltamétrica con el pH para los compuestos a) *orto*, b) *meta* y c) *para*, a velocidad de rotación fija (1000rpm), empleando voltametría de barrido lineal sobre electrodo de disco rotatorio.

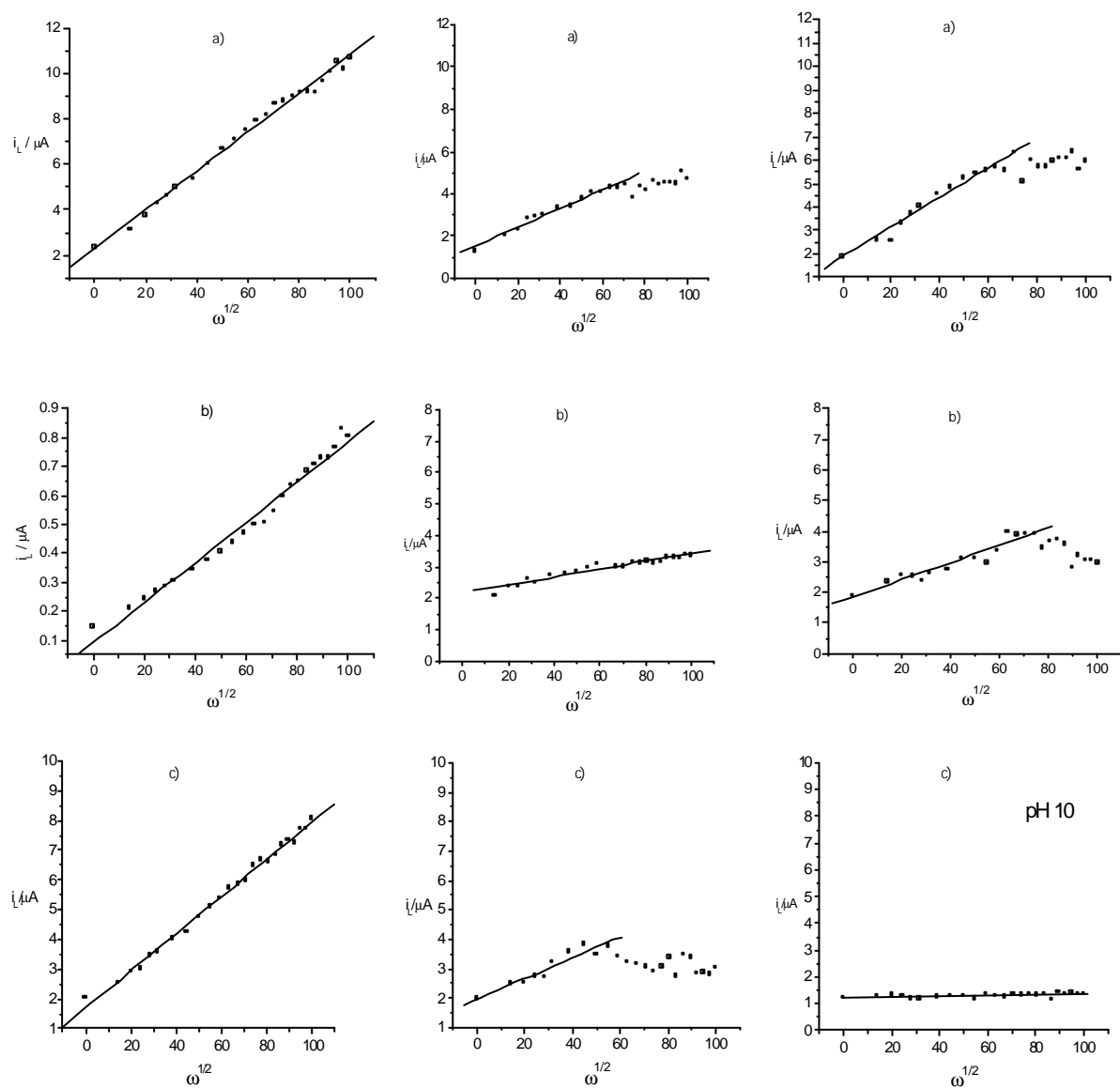
Posteriormente se procedió a realizar un estudio voltamétrico empleando electrodo de disco rotatorio, a distintas velocidades de rotación, entre 200 y 10000 rpm. En la figura 8, a pH 3, se puede observar que al aumentar la velocidad de rotación el máximo de adsorción desaparece, favoreciéndose el proceso de difusión a la superficie del electrodo. Además, se ve que al aumentar la velocidad de rotación, aumenta la corriente límite. Esto se debe a que el espesor de la capa de difusión disminuye, debido a que se están integrando más especies a la superficie del electrodo, por un aporte de masa debido a la convección. (Gileadi E., et al., 1993)



**Figura 8: Disminución del máximo voltamétrico con el aumento de la velocidad de rotación para los compuestos a) orto, b) meta y c) para; Concentración 0.1mM; Medio Prótico; pH 3**

De acuerdo a la teoría para electrodo rotatorio, la corriente límite para procesos controlados por difusión ( $D$ ) se rige por una ecuación 1 (ver métodos). Por lo tanto si el proceso es controlado por difusión, debe obtenerse una relación lineal entre  $i_L$  vs  $\omega^{1/2}$  (figura 9). A pHs 7.0 y 10.0 se observa alguna desviación al comportamiento lineal, lo que puede deberse a la pérdida de control difusional por interferencia de adsorción. Además a partir de las pendientes de estos gráficos es posible calcular el coeficiente de difusión de la molécula

En la Tabla 2 se presentan los valores de coeficientes de difusión calculados para cada dihidropiridina a pH 3, 7 y 10, siendo los valores obtenidos a pH 3 los mas altos.



**Figura 9:** Dependencia de la corriente límite de los derivados a) *orto*, b) *meta*, y c) *para* con la velocidad de rotación ( $\omega$ ) a distintos pHs



**Tabla 2: Coeficiente de Difusión obtenido en medio prótico para cada una de las 1,4-dihidropiridinas.**

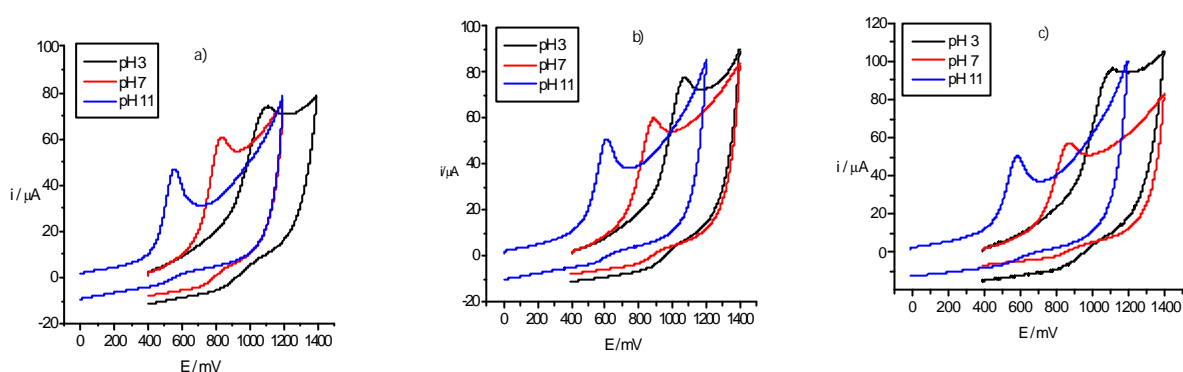
Dihidropiridina	Coef. De Difusión (D) cm <sup>2</sup> .seg <sup>-1</sup>		
	pH 3	pH 7	pH 10
<i>orto</i>	1.99 x10 <sup>-6</sup>	1.02 x10 <sup>-6</sup>	1.47 x10 <sup>-6</sup>
<i>meta</i>	1.27 x10 <sup>-6</sup>	0.23 x10 <sup>-6</sup>	0.51 x10 <sup>-6</sup>
<i>para</i>	1.26 x10 <sup>-6</sup>	0.71 x10 <sup>-6</sup>	–

#### **6.1.4. Caracterización por Voltametría Cíclica en Medio Prótico de las 1,4-Dihidropiridinas**

Para lograr un mejor conocimiento del proceso electródico, especialmente para apreciar el grado de reversibilidad de éste, se procedió a realizar experimentos por la técnica de Voltametría Cíclica.

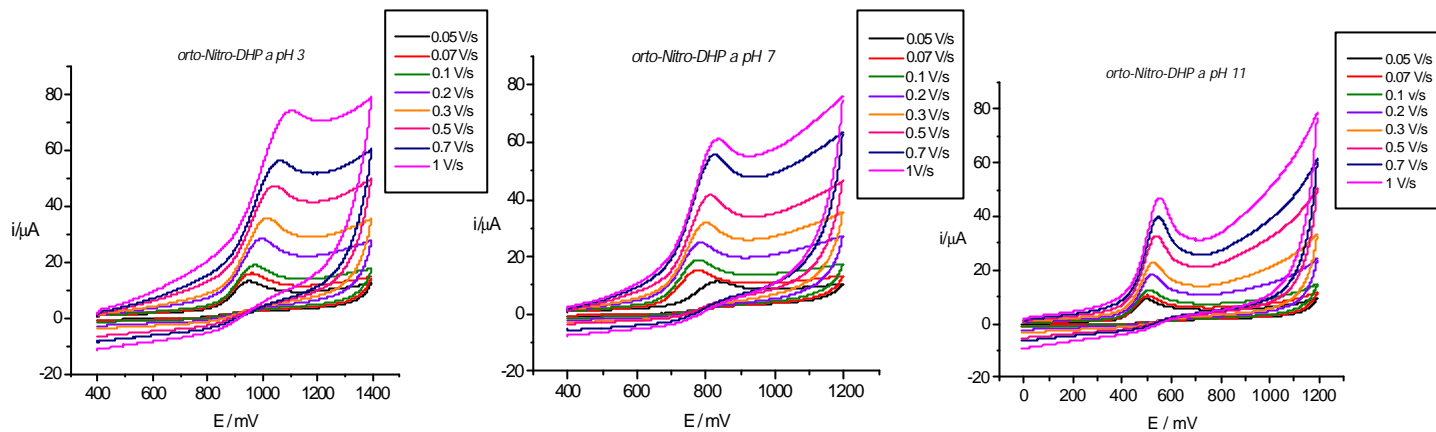
Como medio prótico se utilizó la mezcla Britton-Robinson/EtOH (60:40) y soluciones de concentración 1mM. Se utilizó electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, velocidades de barrido en un rango de 50 mV/s a 1000 mV/s y además cambiando el pH (3.0, 7.0 y 11.0) en un rango de potencial variable entre 0 y 1400 mV.

Como resultado se obtuvo en todos los casos un pico anódico irreversible, dando cuenta de un proceso en donde sólo ocurre una oxidación (Figura 10). También se puede apreciar que la mejor resolución se obtuvo a valores de pH más básicos. Se observa también que junto con la disminución del pH, los voltamogramas experimentan un desplazamiento hacia valores más anódicos, lo cual indica que la oxidación se ve favorecida a pH más alcalinos.

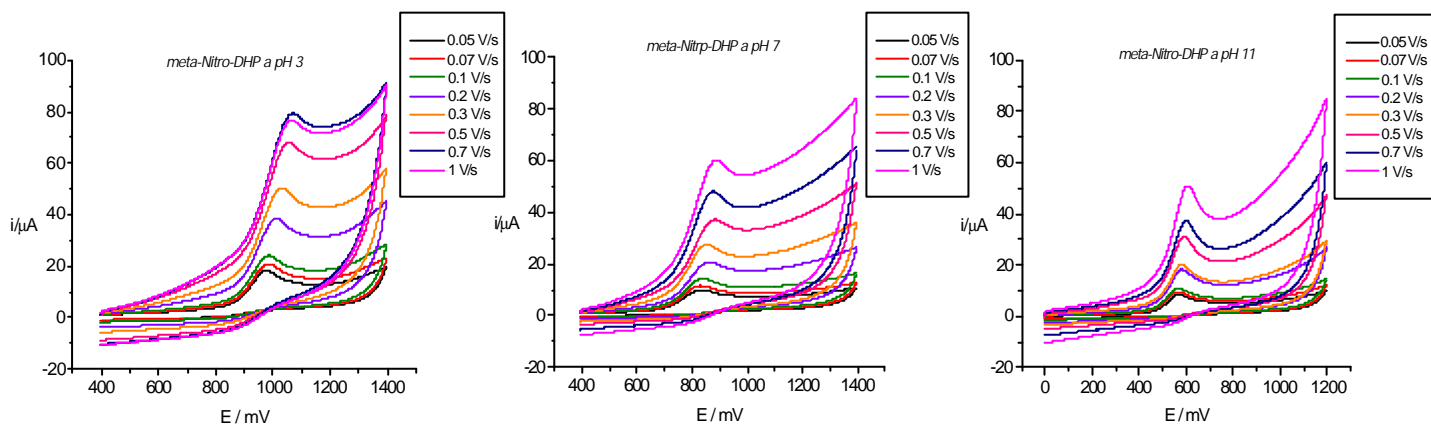


**Figura 10:** Efecto del pH sobre los voltamogramas cíclicos para los isómeros a) *orto*, b) *meta* y c) *para*, concentración 1mM, velocidad de barrido 1V/s .

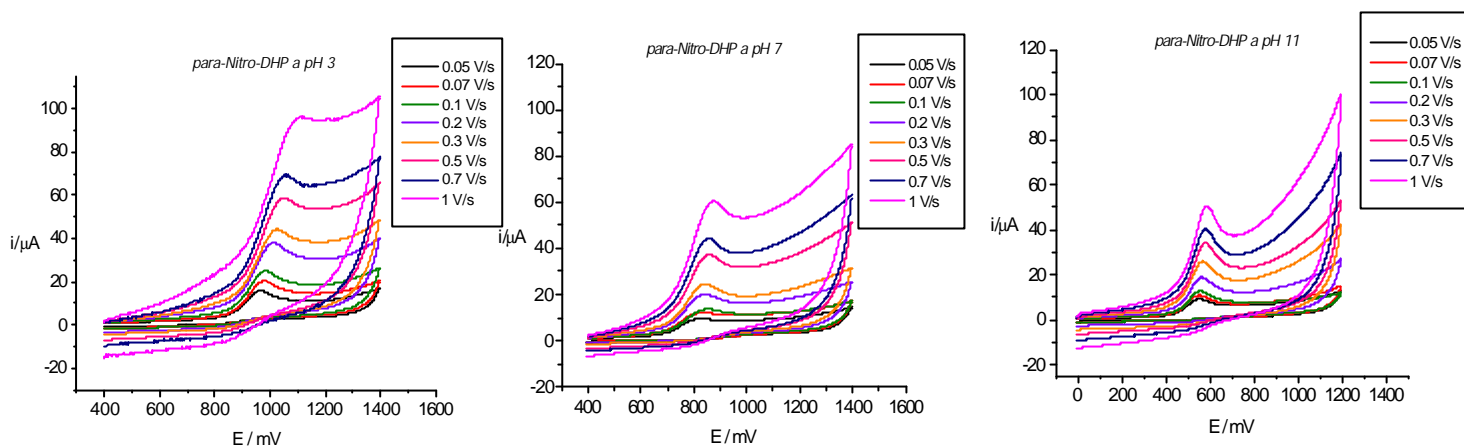
Las figura 11, 12 y 13 muestran los voltamogramas para cada uno de los compuestos a distintas velocidades de barrido. Como se observa, todos los compuestos mostraron un comportamiento irreversible en la escala de tiempo del experimento voltamétrico. Lo anterior se puede concluir de la no aparición de un pico catódico y de la variación del potencial de pico con la velocidad de barrido.



**Figura 11: Voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido para el derivado orto-Nitro-DHP, Medio Prótico a distintos pHs; concentración 1mM.**

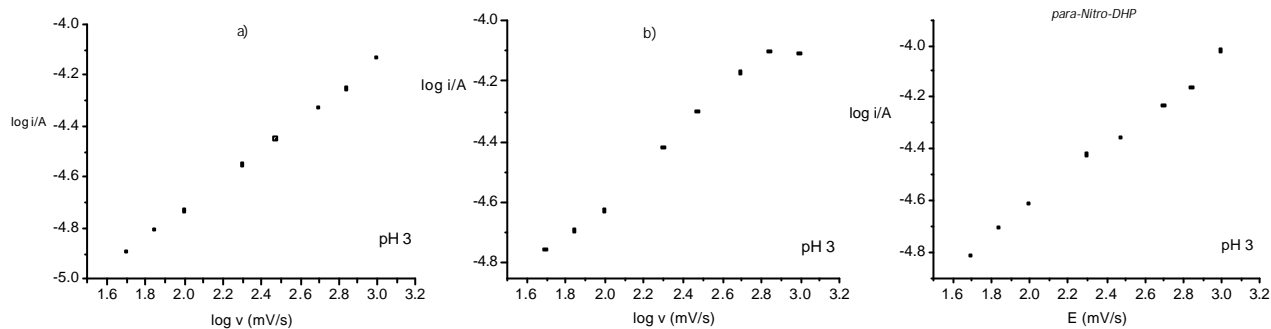


**Figura 12: Voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido para la forma meta-Nitro-DHP, Medio Prótico; concentración 1mM.**



**Figura 13:** Voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido para la forma para-Nitro-DHP, Medio Prótico; concentración 1mM.

Analizando el comportamiento entre la corriente y la velocidad de barrido a través del gráfico  $\log i_p$  vs  $\log v$  (figura 14), se puede determinar si el proceso electroquímico es controlado netamente por difusión de la especie electroactiva o si existen procesos de adsorción presentes. Es así que si el comportamiento es de tipo difusivo la pendiente del gráfico será cercana 0.5 o bien, si existe un predominio de la adsorción, la pendiente será cercana a 1. También a través de este análisis se puede calcular el coeficiente de transferencia (Glosser D., 1994) (ver Material y Métodos), el cual junto a las pendientes respectivas se muestra en la tabla 3.



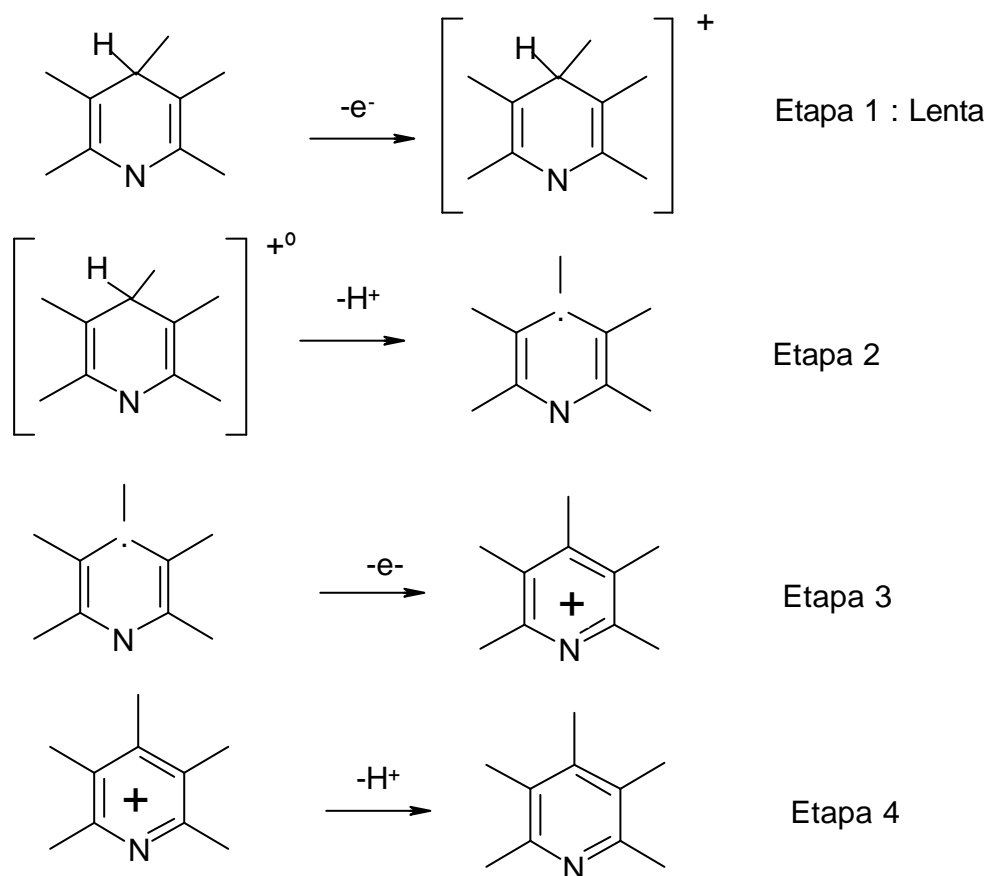
**Figura 14:** Dependencia del log  $I_p$  con respecto a la velocidad de barrido para los isómeros a) orto, b) meta y c) para; Concentración 1mM; Medio Prótico

**Tabla 3:** Cálculo del coeficiente de transferencia y las pendientes.

COMPUESTO	PENDIENTE Log $I_p$ / log V	COEF. DE TRANSFERENCIA a
Orto-Nitro-DHP	0.58	0.36
Meta-Nitro-DHP	0.59	0.46
Para-Nitro-DHP	0.58	0.36

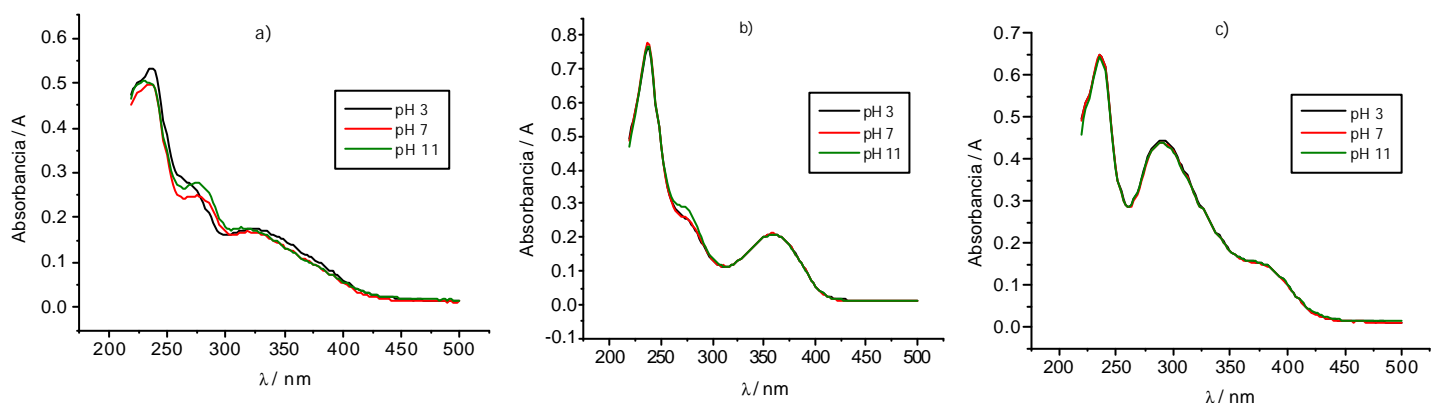
De acuerdo a estos resultados, se puede decir que en medio prótico todos los compuestos presentan mecanismos similares, dado que su coeficiente de transferencia es similar y que el control es difusivo.

Los resultados obtenidos en ésta tesis fueron comparados con otra serie homóloga estudiada en otra tesis anterior y perteneciente a la misma familia. De la comparación se concluye que el comportamiento electroquímico es similar, luego el proceso de oxidación planteado sería de la misma naturaleza (Carmona C., 1994; Ludvik L., et al., 1985) y estaría dado por el siguiente esquema, de acuerdo a lo planteado por Ludvik y colaboradores.



### 6.1.5. Caracterización espectrofotométrica UV-VIS

Con el objeto de obtener un mayor conocimiento de estos compuestos se procedió a realizar un estudio por espectrofotometría UV-VIS. Para ello se utilizaron soluciones a una concentración de  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  en tampón Britton Robinson/etanol (70:30) y la medición se llevó a cabo a tres pHs distintos: 3.0, 7.0 y 11.0. No se observaron cambios significativos en el espectro UV para ninguna de las dihidropiridinas, como se puede apreciar en la figura 15, y debido a esto no es posible determinar los pKa correspondientes, no pudiendo corroborar los puntos de quiebre obtenidos en el estudio electroquímico. De ello se deduce que estamos en presencia de un ácido débil cuyo valor de pKa podría ser cercano a 10, además, de acuerdo a la curva  $E_p$  vs pH coincide que para todos los compuestos en estudio existe un punto de quiebre alrededor de pH10, lo que corroboraría el pKa voltamétrico en esa zona.



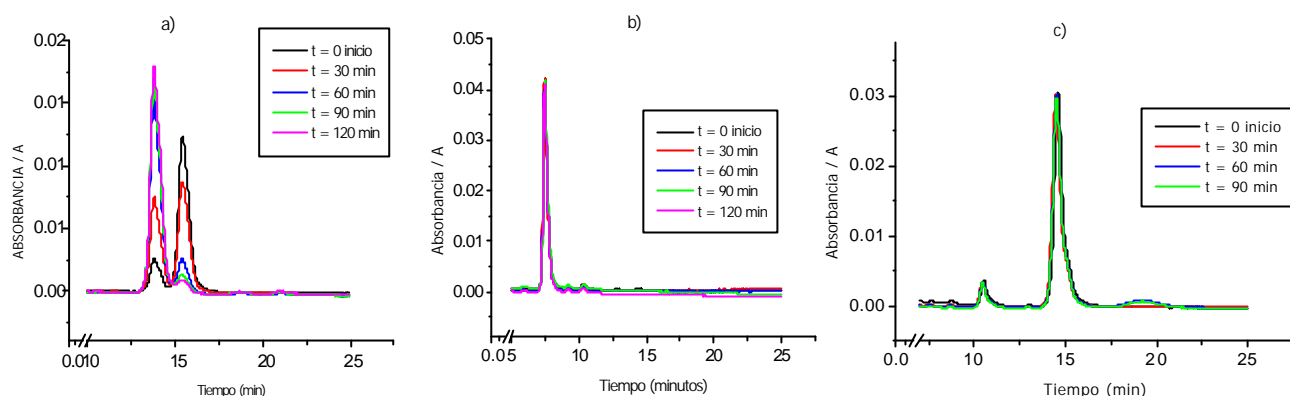
**Figura 15: Espectros UV de las formas a) orto, b) meta y c) para a tres pHs distintos; Concentración  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ; Electrolito soporte: Br/EtOH (70:30)**

#### **6.1.6. Caracterización por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)**

Para obtener un estudio más completo de los derivados 1,4-DHP, se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección UV a una longitud de onda de 268 nm y electroquímica en modo pulso con un potencial de 1200 mV, y se realizaron mediciones a diferentes tiempos en un rango de 0 a 120 minutos. La fase móvil consistió en una mezcla metanol/tampón fosfato 0.05 M (65:35) pH 3, con flujo de 1 mL/min, en soluciones de concentración 0.1 mM en tampón Britton-Robinson/etanol (70:30).

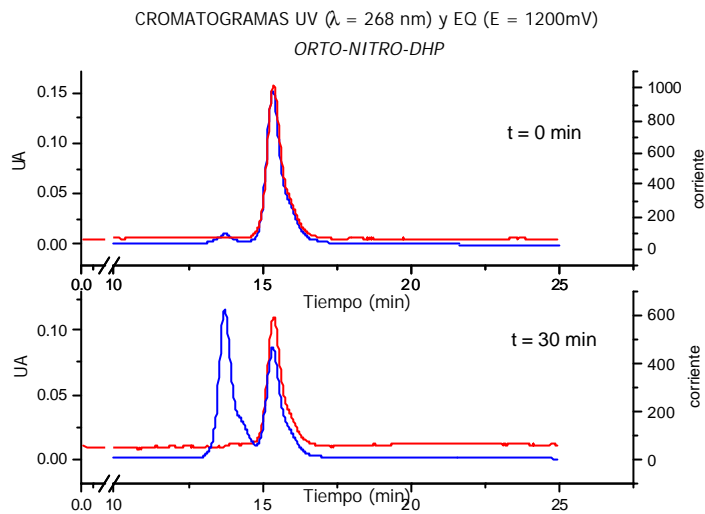
En la figura 16 se puede apreciar que para el compuesto orto-Nitro-DHP hay un cambio notorio entre el cromatograma obtenido desde una solución recién preparada, con los siguientes medidos a lo largo de 120 minutos. Se observa una desaparición notoria de la señal que tiene un tiempo de retención alrededor de los 15.5 min y la aparición de una nueva señal a tiempos más cortos (~ 14 min) lo que representa una clara descomposición de la molécula a un producto de degradación principal, tal y como había sido observado por voltametría de pulso diferencial. No ocurre lo mismo con los compuestos meta y para-Nitro-DHP, ya que la señal principal no presenta una variación significativa.



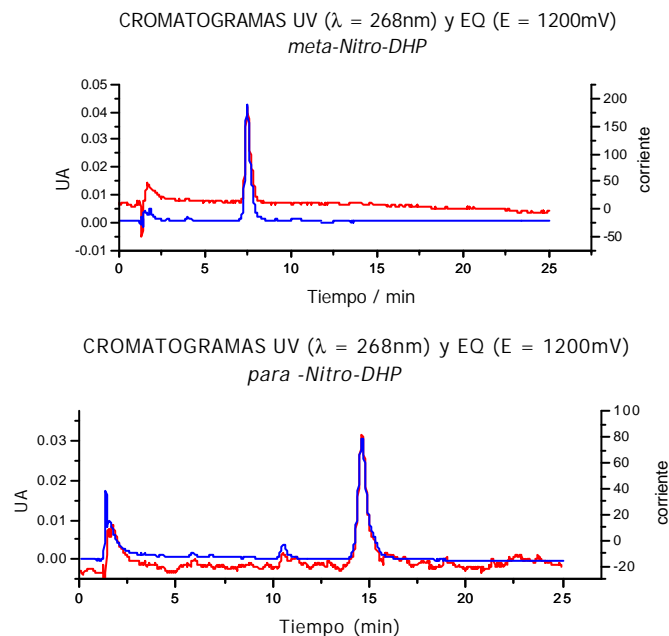


**Figuras 16: Evolución de los cromatogramas en el tiempo para las formas a) orto, b) meta y c) para; Concentración 0.1mM; Br:EtOH (70:30)**

El mismo experimento fue también evaluado utilizando un detector electroquímico a fin de conocer si la especie detectada poseía grupos electrooxidables, para lo cual se fijó un potencial de detección de 1200 mV. En la figura 17 se comparan los cromatogramas UV ( $\lambda=268\text{nm}$ ) y EQ ( $E=1200\text{mV}$ ) obtenidos de una solución del orto derivado recién preparada ( $t = 0$ ) y de esta misma solución 30 minutos después. En esta figura se puede apreciar como el compuesto recién preparado, es detectado tanto por su absorbancia como por su oxidación electroquímica, ya que posee el grupo dihidropiridínico intacto, pero a los 30 minutos, donde se aprecia claramente el producto de degradación a los 14 min, se observa que éste no presenta oxidación electroquímica por lo que no puede ser detectado con este sistema. Esto nos permite concluir que el producto de degradación a lo menos ha perdido el grupo DHP ya que no se presenta respuesta por oxidación. En el caso de los derivados meta y para, estos no se degradaron y son posibles de ser detectados por oxidación (Figura 18).

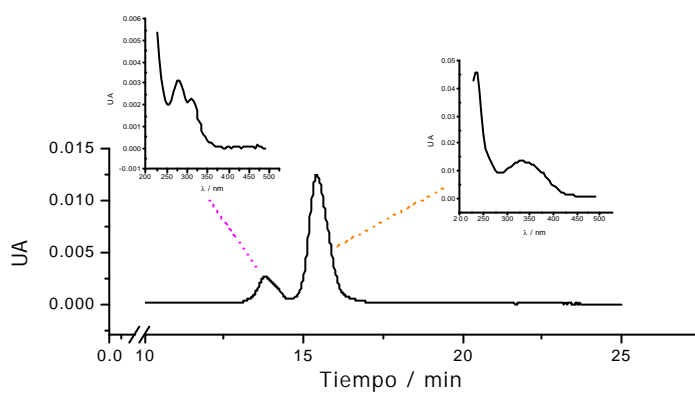


**Figura 17: Cromatogramas UV (azul) y electroquímica (rojo) para la forma orto-Nitro-DHP a distintos tiempos de preparada la solución; Concentración 0.1mM; Br:EtOH (70:30)**

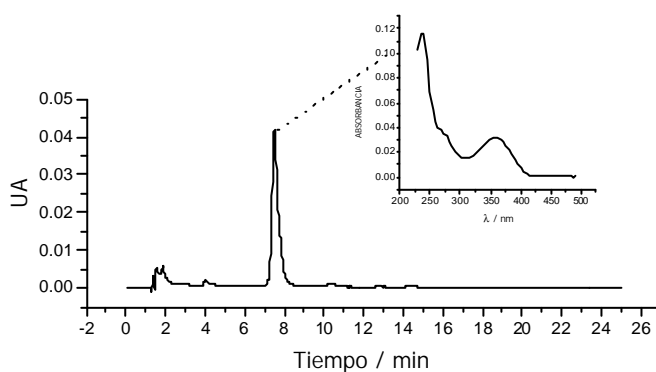


**Figura 18: Cromatogramas para las forma *meta* y *para*; Concentración 0.1mM; Br:EtOH (70:30)**

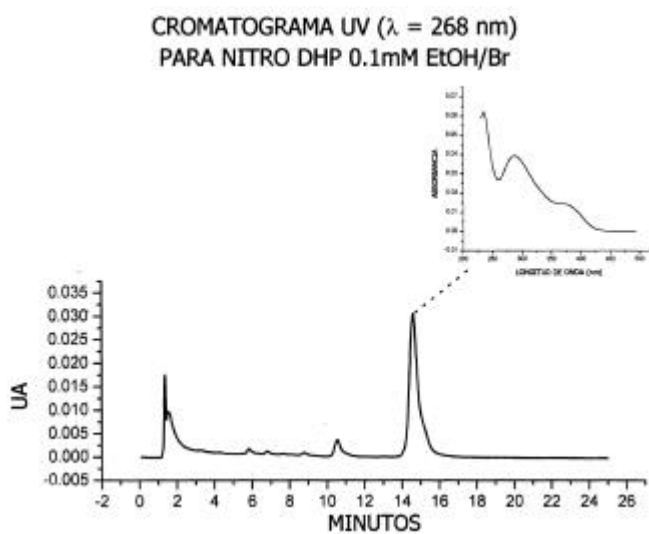
Por ultimo, en las figuras 19 a 21 se presentan los cromatograma UV ( $\lambda = 268\text{nm}$ ) de cada DHP mas el espectro de absorción de cada una de las señales observadas. Nuevamente es el orto-Nitro-DHP el de mayor interés ya que es el que presenta la aparición de 1 señal producto de su inestabilidad química. Para los compuestos meta y para-Nitro-DHP hay una sola señal de significancia con su respectivo espectro de absorción.



**Figura 19: Cromatograma UV con los respectivos espectros de cada señal para el derivado orto-Nitro-DHP; Concentración 0.1mM**



**Figura 20: Cromatograma UV con su respectivo espectro para el derivado meta-Nitro-DHP; Concentración 0.1mM**



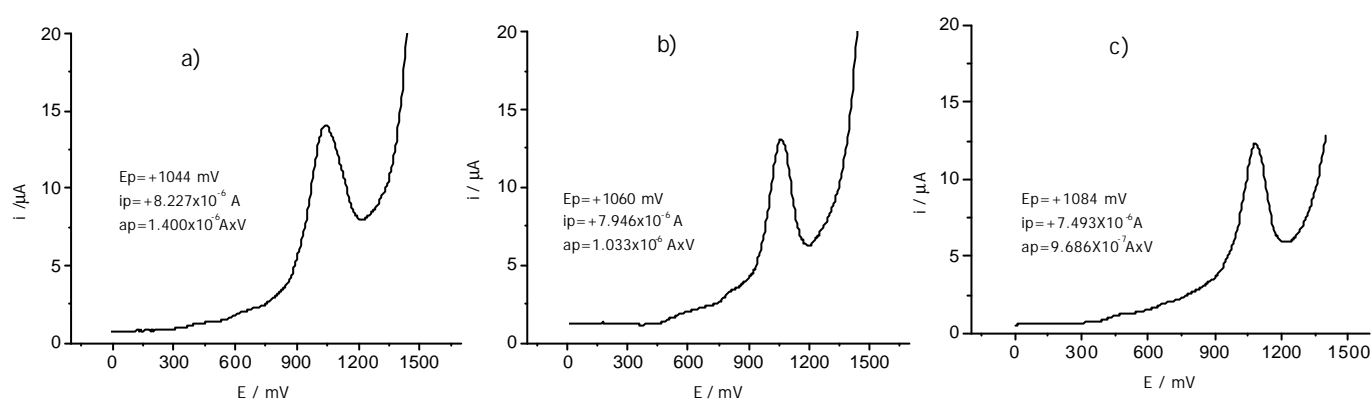
**Figura 21:** Cromatograma UV con su respectivo espectro para el derivado para-Nitro-DHP; Concentración 0.1mM; Br:EtOH (70:30)

## 6.2. Oxidación en Medio Aprótico

### 6.2.1. *Caracterización de la oxidación de las 1,4-Dihidropiridinas en Medio Aprótico por Voltametría de Pulso Diferencial*

Los experimentos en este medio fueron realizados empleando como solvente DMF, como electrolito de soporte perclorato de tetra butil amonio (PTBA) y cada DHP en una concentración de 1mM.

En la figura 22 se aprecia la aparición de un único pico anódico bien definido, que en el caso de orto-Nitro-DHP aparece en +1044mV, para meta-Nitro-DHP aparece en +1060mV y para el compuesto para-Nitro-DHP aparece en +1084mV.

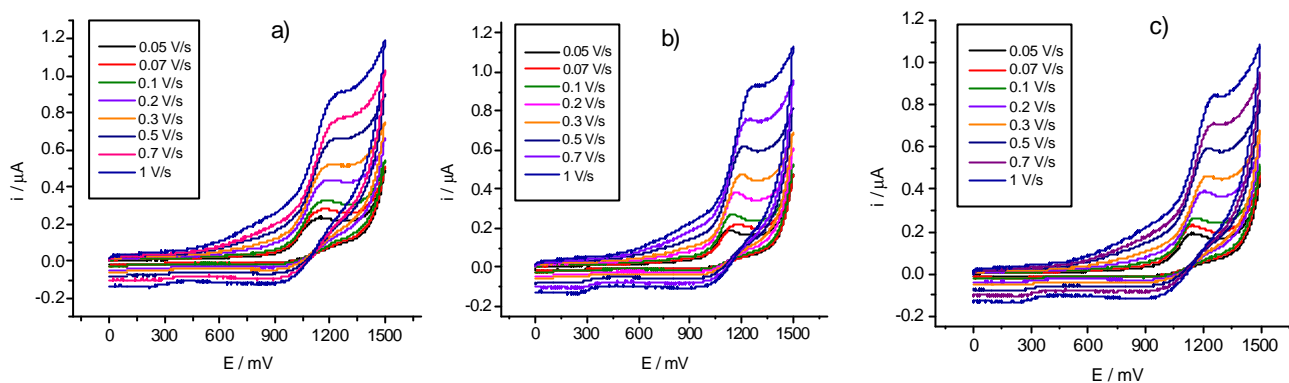


**Figura 22:** Voltamogramas de pulso diferencial para los compuestos a) orto, b) meta y c) para; Medio Aprótico; Concentración 1 mM

### 6.2.2. Caracterización de la oxidación de las 1,4-Dihidropiridinas en Medio Aprótico por Voltametría Cíclica

Los experimentos fueron realizados bajo las mismas condiciones del experimento anterior.

En la figura 23 se puede ver que como resultado se obtuvo en todos los casos un pico anódico irreversible, igual que con los experimentos en medio prótico, dando cuenta de un proceso en donde sólo ocurre oxidación.



**Figura 23:** Voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido para los compuestos a) *orto*, b) *meta* y c) *para*; concentración 1mM; medio aprótico

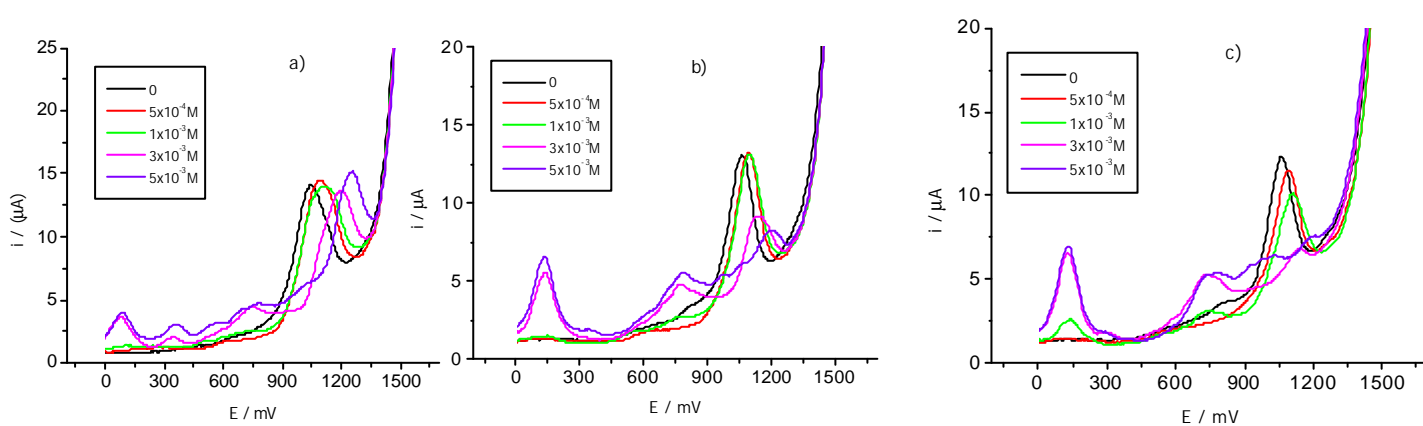
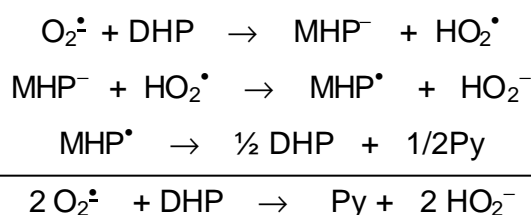
### 6.3. Reactividad de 1,4-Dihidropiridinas con el radical superóxido

Para conocer la reactividad de estos compuestos con el radical superóxido, se evaluó en comportamiento electroquímico en presencia de distintas cantidades de superóxido. Para esto, se utilizó la técnica de Voltametría de Pulso Diferencial en DMSO y PTBA 0.1 M.

En la figura 24 se puede ver que a medida que aumentamos la concentración de superóxido en la solución, la señal de oxidación de los compuestos *meta* y *para*-Nitro-DHP disminuyen o se consumen, apareciendo otras que podrían tratarse de productos de la reactividad entre ambos compuestos. Para el compuesto *orto*-Nitro-DHP no ocurre

lo mismo ya que se ve en la figura un desplazamiento de la señal principal así como también la aparición de otra señal.

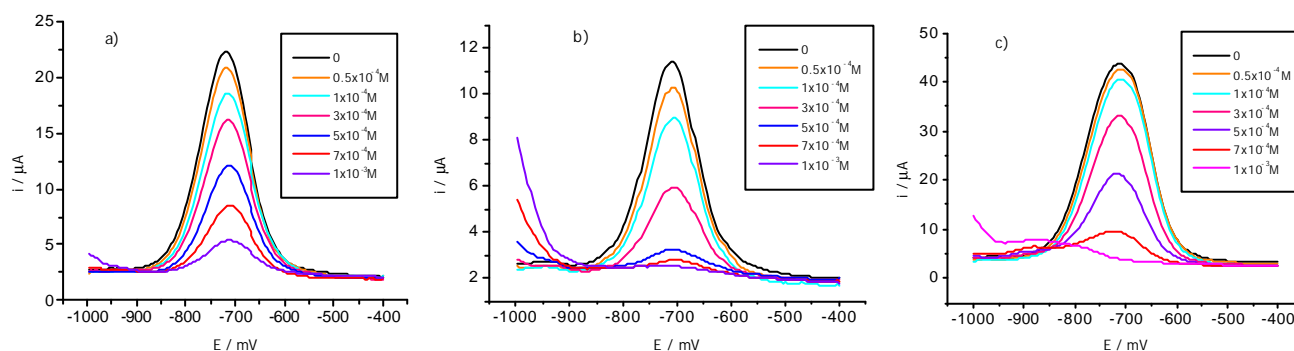
Se puede, entonces, señalar que todas las dihidropiridinas estudiadas presentan un potencial efecto antioxidante al interactuar con el radical superóxido, que de acuerdo a lo estudiado en otras series homólogas de DHP, ésta interacción sería de tipo transferencia de protones desde la posición 4 del anillo dihidropiridínico al superóxido, como primera etapa en la desactivación de éste radical, para posteriormente generarse un derivado piridínico (Py) (Ortiz et al., 2002), de acuerdo a:



**Figura 24:** Voltamogramas de pulso diferencial de los compuestos a) orto, b) meta y c) para en DMSO, PTBA 0.1 M en presencia de diferentes concentraciones de superóxido

En los tres casos, además, es posible observar la aparición de una señal cerca de los 150 mV, la que está directamente relacionada con la cantidad de superóxido adicionado y podría ser atribuido a la oxidación de la formas aniónica de las DHP (MPH<sup>-</sup>) que se genera luego de que estas reaccionan con el anión superóxido.

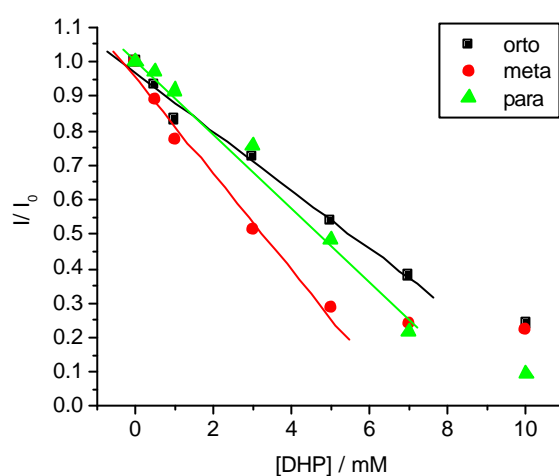
Posteriormente se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DHP sobre una cantidad constante de superóxido, para esto se evaluó la señal de oxidación del superóxido agregando alícuotas de los compuestos en estudio. En la figura 25 se aprecia como la corriente del superóxido disminuye en presencia de las DHP de una manera dosis dependiente. Con esto se comprueba que existe una interacción entre las DHPs la que aumenta al aumentar su concentración en la solución.



**Figura 25:** Voltamogramas de pulso diferencial de superóxido (3 mM), en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos a) orto, b) meta y c) para



Comparando las reactividades de los tres compuestos (Figure 25) es posible observar que el compuesto meta sustituido es el que presenta una mayor reactividad frente a superóxido a todas las concentraciones estudiadas. Los otros dos derivados presentan una reactividad similar entre ellos a bajas concentraciones, pero a altas es el derivado para el que reacciona en mayor grado.



**Figura 26: Evolución de la corriente de pico para una solución de superóxido electrogenerado (3 mM), en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos orto, meta y para**

Estos resultados concuerdan con los ya obtenidos previamente en el laboratorio de Bioelectroquímica en cuanto a que las dihidropiridinas que se reducen más fácil, no son las que reacciona en mayor grado con el radical superóxido (Ortiz, 2004).

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a la caracterización electroquímica, los tres compuestos resultaron ser electrooxidables, en todo el rango de pH (2-12).

Los estudios realizados por electrodo de carbón vítreo en solución tampón Britton-Robinson:etanol (70:30) presentaron el siguiente orden de oxidación:

orto > para = meta,

ya que se pudo observar que el isómero orto requirió menor energía para oxidarse que los otros dos isómeros en los cuales no hay una gran significancia. Esto puede deberse producto del efecto mesomérico y a la resonancia que afecta al ciclo donde se encuentra el grupo nitro.

La corriente de pico ( $i_p$ ) resultó tener un comportamiento independiente del pH.

La reacción electródica se debería a la transferencia de 2 electrones y además está controlada por un proceso de difusión. El estudio voltamétrico se ve claramente afectado por un fenómeno de adsorción, que desaparece al aumentar el pH y la velocidad de rotación, interfiriendo con la difusión de la especie a la superficie del electrodo.

El estudio por voltametría cíclica indica que se trata de un proceso irreversible dónde sólo ocurre la oxidación de la especie electroactiva.

La caracterización espectrofotométrica da cuenta de bandas de absorción que se mantienen constante a lo largo de la escala de pH. No fue posible realizar el cálculo de los pKas correspondientes.

El estudio por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) reveló los tiempos de retención para cada compuesto original y posibles productos de degradación para el orto derivado.

El estudio de reactividad con el radical superóxido reveló que los compuestos reaccionan en forma significativa con éste y de acuerdo a esto presentan un potencial efecto antioxidante.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Baarnhielm,C., Hansson., (1986) *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1419-1425.
- Boker, R., Guengerich, P., (1986) *J. Med. Chem.*, 29, 1596-1603.
- Carmona, C., (1994) Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Gileadi, E., (1993) *Electrode Kinetics for chemistry, chemical engineers, and material scientits*. VCE publishers, Inc. USA, 57-60, 82-100.
- Glosser, D., (1994) *Cyclic Voltammetry Simulation and analysis of reaction mechanisms*.VCH, 46.
- Goldmann, S., Stoltefuss, J., (1991), *Angew Chem. Int. Edit*, 30, 1559-1578
- Goodman & Gilman, (1996), *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9º edición, McGraw-Hill Companies Inc, 821-828.
- Katz, A., (1985), *Am. J. Cardiol.*, 55, 2B-9B.
- Lee, J., Jacobsen, N., Ortiz de Montellano, P., (1988), *Biovhemistry.*, 27, 7703-7710.
- Ludvik, L., et al., (1985), *Electrochemical oxidation mechanism of 4-disubstituted 1,4-dihidropyridines in acetonitrile*.*J-Electroanal. Chem.*, 188, 105-109.
- Mak, T., Boehme Weglicki, W., (1992), *Cir. Res.*, 70, 1099-1103.

- Mason, R., Mak, T., Trumbore, M., Mason, P., (1999), *Am. J. Cardiol.*, 84, 16L-22L.
- Montecinos, M., (1996) Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Ortiz, M.E., Nuñez-Vergara, L.J. & Squella J.A., (2002) *J. Electroanal Chem.* 519 46-52
- Ortiz, M.E. (2004) Tesis Para optar al grado de doctor en Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile
- Santander I.P., Núñez-Vergara L.J., Squella J.A. and Navarrete-Encina P.A. *Synthesis-Stuttgart*.18 (2003) 2781-2784
- Schwartz, A., Triggle, D., (1984) *Arr. Rev. Med.*, 35, 325-339
- Van Amsterdam, F., Roveri, A., Maiorino, M., Ratti, E., Ursini, F., (1992), *Free Rad. Biol. & Med.*, 12, 183-187
- Wingard, L., Brody, T., (1991), *Human pharmacology*, Mosby-Year Book, Inc. P, 212-214.