



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
ELECTROQUÍMICA DE 4-NITROIMIDAZOLES
SUSTITUIDOS EN POSICIÓN UNO**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico

PEDRO ANTONIO BRISO CONTRERAS

Profesor Patrocinante

Dr. Juan Arturo Squella Serrano

Director de Memoria

Dra. Soledad Bollo D.

Santiago, Chile

2009

Mucha gente entra y sale de su vida a lo largo de los años. Pero solo los verdaderos amigos dejan huellas en su corazón.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la Universidad de Chile por ofrecerme la oportunidad de asumir el reto de convertirme en Químico. Deseo ofrecer un especial reconocimiento a mis colegas Cristian Vega Retter y Raúl Moscoso por su comprensión y generosidad.

A todos mis profesores que con gran capacidad y dedicación me impulsaron en todo tiempo en especial a las Doctoras Soledad Bollo Dragnic, Claudia Yáñez Soto y Jacqueline Pezoa Olivares.

Deseo ofrecer un especial reconocimiento a mi director de tesis Prof. Juan Arturo Squella Serrano y Juan Carlos Sturm Schaub, quiénes dedicaron muchas horas para dirigir el proceso de aprendizaje que se derivó del desarrollo de este trabajo.

A todos los miembros de los laboratorios de Bioelectroquímica y Síntesis Orgánica Aplicada, por su constante apoyo en especial a Sebastián Finger, Paola Jara y Ricardo Salazar por su asistencia en comprender y armonizar los resultados de esta tesis.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi familia. Sin ellos no habría podido llegar a este punto. He necesitado su cariño, comprensión y su apoyo incondicional en dosis extremadamente elevadas. Mis padres Pedro Briso Morales y Juana Helena Contreras, han sido, por así decirlo, los cimientos sobre los que me he apoyado para la realización de esta tesis. También agradezco al resto de mi familia que me han apoyado y comprendido en todo momento en este periodo tan largo y, en ocasiones, tan difícil, han logrado que siga avanzando hacia mis objetivos.

Por último agradezco a todas las personas que me han ayudado de una forma u otra en este trabajo, en gran parte para no extenderme en exceso. Ellos saben quienes son y tienen mi más sincera gratitud por todo.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.	OBJETIVOS DE LA MEMORIA.....	13
2.1	Objetivo General	13
2.2	Objetivos Específicos	13
1.2.1	Síntesis de Compuestos	13
1.2.2	Dilucidar el Comportamiento Electroódico en Medio Acuoso a Distintos pH.....	13
1.2.3	Química en Solución.....	14
3.	MATERIALES Y METODOS	15
3.1	Materiales y Equipos.....	15
a)	Reactivos de Síntesis.....	15
b)	Reactivos Utilizados en Electroquímica	16
c)	Otros Materiales	17
	Material de vidrio	17
	Micropipetas	17
d)	Equipos para Análisis de Compuestos en Síntesis.....	17
e)	Equipos para Análisis Electroquímico	18
f)	Espectrofotometría UV-Visible	18
g)	Equipos de Uso General	18
3.2	Métodos	19
3.2.1	Preparación de Soluciones	19
a)	Soluciones Stock Nitrocompuestos.....	19
3.2.2	Medio Acuoso	19
3.2.3	Medio no Acuoso	20

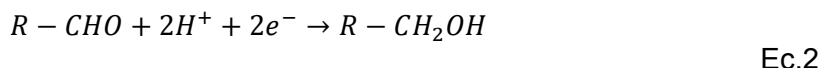
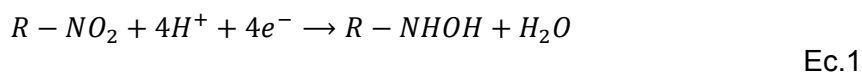
3.2.3	Técnicas Voltamétricas.....	21
a)	Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía TAST (PTast).	21
b)	Voltametría Cíclica.....	21
c)	Criterio de reversibilidad	22
d)	Análisis de Proceso Controlado Por Difusión o Adsorción.	23
e)	Espectrofotometría de Absorción UV-Visible	28
3.3	Síntesis de 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído	29
a)	Síntesis de 1-metil-2-hidroximetilimidazol.....	29
b)	Síntesis de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol.....	30
c)	Síntesis de 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1	Estudio de estabilidad	35
4.2	Caracterización Electroquímica en Medio Acuoso Mixto	37
4.2.1	Britton Robinson – Etanol (70/30).....	37
a)	Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía Tast	37
b)	Espectrofotometría de Absorción UV-Visible	40
c)	Voltametría Cíclica.....	42
4.2.2	DMF – Buffer Citrato (60/40).....	45
a)	Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía Tast	45
b)	Espectrofotometría de Absorción UV-Visible	47
c)	Voltametría Cíclica.....	48
4.3	Caracterización Electroquímica en Medio no Acuoso.....	50
a)	Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía TAST	50
b)	Voltametría Cíclica.....	51
5.	CONCLUSIÓN.....	56

6.	ANEXO SÍNTESIS.....	57
6.1	Estrategia de síntesis: 1-H-4-nitroimidazol – 2-carboxaldehído y 1-bencil-4-nitroimidazol – 2- carboxaldehído.....	57
	a) Síntesis de 1-bencil-2-hidroximetilimidazol	57
	b) Síntesis de 2-hidroximetilimidazol	58
	c) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol.....	59
6.2	Otras reacciones de nitración.....	61
	a) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol	61
	b) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol'	62
6.3	Reacciones de desmetilación.....	63
	a) 1° N-Desmetilación de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol.....	63
	b) 2° N-Desmetilación de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol.....	64
7.	Bibliografía.....	66

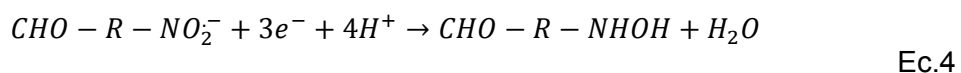
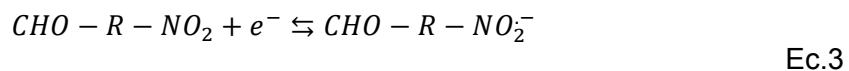
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE 4-NITROIMIDAZOLES (SUSTITUIDOS EN POSICIÓN UNO)

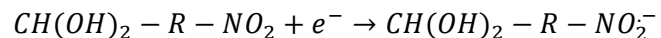
Se sintetizó el 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído, el cual fue reducido electroquímicamente sobre un electrodo de mercurio, en medio mixto y aprotico, con el fin de estudiar su comportamiento electroquímico, además de la generación del anión radical nitro formado ($RNO_2^{\cdot-}$). Las técnicas utilizadas fueron polarografía de pulso diferencial (PPD), polarografía TAST y voltametría cíclica (VC).

En medio mixto, fueron observados dos picos voltamétricos, el primero correspondiente a la reducción irreversible vía cuatro electrones, cuatro protones del grupo nitro al derivado hidroxilamínico (Ec.1). El segundo pico se debe a la reducción irreversible vía dos electrones, dos protones del grupo aldehído para generar el derivado alcohol (Ec.2).



Solo a velocidades de barrido superiores a 5 V/s fue posible observar un desdoblamiento de la primera señal en dos nuevas señales, la primera, correspondiente a la reducción de un electrón para formar el anión radical nitro (Ec.3) y la segunda, a la reducción vía tres electrones, cuatro protones del anión radical nitro a derivado hidroxilamínico (Ec.4). Además, fue posible observar una cuarta señal, correspondiente a la reducción de un electrón para formar el anión radical nitro, pero esta vez, es la especie hidratada (Ec.5).





Ec. 5

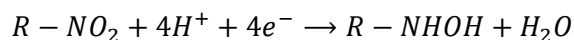
Todas las señales estudiadas sufren desplazamiento a potenciales más catódicos a medida que el medio se alcaliniza y a pH superiores a 9, tanto los E_p y $E_{1/2}$ como la I_{lim} se independizan con respecto al pH del medio. Además, los valores de potenciales de reducción para el 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído en estos medios, son menores comparados con el resto de los derivados nitroimidazólicos estudiados en el laboratorio.

Por otro lado, en medio aprótico solo una señal cuasi reversible es observada, correspondiente a la reducción del grupo nitro a anión radical nitro (Ec.3). La cuasi reversibilidad fue confirmada, usando la teoría desarrollada por Nicholson y un estudio cinético posterior permitió medir la constante de velocidad Heterogénea (k^0).

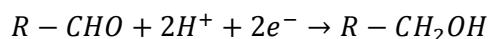
Synthesis and electrochemical characterization of 4-Nitroimidazoles (REPLACED IN ONE POSITION)

1-methyl-4-nitroimidazole-2-carboxaldehyde was synthesized and its electrochemical behavior, at mercury electrode, in mixed and aprotic media was studied emphasizing the generation of the nitro radical anion (RNO_2^-). The techniques used were differential pulse polarography (DPP), TAST polarography and cyclic voltammetry (CV).

In mixed medium, two voltammetric peaks were observed, the first one correspond to the irreversible reduction, via four electrons four protons, of the nitro group to generate the corresponding hydroxylamine derivative (Ec.1). The second peak is due to the irreversible reduction via two electrons, two protons of the aldehyde group to produce the alcohol derivative (Ec.2).

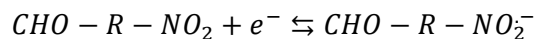


Ec.1

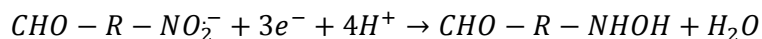


Ec.2

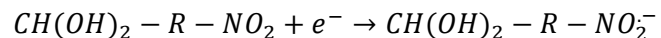
By cyclic voltammetry, only at scan rates higher than 5 V/s was possible to observe a splitting of the first signal into two new ones corresponding to the one electron reduction of nitro to form the nitro radical anion (Ec.3) and the second due to the reduction via three electrons, four protons of the nitro radical anion to form the hydroxylamine derivative (Ec.4). Furthermore, it was possible to observe a fourth signal corresponding to a one electron reduction, of the hydrated nitro species to form the nitro radical anion (Ec.5).



Ec.3



Ec.4



Ec.5

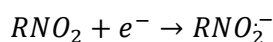
All the signals studied are pH dependent, shifting to more cathodic potential as the medium is more alkaline. Above pH 9 the signals are pH-independent. Moreover, the reduction potentials for 1-methyl-4-nitroimidazole-2-carboxialdehyde in this media are lower than other nitroimidazoles derivatives studied in the laboratory.

Furthermore, in aprotic medium a quasi-reversible process was observed, corresponding to the nitro group reduction to the nitro radical anion (Ec.3). The quasi-reversibility was confirmed using the theory developed by Nicholson. The kinetic study was performed and the heterogeneous rate constant (k^0) was determined.

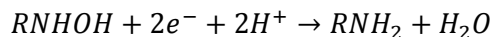
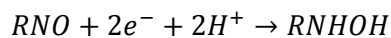
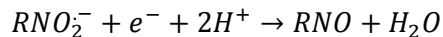
1. INTRODUCCIÓN

A través de la historia los nitroimidazoles han sido utilizados con fines farmacológicos, por sus propiedades antiparasitarias¹, fungicidas², antimicrobianas³ y antiprotozoaria.⁴ Su actividad biológica radica fundamentalmente en el grupo nitro, el cual, al reducirse a través de un sistema enzimático, perteneciente al microorganismo, genera especies intermediarias activas, capaces de dañar el ADN microbiano estructuralmente, y así, impedir su reproducción.

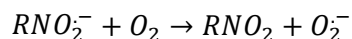
La reducción de los compuestos nitroimidazólicos, de acuerdo a las condiciones del medio, puede ser lograda en forma anaeróbica o aeróbica^{5,6}, requiriéndose para ambas condiciones, que la primera etapa de reducción sea mono electrónica, formándose así un anión radical nitro.



Bajo condiciones anaeróbicas, el anión radical nitro, mediante reducciones sucesivas, es capaz de formar derivados nitrosos, hidroxilamínicos y aminos respectivamente.



Por otro lado, bajo condiciones aeróbicas, el anión radical nitro es oxidado, regenerando el compuesto nitro inicial y formando, además, superóxido en el denominado “ciclo fútil”.



Otro estudio, sobre la actividad microbiana de nitroimidazoles contra *trichomonas vaginalis*,⁷ reveló que la potencia para esta actividad decrece para los 4 nitro-sustituidos. Sin embargo, la descripción de las propiedades cancerígenas y mutagénicas son elevadas para los 2- y 5- nitro-sustituidos. Esto despertó nuestro interés en ahondar en la investigación de los 4 nitroimidazoles,⁸⁻⁹ con el fin de estudiar la electroquímica de estos compuestos y el efecto de los sustituyentes en el anillo nitroimidazólico.

2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA

2.1 Objetivo General

Síntesis y caracterización electroquímica del 4-nitro-imidazol-2-carboxaldehído. Además, determinar su comportamiento catódico, estudiando específicamente el efecto que poseen ciertos sustituyentes sobre la reducción del grupo nitro, así como estudiar el comportamiento de las especies radicalarias formadas.

2.2 Objetivos Específicos

1.2.1 Síntesis de Compuestos

El compuesto será sintetizado y caracterizado por punto de fusión, espectroscopía infrarroja (FT-IR), resonancia nuclear magnética ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) y por análisis elemental.

1.2.2 Dilucidar el Comportamiento Electrónico en Medio Acuoso a Distintos pH

Se utilizarán las técnicas de polarografía (tast y de pulso diferencial) y voltametría cíclica sobre electrodo de gota colgante de mercurio.

Se determinarán las respuestas electroquímicas, estudiando señales, ondas, etc. en distintos medios (acuoso mixto, no acuoso), para luego aplicar criterios matemáticos y de cálculo. Sólo para el primer medio se estudiarán estas respuestas frente al pH.

Se estudiarán las especies radicalarias del grupo nitro mediante voltametría cíclica, estudiando los efectos que tiene el medio de reacción y la velocidad de barrido

sobre la cupla redox, para así poder calcular parámetros cuantitativos, como la constante de transferencia heterogénea (k^0).

1.2.3 Química en Solución

Mediante espectroscopía UV-visible estudiaremos la respuesta espectroscópica de los derivados frente al pH en medio acuoso. Se analizará el comportamiento de las bandas de absorción respecto a los cambios de pH, realizándose curvas de absorbancia v/s pH, con el fin de determinar equilibrios ácido - base y valores de pKa.

De esta forma se pretende contribuir al conocimiento de la química en solución, de este tipo de compuestos y su proyección hacia la farmacología. Ciertamente, un estudio de esta naturaleza, representaría un avance significativo en el campo de la electroquímica, con vista a caracterizar nuevas moléculas y predecir su potencial efecto farmacológico.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales y Equipos

a) Reactivos de Síntesis

- Acetato de etilo, Equilab.
- Acetona, Merck.
- Ácido clorhídrico, Merck.
- Ácido sulfúrico, Merck.
- Bencilimidazol, Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sodio, Equilab.
- Cloruro de amonio, Scharlau.
- Cloruro de sodio, Merck.
- Dicromato de potasio, Merck.
- Etanol absoluto, Merck.
- Etanol p.a., Merck.
- Eter etílico, Merck.
- Hidróxido de potasio, Merck.
- Nitrato de potasio, Merck.
- Metanol, Merck.

- Sodio metálico, Merck.
- Solución formalina 37% solución acuosa, Sigma-Aldrich.
- Solución hidróxido de amonio 25%, Merck.
- Sulfato de sodio, Merck.
- Percarbonato de Sodio ($\text{NaCO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}_2$) 30%, Aldrich.
- Cloruro Cianúrico ($\text{C}_3\text{Cl}_3\text{N}_3$), Aldrich.
- Cloruro de Cromo Piridino (PCC) 98 %, Aldrich.

b) Reactivos Utilizados en Electroquímica

- Ácido bórico (99%) p.a. Merck.
- Ácido acético glacial p.a. Mallinckrodt.
- Ácido clorhídrico (36%) p.a. Merck.
- Agua desionizada pureza milli-Q.
- Hidróxido de sodio (pellets) p.a Merck.
- N, N - dimetilformamida (DMF) p.a. Merck.
- Perclorato de tetrabutil amonio (PTBA) Fluka Chemica.
- Nitrógeno extra puro AGA Chile S.A.
- Mercurio, Merck.

c) Otros Materiales

Material de vidrio

- Todo el material utilizado fue clase A.

Micropipetas

- Transferpette 10 -50, 50-250 y 100-1000 μ L.

- Socorex 1-10 mL.

d) Equipos para Análisis de Compuestos en Síntesis

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Block-Monoscop Werk-NRZA.

Los espectros FT-IR se realizaron en un instrumento Bruker FT-IR Paragon 100 PC, con pastilla de KBr para los compuestos sólidos.

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker WM 300.

Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm) relativo al TMS como estándar interno. Todos los espectros son consistentes con las estructuras asignadas.

Los análisis elemental (C, H, N) se realizaron en un instrumento Perkin Elmer 2400 y están dentro de los límites de $\pm 0,5$ % con respecto a los valores teóricos.

e) Equipos para Análisis Electroquímico

- Analizador voltamétrico BAS 100W.

Electrodos

- Trabajo: gota de mercurio.
- Referencia: Ag/AgCl, NaCl .
- Auxiliar: platino.

f) Espectrofotometría UV-Visible

- Celda de cuarzo 1 cm de paso óptico.
- Espectrofotómetro UV-vis UNICAM modelo UV-2.
- Software VISION 2.1, para control del instrumento.

g) Equipos de Uso General

- Agitador magnético Heidolph MR 3002.
- Balanza analítica Precisa 40 SM - 200 A sensibilidad 0,01 mg.
- Baño ultrasonido Branson 2210.
- Medidor de pH WTW modelo pMx 3000.
- Rotavapor modelo HEIDOPH WB2000.
- Lámpara UV- Visible para placas cromatográficas.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de Soluciones.

a) Soluciones Stock Nitrocompuestos.

Se prepararon soluciones stock de 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído (4N-1MelmzCHO) (5 mL) de una concentración de 10 mM en EtOH y DMF, dependiendo del medio de trabajo de la solución. Luego las soluciones se conservaron refrigeradas y aisladas de la luz para evitar su descomposición.

3.2.2 Medio Acuoso

a) Soluciones Tampón.

- Buffer Britton Robinson 0,1 M:

En un matraz de 1000 mL se agregó 6,74 mL de H_3PO_4 ; 5,72 mL de CH_3COOH y 6,183 g de H_3BO_4 . Posteriormente se aforó con agua tipo Milli-Q.

- Buffer Citrato 0,015 M + KCl 0,3 M:

En un matraz de 1000 mL se agregó 7,215 g de ácido cítrico, 1,167 gr de H_3BO_4 y 55,913 g de KCl. Luego se aforó con agua tipo Milli-Q.

- Medio Britton Robinson/EtOH : 70/30

Se tomó una alícuota de la solución madre preparada con EtOH, ésta se adicionó a un matraz de 10 mL, posteriormente se agregó EtOH para completar un volumen de 3 mL, luego se aforó con Buffer Britton Robinson.

- Medio DMF/Citrato : 60/40

Se tomó una alícuota de la solución madre preparada con DMF y se agregó a un matraz de 10 mL, se agregaron 4 mL del Buffer Citrato 0,015 M + KCl 0,3 M, luego se aforó con DMF.

3.2.3 Medio no Acuoso

a) Preparación de Soluciones de Trabajo.

- Medio DMF 100% + 0,1 M PTBA

En un matraz de 25 mL se agregaron 0,8722 gr de perclorato de tetrabutilamonio (PTBA). Posteriormente se aforó con DMF 100 %. A continuación, en un matraz de 10 mL se agregó una alícuota de la solución madre preparada con DMF, para luego aforar con la solución de DMF + PTBA 0,1M.

Las mediciones de Polarografía tast (tast.), Polarografía de pulso diferencial (PPD) y voltametría cíclica (VC) se realizaron en las mismas condiciones anteriormente descritas para ambos medios.

- Para VC las soluciones de trabajo fueron de 1 mM.
- Para PPD y tast, las soluciones de trabajo preparadas fueron de 0,1 mM.
- Para espectroscopía UV-vis, las soluciones de trabajo preparadas fueron de 0,05 mM.

3.2.3 Técnicas Voltamétricas

a) Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía TAST (Tast).

Para estos estudios se utilizaron soluciones de trabajo con una concentración 0,1 mM, las cuales fueron transferidas a una celda voltamétrica de 10 mL. Éstas fueron burbujeadas con nitrógeno por 10 minutos. Se utilizó un electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contra electrodo y un electrodo de Ag/AgCl, Cl⁻, (3M) como referencia.

Se realizó el estudio electroquímico entre un rango predeterminado de pH, desde 2,0 a 11,0, incrementando en 0,5 unidades de pH, mediante la adición de gotas de una solución de NaOH para ajustar al pH requerido. Solo para medios prácticos se estudió el comportamiento E_p , $E_{1/2}$, I_p y I_{lim} con respecto a la variación del pH.

b) Voltametría Cíclica

El estudio voltamétrico se realizó con soluciones de 4N-1MeImzCHO, de concentración 1 mM en soluciones tampón Britton-Robinson/Etanol (70/30) y DMF/Citrato (60/40), estas fueron transferidas a celdas de 10 mL y fueron burbujeadas con nitrógeno por 10 minutos antes de cada medición. Se utilizó un electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contra electrodo y un electrodo de Ag/AgCl, Cl⁻, (3M) como referencia. Se realizó el estudio de reversibilidad de la señal voltamétrica, para todos los medios, a tres pH predeterminados (3, 7 y 10) variando la velocidad de barrido en el rango de 0,1 a 10 V/s.

c) Criterio de reversibilidad

Consideraremos a una cupla reversible si cumple con los siguientes criterios:

- Poseer una diferencia de $-56/n$ mV entre el potencial de pico anódico (E_{pa}) y el potencial de pico catódico (E_{pc}), donde n es el número de electrones transferidos en la etapa electroquímica.
- Que los potenciales de pico (E_p) no varíen con la velocidad de barrido.

$$\left(\frac{dE_p}{d(\text{Log } V)} \right) = 0$$

- Y poseer una razón de intensidades de pico (I_{pa}/I_{pc}) igual a 1, para todas las velocidades de barrido.

Así mismo, consideraremos a una cupla cuasi reversible si cumple con los siguientes criterios:

- Poseer una diferencia mayor a $-56/n$ mV entre el potencial de pico anódico (E_{pa}) y el potencial de pico catódico (E_{pc}), donde n es el número de electrones transferidos en la etapa electroquímica.
- Que los potenciales de pico (E_p) varíen con la velocidad de barrido.

$$\left(\frac{dE_p}{d(\text{Log } V)} \right) \neq 0$$

- Y poseer una razón de intensidades de pico (I_{pa}/I_{pc}) cercana a 1.

d) Análisis de Proceso Controlado Por Difusión.

A partir de los valores de corriente de pico en función de la velocidad de barrido, es posible distinguir si un determinado proceso es controlado por difusión.

Para procesos controlados por difusión se cumple la relación:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 * n^{3/2} * A * D_0^{1/2} * C * v^{1/2}$$

Ec. 3.1

Donde:

C = [mol / cm³]

v = [V / s], velocidad de barrido

A = [cm²], área del electrodo

n = número de electrones

D₀ = [cm² / s], coeficiente de difusión

i_p = [A] Intensidad de pico

La ecuación 3.1 está descrita para procesos reversibles. Para casos irreversibles, se tiene la expresión:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 * n * (\alpha * n_a)^{1/2} * A * D_0^{1/2} * C^0 * v^{1/2}$$

Ec. 3.2

Donde:

n = número de electrones transferidos finales

n_a = número de electrones transferidos antes de la etapa determinante.

Se buscó la relación logarítmica de la Ec. 3.1, obteniéndose:

$$\text{Log } I_p = \text{Log } (k) + \frac{1}{2} \text{Log } (v)$$

Ec. 3.3

$$\frac{(d \text{Log } (I_p))}{(d \text{Log } (v))} = 0,5$$

Ec. 3.4

De esta manera, un valor de pendiente igual a 0,5 de la ecuación 3.4, indica que el proceso está controlado por difusión.

Para realizar la caracterización cinética de la especie radicalaria, se tomaron en cuenta varios parámetros y consideraciones:

a) Para el cálculo de las razones de corrientes I_{pa} / I_{pc} , se utilizó la ecuación 3.5, descrita por R. Nicholson y I. Shain¹⁷,

Ec. 3.5

Considerando las intensidades de $(I_{p,a})_0$, $(I_{p,c})_0$ e $(I_{p,s})_0$ desde el cero de corriente, como se indica en la figura 3.1.

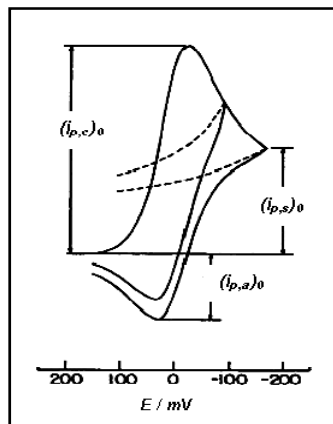


Figura 3.1. Voltamograma Cíclico que detalla las corrientes con respecto al cero, descritas por R. Nicholson y I. Shain²⁸

b) Para la determinación de la constante de transferencia heterogénea (k^0), previamente debemos obtener el coeficiente de difusión, correspondiente al 4N-1MeImzCHO¹⁰.

La relación de corriente límite con la velocidad de rotación del electrodo, esta dada por:

$$I_{Lim} = 0,20 * F * A * D^{2/3} * \nu^{-1/6} * RPS^{1/2} * C^0$$

Ec. 3.6

Donde:

N = N° de electrones transferidos (4 e⁻)

RPS = velocidad angular del electrodo

F = Constante de Faraday = 96486
(A*seg/mol)

C° = concentración en el seno de la solución = 5,33*10⁻⁷
(mol/cm³)

D =Coeficiente de difusión (cm²/seg)

ν = Viscosidad cinemática = 0,0091 (cm²/seg)

A = Área del electrodo = 0,0706 (cm²)

Si graficamos I_{lim} v/s $RPS^{1/2}$ (figura 3.2) podemos observar una relación directa entre estas variables, en la cual, la pendiente estaría determinada por:

$$m = 0,20 * n * F * A * D^{2/3} * \nu^{-1/6} * C^0$$

Ec. 3.7

De la ecuación 3.7 podemos despejar el coeficiente de difusión D.

$$D = \left(\frac{I_{Lim} * \nu^{-1/6}}{0,20 * n * F * A * RPS^{1/2} * C^0} \right)^{3/2}$$

Ec. 3.8

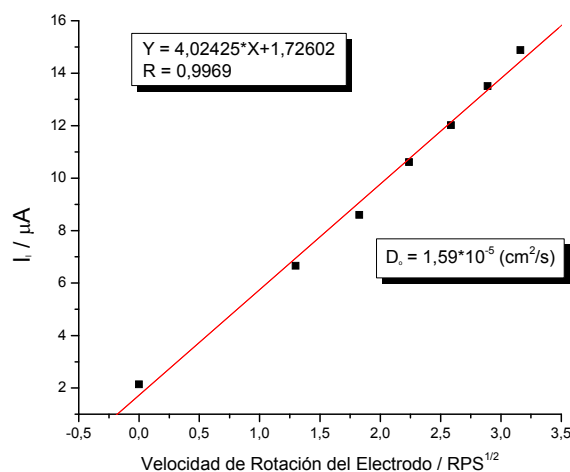


Figura 3.2. Dependencia entre la I_{lim} y la velocidad de rotación del electrodo mediante voltametría de barrido lineal con disco rotario, en medio DMF 100% + 0,1 M de PTBA.

En sistemas que no presentan un comportamiento reversible o a los cuales puede sacarse de su condición de equilibrio aumentando la velocidad de barrido, la cinética de transferencia electrónica se vuelve competitiva con la velocidad de cambio de potencial, lo cual provoca un aumento de la separación de potenciales de pico ($\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa}$). En estos casos es posible obtener datos cinéticos del sistema respecto a la transferencia electrónica.

Por último, la constante de transferencia heterogénea k^0 de la reacción electrónica fue obtenida utilizando la metodología descrita por Nicholson¹¹. Este método relaciona la constante de velocidad heterogénea con el ΔE_p mediante un curva de trabajo teórica y el parámetro cinético adimensional Ψ (figura 3.3 A).

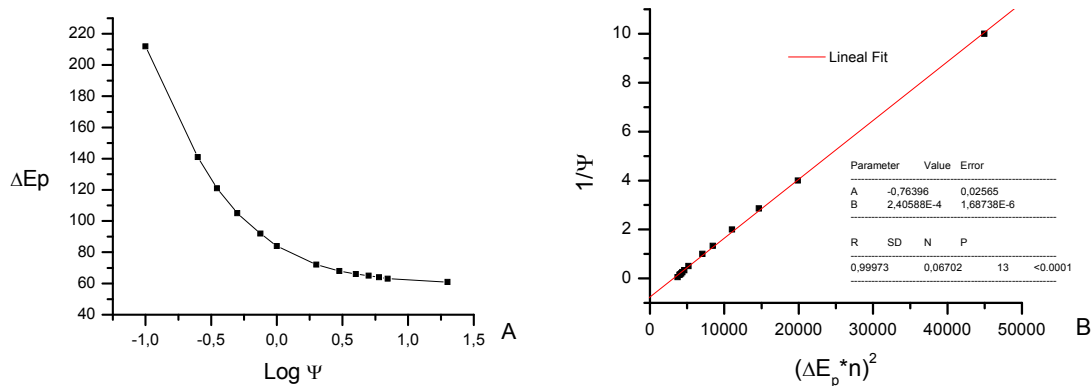


Figura 3.3. (A) Curva de interpolación teórica correspondiente al comportamiento de ΔE_p v/s Ψ (referencia 11). (B) Linealización de la curva anterior

Posteriormente, la curva teórica es linealizada (figura 3.3 B), con el fin de facilitar el calculo de interpolación, y con ésta ultima, se procedió a interpolar los valores de ΔE_p experimentales para el compuesto 4N-1MImzCHO, con el fin de obtener valores de Ψ interpolados para cada velocidad de barrido (v), estos valores de Ψ son linealizados en función de la velocidad de barrido, permitiendo calcular k_0 mediante:

$$\psi = \frac{k^0}{\left(D * \pi * \frac{n * F}{R * T} * v\right)^{1/2}}$$

Ec. 3.9

Donde:

n = numero de electrones transferidos =1

R = constante de los gases

D =Coeficiente de difusión

(J/mol*K)

(cm²/seg)

F = Constante de Faraday = 96486

(A*seg/mol)

T = temperatura (K°)

e) Espectrofotometría de Absorción UV-Visible

Se prepararon soluciones de trabajo a partir de una solución madre de una concentración de 0,1 mM. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se ajustó pH por adición de pequeñas alícuotas de NaOH y HCl conc. Se trabajó sólo con medios acuosos, para obtener una real determinación de la influencia de la concentración de H⁺ en el medio. Se realizó un estudio del comportamiento de las señales espectroscópicas de UV-vis, por cada 0,5 unidades de pH, en todo el rango de pH desde 2,0 – 11,0. Para 4N-1MeImzCHO se realizó un barrido con longitudes de onda entre los 200 nm hasta los 600 nm.

La determinación del pKa aparente se determinó con la ecuación de Henderson Haselbach modificada según K. A. Connors¹² cuyo método de regresión lineal es descrito mediante la ecuación 3.10.

$$pH = pK_a + \text{Log} \frac{A_{max} - A}{A - A_{min}}$$

Ec. 3.10

Donde:

A_{max} = Absorbancia que represente un máximo, al graficar las absorbancias, a una misma longitud de onda, a distintos pHs (la absorbancia de la especie no ionizada).

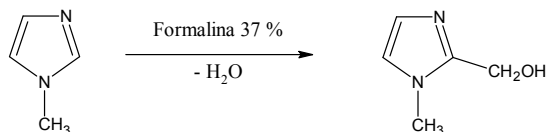
A_{min} = Absorbancia que represente un mínimo, al graficar las absorbancias, a una misma longitud de onda, a distintos pHs (la absorbancia de especie ionizada).

A = Absorbancia a un pH determinado (la absorbancia a distintos pHs).

Con la ecuación 3.10 obtenemos una relación entre el pH y la absorbancia, que nos permite obtener valores de pKa de un compuesto en solución. Para lograr utilizar esta expresión, es necesario obtener un comportamiento en las absorbancias de una forma tal que se distinga una absorbancia mínima y otra máxima en algún intervalo de la escala de pH utilizada.

3.3 Síntesis de 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído

a) Síntesis de 1-metil-2-hidroximetilimidazol



A 50 ml de 1-metilimidazol 99% (0,63 moles) se adicionan 100 mL (1,23 moles) de formaldehído 37%. Se calienta a reflujo por 27 horas.

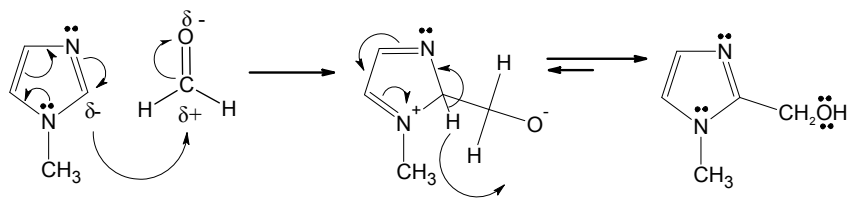
La mezcla se concentra al vacío y posteriormente se lava con etanol. El producto se deja cristalizar por una semana, y se filtra. Se recrystaliza en metanol, obteniéndose 44,04 gr (84,25 %) de cristales blancos.

P.F. 103-105 °C Rf (Bz:MeOH:ACOH = 45:4:1) : 0,34

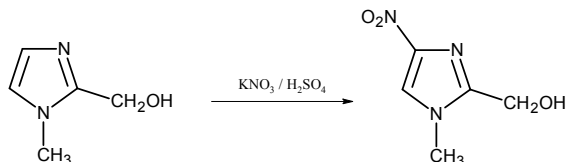
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ. 3,60 (s, 3H,CH₃); 4,45 (s,2H,CH₂); 6,75 (d,1H,C=C-N-CH₃, j = 1,23 Hz); 7,05 (d,1H, C=C-N-CH₃, j = 1,23 Hz)

¹³C-RMN (75,5 MHz, DMSO-d₆): δ. 32,9 (CH₃); 56,0 (CH₂); 122,52 (NO₂-C=C-N); 126,6 (NO₂-C=C); 147,9 (N-C=N)

Mecanismo Posible



b) 1-Metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol



Se mezcla 44,04(0,393 moles) gramos de 2-hidroximetil-1-metilimidazol y 90,23 (0,892 moles) gramos de nitrato de potasio. Esta mezcla se agrega lentamente sobre 25,03 mL (0,432 moles) de ácido sulfúrico sin sobrepasar los 50 °C.

Luego, se calienta mediante un baño de agua por 3 horas y se agita a temperatura ambiente por 15 hrs. El producto se neutraliza con hidróxido de potasio hasta pH 7-8. Se extrae con acetato de etilo, se seca con sulfato de sodio anhidro por 24 hrs y posteriormente se concentra al vacío.

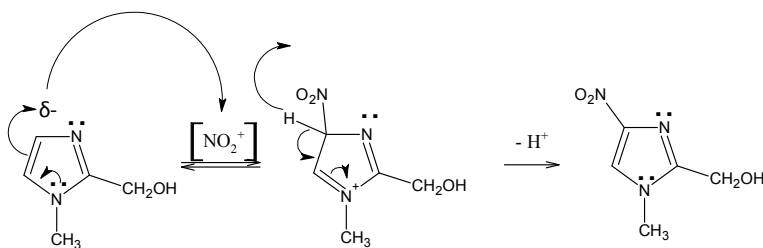
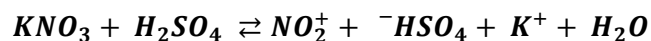
El sólido se recristaliza en etanol, obteniéndose 8,15 gr (13,21 %) de cristales amarillo claro.

P.F. 180-182 °C Rf (CH₂Cl₂:AcOEt = 9:1) : 0,1

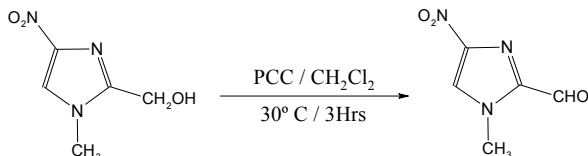
¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ. 3,81 (s, 3H, CH₃); 4,56 (s, 2H, CH₂); 5,66 (s, 1H, C-OH); 8,42 (s, 1H, C=C-H).

¹³CNMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ. 32,9 (CH₃); 56,0 (CH₂); 122,52 (NO₂-C=C-N); 148,3 (NO₂-C=C); 164,4 (N-C=N)

Mecanismo Posible



c) 1-Metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído



Se disuelven 0,706 gr (3,27 mmol) de clorocromato de piridinio (PCC) en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 (50 ml) a temperatura ambiente, dando origen a la solución A.

Posteriormente se disuelven 0,50 gr (3,2 mmol) de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 posible (50 mL, ayudar la disolución con gotas de acetonitrilo P.A.), originando la solución B. Se adiciona la solución A sobre la solución B gota a gota, con agitación vigorosa, manteniendo la temperatura en 30 °C. La solución cambia de un color anaranjado a un rojo negruzco, oscureciéndose más con el paso del tiempo.

Después de 3 hrs de reacción, la solución es filtrada y concentrada al vacío, posteriormente es redisuelta en 10 mL de una solución de hexano/AcOEt (1/1) y separada mediante cromatografía de columna con gel de sílice.

La solución separada incolora es concentrada al vacío y posteriormente recristalizada en acetona, obteniéndose 0.13 gr (26 %) de cristales de color blanco amarillento.

P.F. 140-142 °C R_f (CH_2Cl_2 :AcOEt = 9:1) : 0,52

I.R. (KBr) : ν_{max} , 1367 y 1537 (C-N=O aromático, estiramiento), 1508 (C=C, estiramiento aromático), 1704,1 (C=O, estiramiento alifático), 3136 y 3154 (C-H, estiramiento aromático).

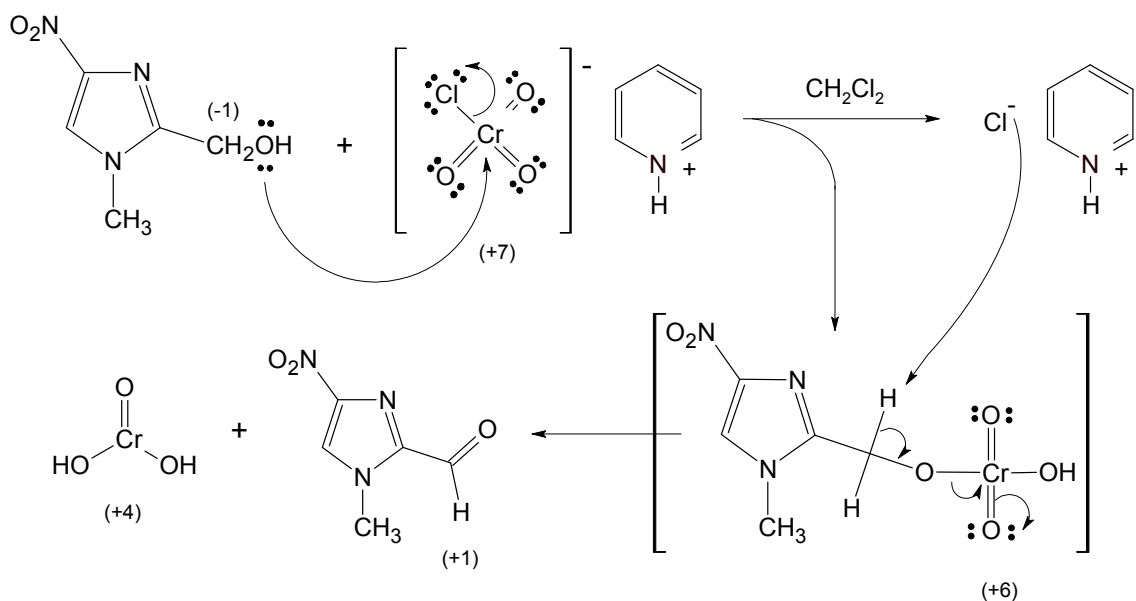
^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): δ . 4,02 (s, 3H, CH_3), 8,72 (s, 1H, C=C-H), 9,76 (s, 1H, CH=O).

^{13}C -RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6): δ . 35,1 (CH_3), 126,7 ($\text{NO}_2\text{-C}=\underline{\text{C}}\text{-N}$), 139,9 ($\text{NO}_2\text{-}\underline{\text{C}}=\text{C}$), 145,5 ($\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{N}$), 181,7 ($\text{CH}=\text{O}$).

Análisis Elemental Calculado para $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3\text{N}_3$: C: 38,72 % ; H: 3,25 % ; N: 27,09 %

Encontrado: C: 38,21 \pm 0,98 % ; H: 3,33 \pm 0,6 % ; N: 26,14 \pm 0,6 %

Mecanismo Posible



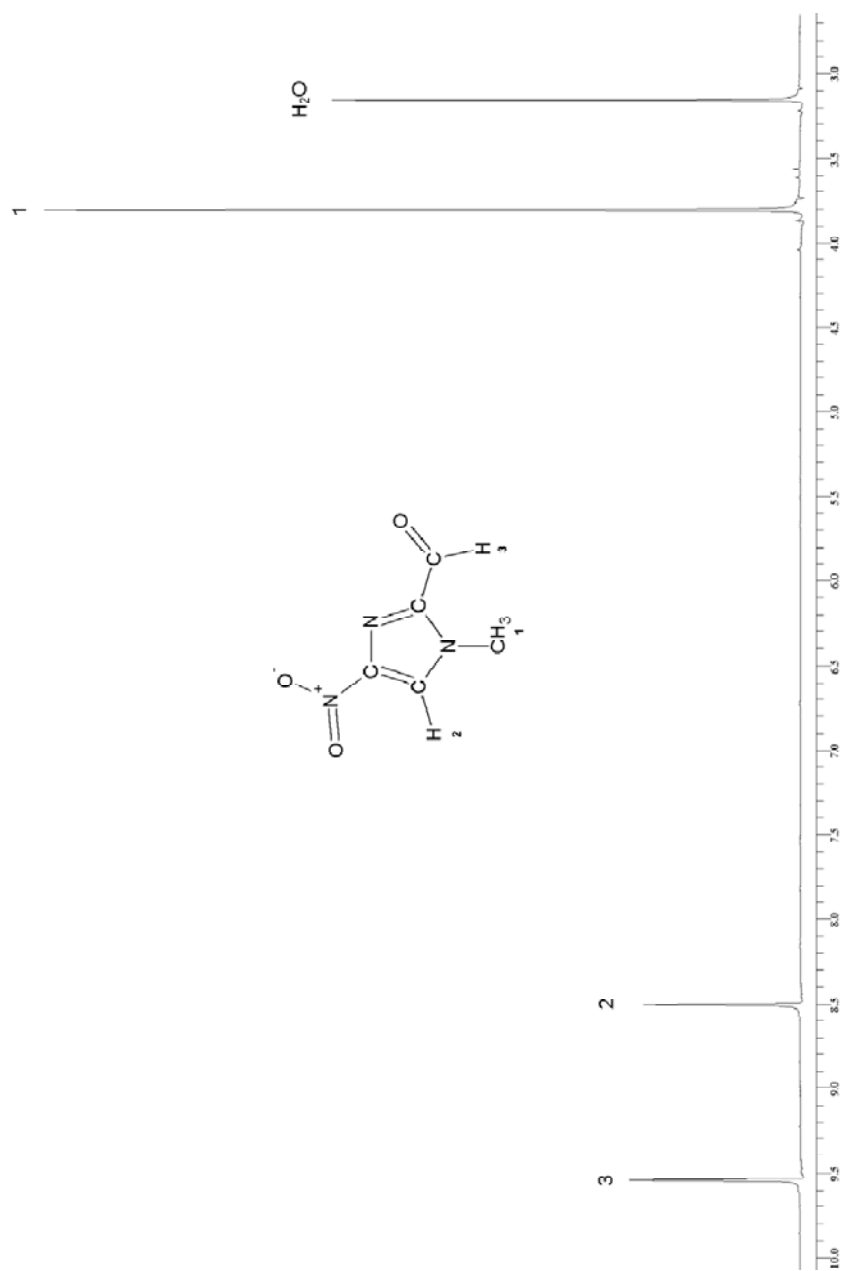


Figura 3.4. Espectrometría ¹H-RMN de 1-metil-4-nitro-imidazol-2-carboxialdehído.

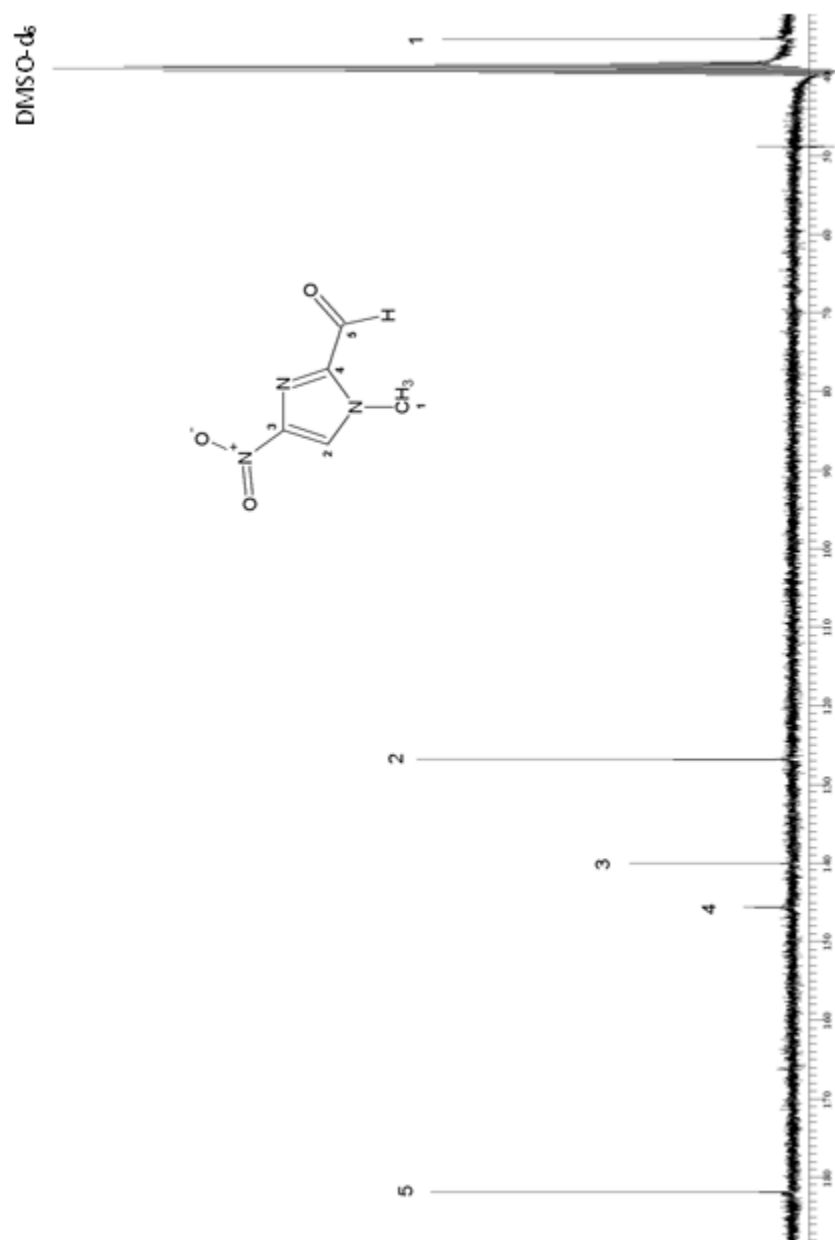


Figura 3.5. Espectrometría ^{13}C -RMN de 1-metil-4-nitro-imidazol-2-carboxialdehído.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de estabilidad

El estudio de estabilidad se realizó para determinar si el compuesto sufre degradación con el tiempo. Este estudio se llevó a cabo en un medio tampón Britton Robinson / Etanol (70/30), mediante polarografía de pulso diferencial (PPD) con un barrido catódico entre 0 y -1800 mV, realizando mediciones en intervalos de 20 min por un período total de aproximadamente 2 horas. En la figura 4.1 se muestran los resultados para 4N-1MelmzCHO en una solución tampón Britton-Robinson 0,1 M a pHs 2,0 ; 7,0 ; 11,0 respectivamente.

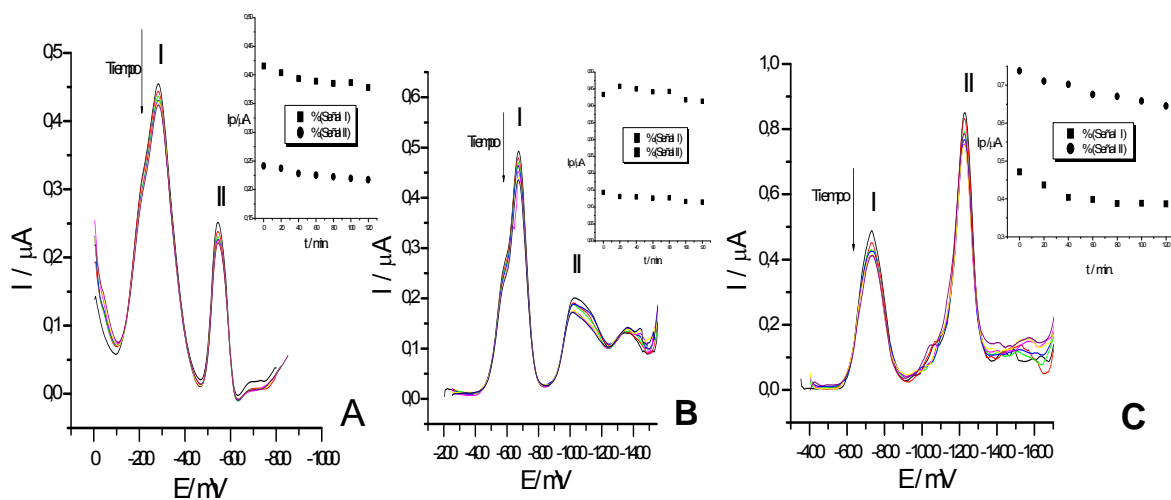


Figura 4.1. PPD de 4N-1MelmzCHO en tampón Britton Robinsón 0,1M / Etanol (70/30) a pHs (A) 2 , (B) 7 , (C) 11. La flecha indica el paso del tiempo entre una repetición y otra.

Fueron detectadas dos señales principales en toda la escala de pH, además podemos observar que la reducción es fuertemente afectada por los cambios de pH.

El compuesto estudiado evidenció una disminución de su I_p de un 5% por hora en todos los medios estudiados, pese a lo anterior, no se observó variación de los potenciales de reducción para cada una de las señales a similares pHs.

4.2 Caracterización Electroquímica en Medio Acuoso Mixto

4.2.1 Britton Robinson – Etanol (70/30)

a) Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía Tast

Las mediciones de PPD y Tast fueron realizadas con una solución de 4N-1MelzmCHO 0,1 mM a distintos pH entre 2 y 11. Como podemos ver en la figura 4.2 se puede apreciar, mediante PPD, que existe un desplazamiento de las señales hacia potenciales más catódicos a medida que aumenta el pH, es decir, al aumentar éste, se hace más difícil la reducción del 4N-1MelzmCHO. El desplazamiento de la señal de reducción también es observado en polarografía Tast para este compuesto.

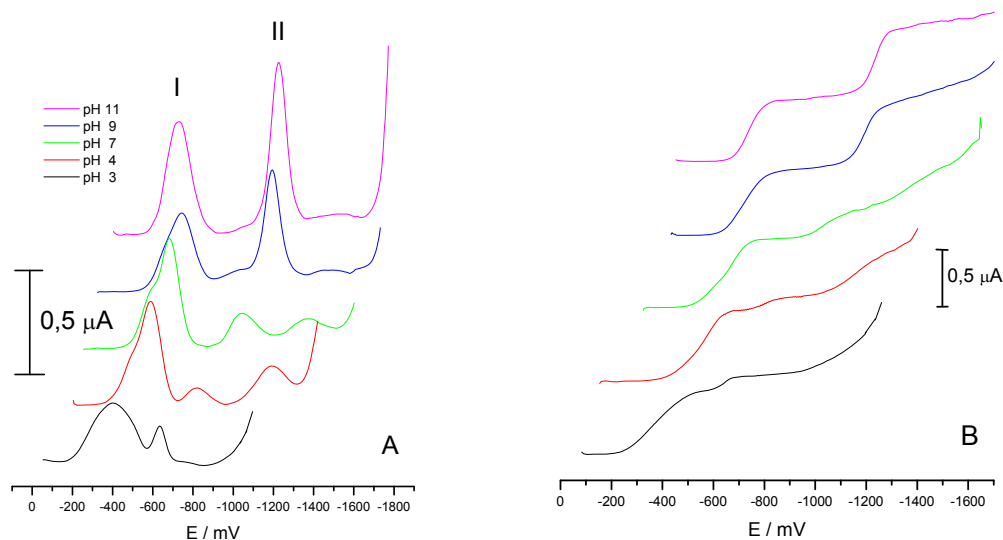


Figura 4.2. Polarogramas de pulso diferencial (A) y tast. (B) de 4N-1MelzmCHO (0,1 mM) en buffer Britton Robinsón / Etanol (70/30) a diferentes pHs

De acuerdo a los gráficos de potencial de pico (E_p) versus pH, y potencial de media onda ($E_{1/2}$) versus pH (figura 4.3 A y C), la reducción del 4N-1MelmzCHO es fuertemente afectada por los cambios de pH, apareciendo dos señales principales por sobre pH 2 (figura 4.2.), de las cuales, las señales son pH dependientes hasta pH 8,5 y por sobre éste pH las señales se vuelven pH independientes, lo que demuestra un cambio en el mecanismo de la reacción¹³, debido a la ausencia de protones involucrados antes de la etapa determinante de la velocidad.

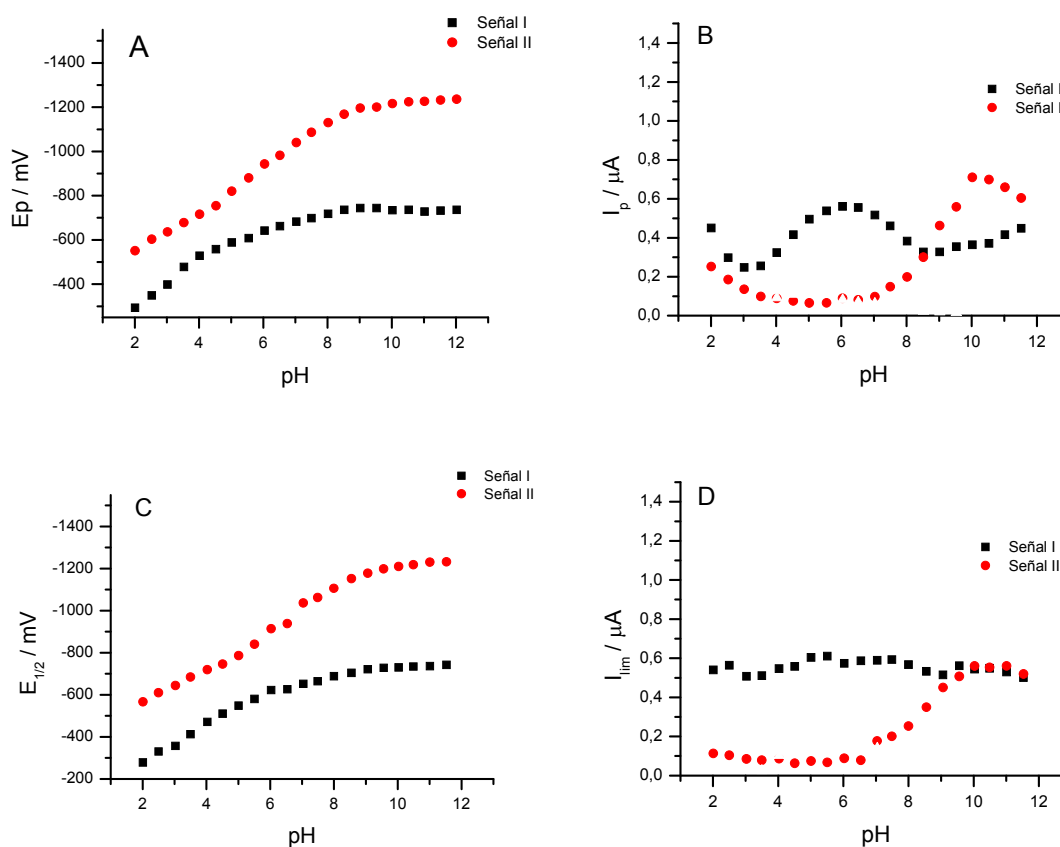


Figura 4.3. Dependencia del potencial de pico (A) y corriente de pico (B) con respecto al pH. Además, dependencia del potencial de media onda (C) y corriente límite (D) con respecto al pH de 4N-1MelmzCHO (1 mM), en medio Buffer Britton Robinson (0,1M) / Etanol (70/30).

Además, las corrientes límites obtenidas por polarografía Tast (I_{lim}/pH) son pH independientes para la señal I, mostrando que la transferencia electrónica es constante para esta señal. Para la segunda señal se observa un aumento de la intensidad de corriente a partir de pH 3,5, estabilizándose a pH 9,5, para luego permanecer prácticamente constante hasta pH 11,5. (Figura 4.3. D).

Observando el gráfico E_p/pH podemos diferenciar dos quiebres distintos, el primero a pH 8,5 podría deberse al cambio de mecanismo en la reducción del compuesto. De acuerdo a Laviron^{14,15} un cambio de mecanismo es observado debido a la ausencia de protones en el medio, en particular, bajo pH 8,5 el mecanismo de reducción del 4N-1MeImzCHO requeriría la presencia de protones en el medio para poder concretarse. El quiebre observado a pH 3,5-4,0 podría deberse a la formación de un pKa correspondiente al equilibrio ácido - base entre la forma protonada y desprotonada del derivado hidroxilamínico.

En la tabla 4.1 se presentan valores de E_p para cuatro derivados nitroimidazólicos, a dos distintos pHs, en donde el sustituyente en la posición dos del anillo imidazólico es el único grupo variante. De la tabla, apreciamos diferencias en los potenciales de reducción, influenciadas principalmente por el sustituyente. Además, observamos, que a pH 10, el compuesto 4N-1MeImzCHO es el más favorecido debido a su fácil reducción con respecto a los otros. Este comportamiento es atribuido al grupo aldehído, localizado en la posición dos del anillo imidazólico, por ser un grupo atractor, haciendo disminuir la densidad electrónica alrededor del grupo nitro.

pH / -Ep(mV)	4-NIm	4MNIImOH	1M-4NIm-2-COOH	4N-1MelmzCHO
7	728	676	702	682
10	850	760	766	734

Tabla 4.1. Tabla de comparación de los potenciales de pico, correspondiente a la reducción de cuatro derivados nitroimidazólicos a dos distintos pH. Estos son 4-nitroimidazol (4-NIm), 1-metil-2-hidroxi-metil-4-nitroimidazol (4MNIImOH), ácido 1-Metil-4-Nitro-Imidazol-2-Carboxílico (1M-4NIm-2-COOH) y 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído (4N-1MelmzCHO).

b) Espectrofotometría de Absorción UV-Visible

Al estudiar el compuesto, podemos observar una única señal a un $\lambda_{\text{máx}}$ de 298 nm, la cual es dependiente a los cambios del medio. La variación de la absorbancia en función del pH se aprecia en la figura 4.4.

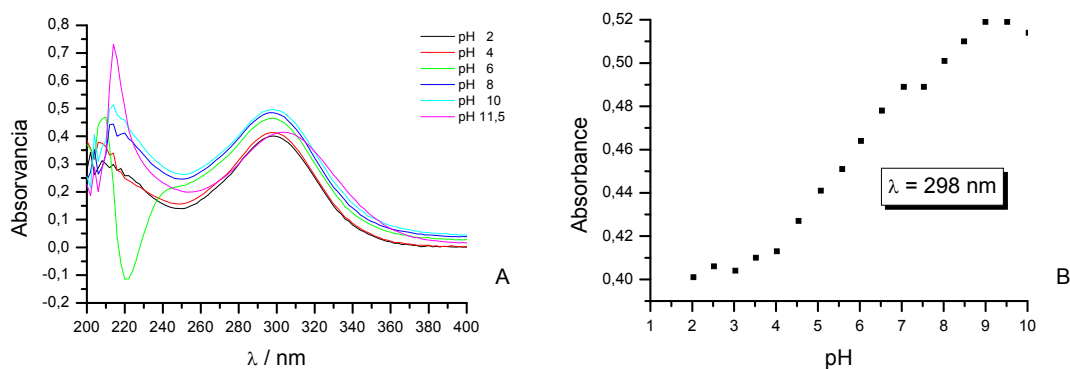


Figura. 4.4. (A) Espectro UV de 4N-1MelmzCHO 0,01 mM en un medio Buffer Britton Robinson/Etanol (70/30), a diferentes pH. (B) Dependencia de la absorbancia con respecto al pH, a $\lambda_{\text{máx}}$ de 298 nm de 4N-1MelmzCHO.

A pH 2 la absorbancia, a un $\lambda_{\text{máx}}$ de 298 nm, es mínima, posteriormente ésta aumenta su valor hasta estabilizarse entre pH 7, para luego ésta señal, aumentar nuevamente su absorbancia y alcanzar su máximo a pH 9.

Con los datos obtenidos en UV-Visible es posible determinar la dependencia de la absorbancia con respecto al pH para el compuesto estudiado, permitiendo calcular un valor de pKa aparente (figura 4.5), el cual fue obtenido utilizando la ecuación 3.10.

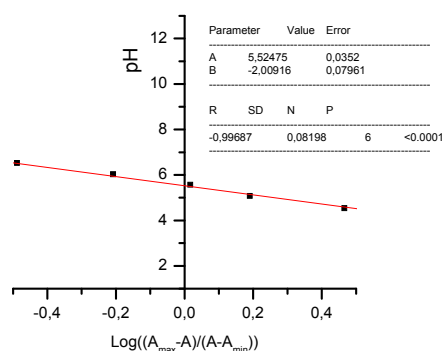
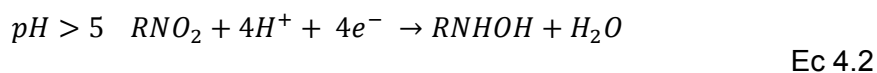
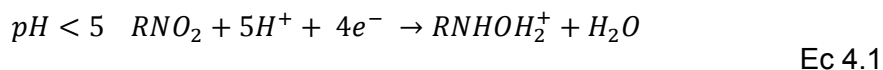


Figura 4.5. pKa calculado de acuerdo al método de regresión lineal.

Se obtuvo un valor de pKa aparente para 4N-1MelmzCHO de 5,52. Este valor coinciden con el pKa polarografico¹³ que se observa en la figura 4.3.(A y C). Debido a lo anterior, podemos postular, que el valor de pKa podría corresponder a un cambio en el mecanismo de reducción^{14,16}, debido al equilibrio de protonación – desprotonación del derivado hidroxilamínico. Indicando que el 4N-1MelmzCHO es reducido al derivado hidroxilamínico desprotonado sobre pH 5 y a la forma protonada bajo éste pH, de acuerdo a:



c) Voltametría Cíclica

Las mediciones se realizaron en una solución de trabajo 1 mM de 4N-1MelmzCHO, donde se observó la reducción del compuesto a pHs 3, 7 y 10, utilizando un electrodo de gota colgante de mercurio. Los voltamogramas cíclicos a distintos pHs para este compuesto se observan en las figuras 4.6.

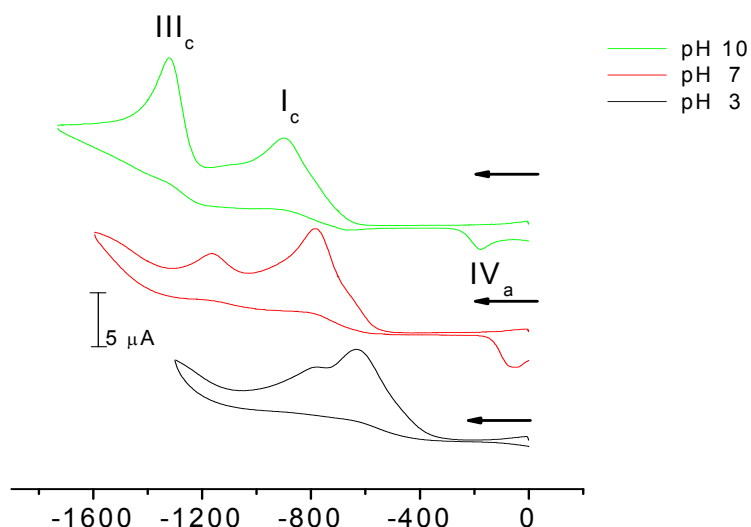
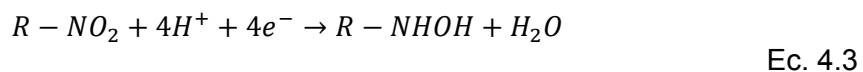


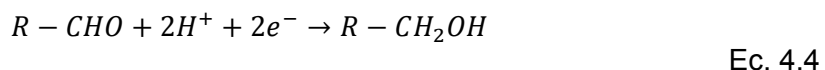
Figura 4.6. (A) VCs de 4N-1MelmzCHO en medio Buffer Britton Robinson 0,1 M / Etanol (70/30) a diferentes valores de pH, velocidad de barrido de 1 V/s (La flecha indica la dirección del barrido).

A velocidades de barrido bajas este compuesto presenta dos señales principales de tipo irreversible (I_c y III_c) en todo el rango de pH. Asimismo, a pHs básicos se observa un desplazamiento a potenciales más negativos para este compuesto, produciéndose una separación de los picos y un aumento considerable de la intensidad de corriente para ambas señales. Junto con lo anterior surge una señal en el barrido anódico (IV_a) a potenciales cercanos a los -200 mV.

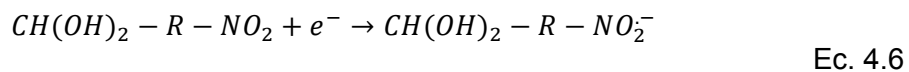
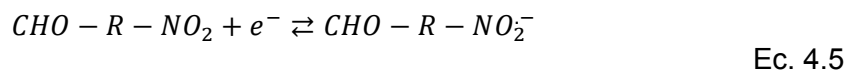
A pH 10 la principal señal irreversible (I_c) corresponde básicamente a la reducción del grupo nitro vía 4 electrones 4 protones para dar el derivado hidroxilamínico correspondiente (Ec. 4.3).



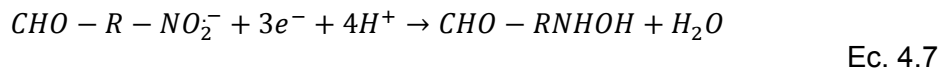
La señal III_c es generada por la reducción irreversible del grupo aldehído, localizado en la posición dos del anillo imidazólico, vía dos electrones dos protones, formando el alcohol primario correspondiente (Ec. 4.4).



Aplicando velocidades por sobre 5 V/s, a pH 10, se observa un desdoblamiento de la señal I_c originando dos nuevas señales I_{c1} y I_{c2} . La primera, podría corresponder a la reducción del grupo nitro a anión radical nitro (Ec. 4.5) y la segunda, a la reducción del grupo nitro a anión radical nitro (Ec. 4.6), pero en este caso el aldehído se encuentra en forma hidratada¹⁷ (Figura 4.7).



Además del desdoblamiento anterior, aparece una nueva señal (II_c) a -1180 mV, la cual podría corresponder a la reducción irreversible del anión radical nitro vía 3 electrones - 4 protones para dar el derivado hidroxilamínico. Este proceso podría ser descrito por:



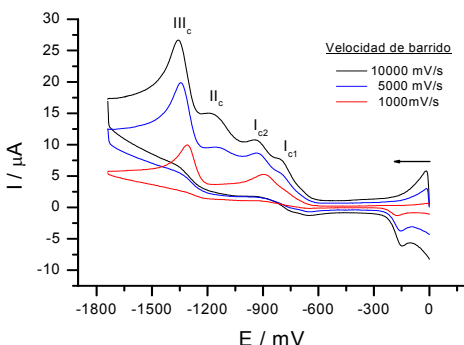


Figura 4.7 VCs de 4N-1MelmzCHO en medio Buffer Britton Robinson (0,1 M) / Etanol (70/30) a pH 10 aplicando diferentes velocidad de barrido (La flecha indica la dirección del barrido).

A pesar de trabajar a pH básico y ajustar adecuadamente el potencial de inversión (Switcing), no logramos aislar la señal correspondiente al anión radical nitro para este medio de estudio a velocidades de barrido bajas. Solo sobre 5 V/s es posible apreciar el par redox $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{*-}$ para nuestro compuesto nitroimidazólico a pH 10 (figura 4.8). De acuerdo a la figura, la cupla redox estaría formada entre los -600 y -850 mV; En esta ventana de potencial, no es posible aislar en forma completa esta señal de su par hidratado, de acuerdo a los requerimientos propuestos por Olmstead y Nicholson^{11,18,20} debido al acoplamiento que existiría entre estas señales.

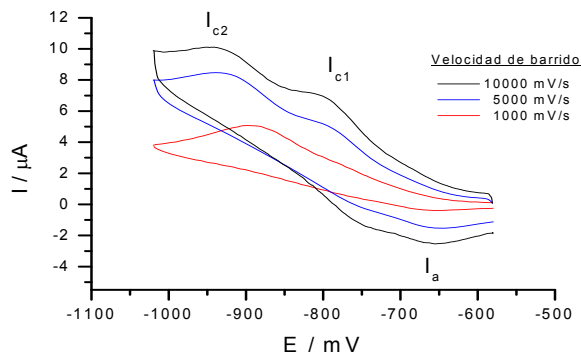


Figura 4.8 Cupla semi reversible correspondiente a la señal I_c de 4N-1MelmzCHO a pH 10, en medio tampón Britton Robinson (0,1 M) / Etanol (70/30) a diferentes velocidades de barrido.

4.2.2 DMF – Buffer Citrato (60/40)

a) Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía Tast

Las mediciones de PPD y Tast fueron realizadas con una solución de 4N-1MelmzCHO (0,1 mM) a distintos pH entre 2 y 11. Como podemos ver en la figura 4.9 se puede apreciar en este medio, un comportamiento diferente al registrado en un medio Britton Robinson/Etanol. La primera señal, atribuida al grupo nitro, experimenta un desdoblamiento (I y I') a pH superiores a 4,5 y posteriormente por sobre pH 9 experimenta un segundo desdoblamiento (II) cuya intensidad de corriente aumenta ligeramente con el aumento del pH. Por otra parte, la señal III, atribuida al grupo aldehído, solo es observada en medio ácido, alcanzando su máxima intensidad de corriente a pH 5, para luego decaer en intensidad y desaparecer por sobre pH 7.

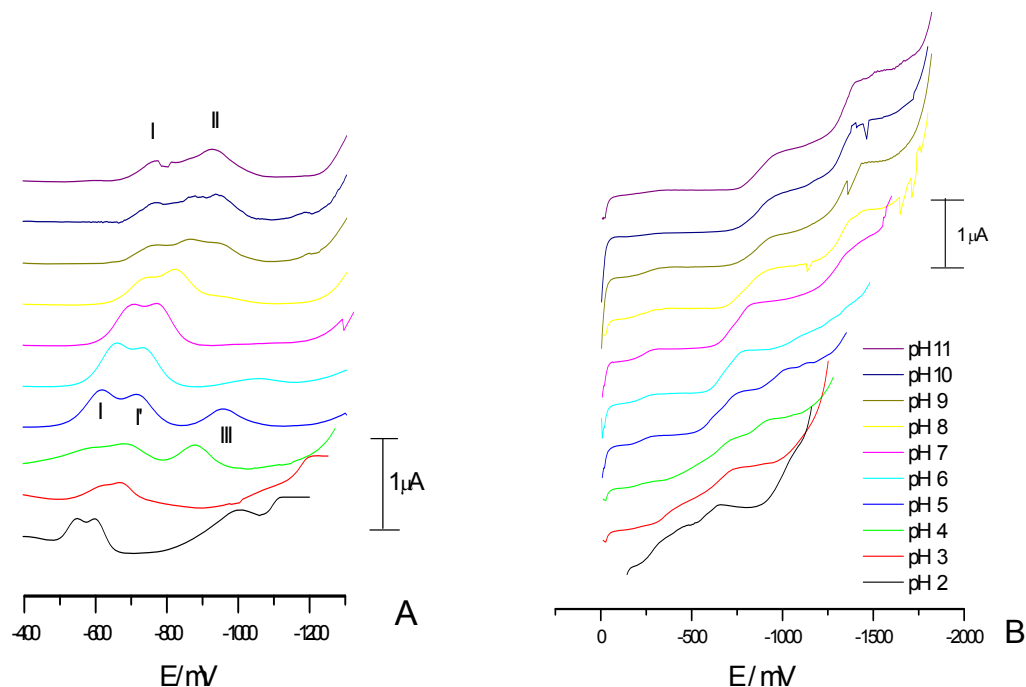


Figura 4.9. Polarogramas de pulso diferencial (A) y tast (B) de 4N-1MelmzCHO (0,1 M) en buffer DMF / Citrato (60/40) a diferentes pHs

De acuerdo a los gráficos de potencial de pico (E_p) versus pH y potencial de media onda ($E_{1/2}$) versus pH (figura 4.10 A y C), la reducción del 4N-1MelmzCHO es afectada por los cambios de pH en este medio, apareciendo hasta cuatro señales en la ventana de pH estudiado (figura 4.9.). Estas señales de potencial son linealmente dependientes con respecto al pH de la solución, hasta pH 9, sobre éste pH se produce el desdoblamiento de las señales I y I', generando la señal II e independizando los potenciales de pico y de media onda con respecto al pH.

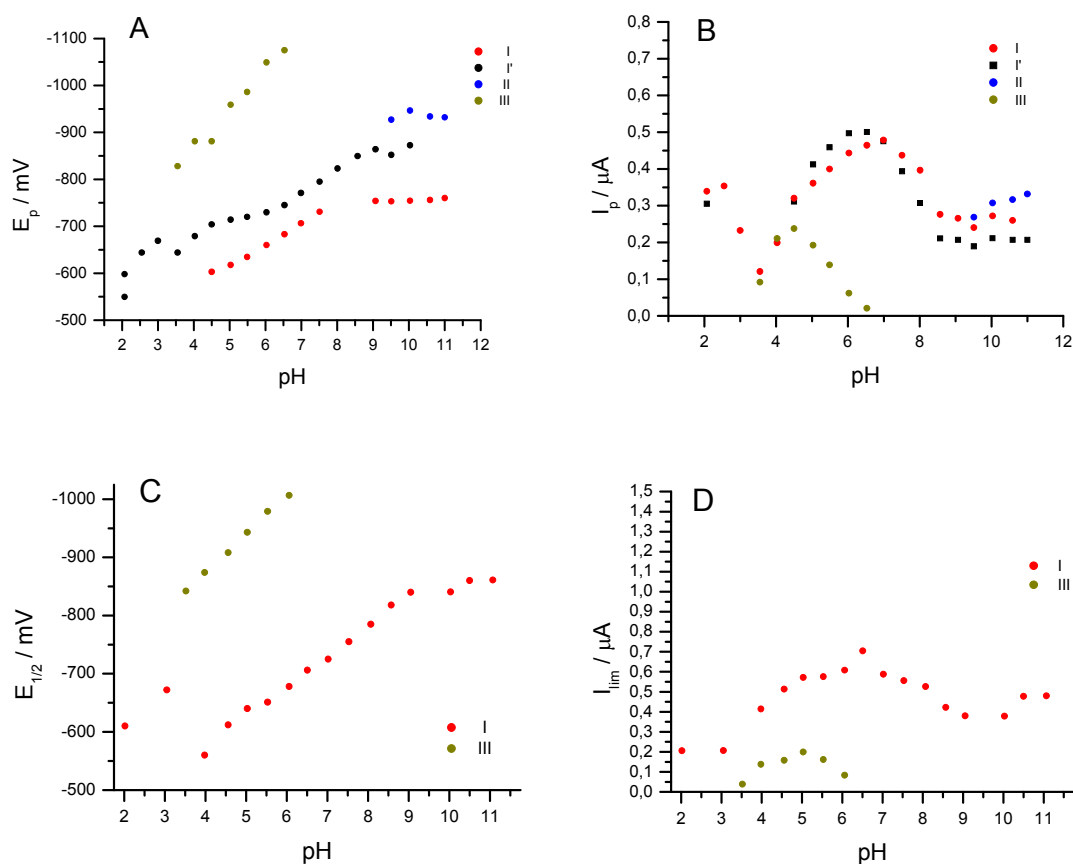


Figura 4.10. Dependencia del potenciales de pico (A) y corriente de pico (B) con respecto al pH, además dependencia del potencial de media onda (C) y corriente limite (D) con respecto al pH de 4N-1MelmzCHO (1 mM), en medio Buffer DMF / Citrato (60/40).

La figura 4.10 (B) indica la dependencia de la corriente de pico con respecto al pH, mostrando que el comportamiento para la señal I, I' y II son similares a la del 4-nitro-Imidazol¹⁹. Por otro lado, la señal III, correspondiente al grupo aldehído, solo es observable en medio ácido.

Además, las corrientes límites obtenidas por polarografía Tast (I_{lim}/pH) muestran solo dos señales, La primera debido a la poca separación entre los picos I, I' y II_c y la segunda atribuida al grupo aldehído (señal III). Las intensidades de corriente para ambas señales son independientes respecto al pH, indicando que la transferencia electrónica es constante para estas señales. Estos resultados se deben principalmente a la menor sensibilidad y selectividad que posee esta técnica respecto de PPD (figura 4.10.(D)).

b) Espectrofotometría de Absorción UV-Visible

Al estudiar el compuesto, podemos observar una única señal a un λ_{max} de 300 nm, la cual es independiente a los cambios del medio. La variación de la absorbancia en función del pH se aprecia en la figura 4.11.

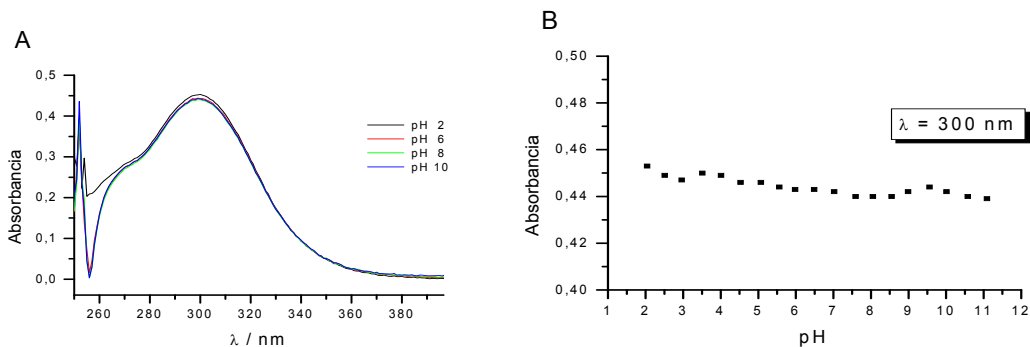


Figura. 4.11. (A) Espectro UV de 4N-1MelmzCHO (0,01 mM) en un medio DMF / Buffer Citrato (60/40), a diferentes pH. (B) Dependencia de la absorbancia con respecto al pH, a λ_{max} de 300 nm de 4N-1MelmzCHO.

c) Voltametría Cíclica

Las mediciones se realizaron en una solución de trabajo 1 mM de 4N-1MelmzCHO, donde se observó la reducción del compuesto a pHs 3, 7 y 10, utilizando un electrodo de gota colgante de mercurio. Los voltamogramas cíclicos a distintos pHs para este compuesto se observan en las figuras 4.12.

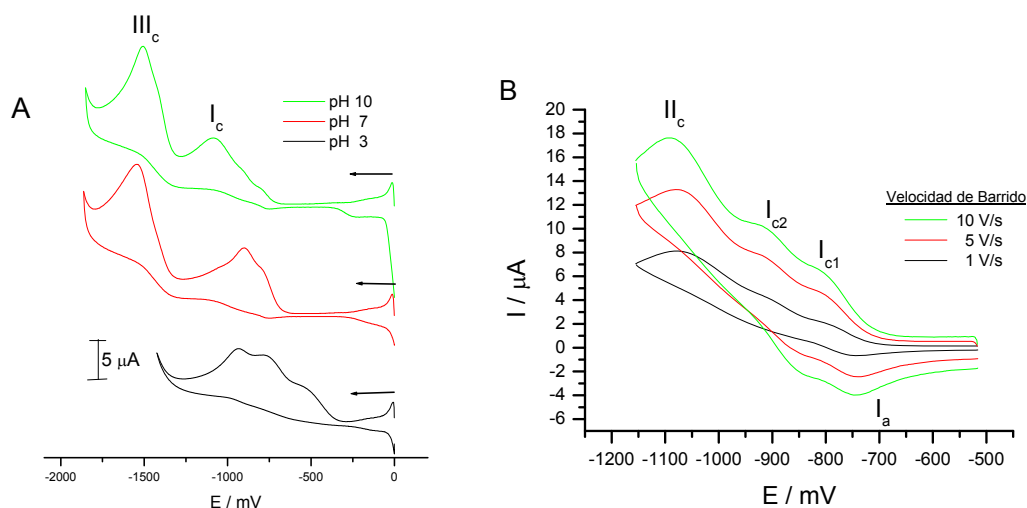


Figura 4.12. (A) VCs de 4N-1MelmzCHO en medio DMF / Buffer Citrato (60/40) a diferentes valores de pH, velocidad de barrido de 1 V/s (La flecha indica la dirección del barrido). (B) VCs de de 4-MNImCHO a pH 10, en medio DMF / Buffer Citrato (60/40) a diferentes velocidades de barrido.

En base a lo anterior, podemos señalar que las señales I_{c1} y I_{c2} podría corresponder a la reducción del grupo nitro a anión radical nitro de los compuestos deshidratado e hidratado respectivamente (Ec. 4.5 y Ec. 4.6). La señal II, observada sobre pH 9, es podría atribuirse a la reducción irreversible vía tres electrones cuatro protones para generar el derivado hidroxilamínico (Ec. 4.7) y por ultimo, la señal III podría corresponder a la reducción del grupo aldehído al derivado alcohol (Ec. 4.4).

En la tabla 4.2 se presentan valores de potenciales de pico catódicos correspondientes al 4N-1MelmzCHO registrados en medio mixto, apreciando que en medio Britton Robinson / etanol es más fácil su reducción.

<i>pH / -Ep (mV)</i>	<i>Britton Robinson / etanol (70/30)</i>	<i>DMF / buffer citrato (60/40)</i>
4	528	678
7	682	706
10	734	761

Tabla 4.2. Tabla de comparación de los potenciales de pico, correspondiente a la reducción de 4N-1MelmzCHO en medio mixto.

4.3 Caracterización Electroquímica en Medio no Acuoso

a) Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) y Polarografía TAST

El estudio se realizó en una solución de 4N-1MelmzCHO de concentración 0,1 mM en medio no acuoso (100% DMF), utilizando PTBA (0,1 M) como electrolito de soporte. Éste compuesto, en ambas técnicas, presenta solo una señal electroquímica, correspondiente a la reducción del grupo nitro (figura 4.13).

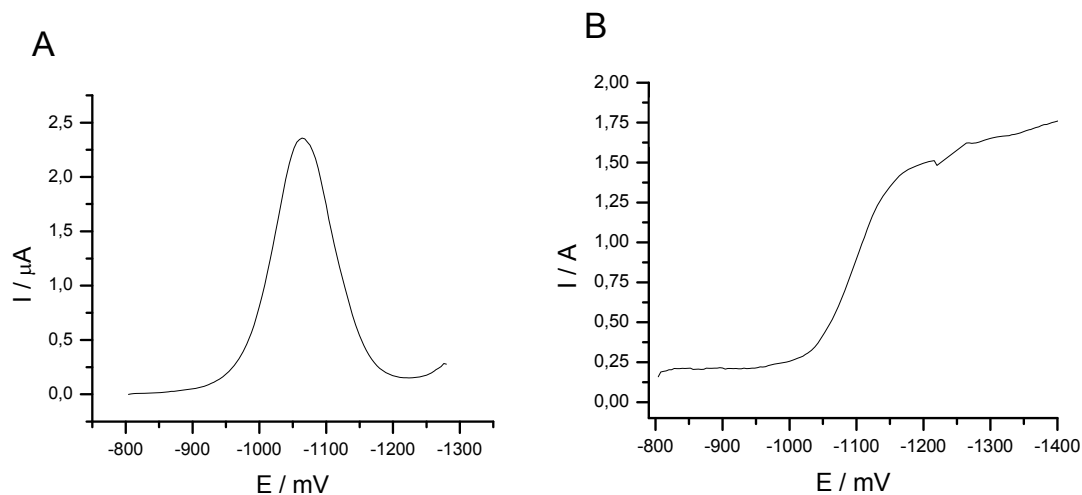


Figura 4.13. PPD (A) y tast (B) de 4N-1MelmzCHO (0,1 mM) en DMF 100% + 0,1 M PTBA.).

Los valores de potencial de media onda ($E_{1/2}$), potencial de pico (E_p), corriente límite (I_{lim}) y corriente de pico (I_p), para este medio en estudio, son presentados en la siguiente tabla 4.3.

PPD		Tast	
E_p (mV)	-1064	$E_{1/2}$ (mV)	-1088
I_p (μ A)	2,26	I_{lim} (μ A)	-1,11

Tabla 4.3 Potenciales de pico (E_p), potenciales de media onda ($E_{1/2}$), corriente de pico (I_p) y corriente limite (I_{lim}) para 4N-1MImzCHO (0,1 mM) en DMF 100% + 0,1 M PTBA.

b) Voltametría Cíclica

El estudio mediante voltametría cíclica, se realizó en medio no acuoso con una concentración de 1 mM 4N-1MImzCHO, en DMF 100% más PTBA 0,1 M como electrolito soporte (figura 4.14.), la señal estudiada, entre -1022 y -1158 mV, corresponde a la reducción del grupo nitro en el derivado anión radical nitro (Ec. 4.5).

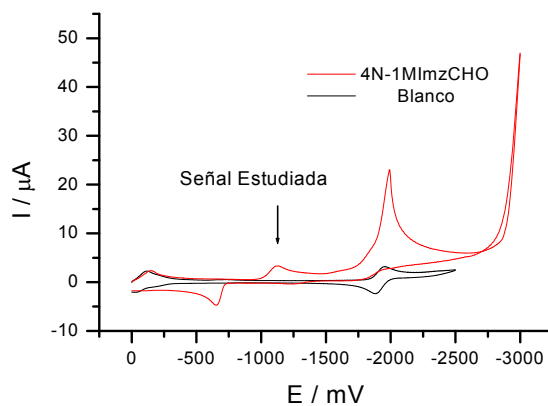


Figura 4.14. CV correspondientes al Barrido completo de 4N-1MImzCHO (0,1 M) estudiado a 1V/s, en una solución DMF 100% con PTBA 0,1 M.

Aislamiento del Anión Radical

En la figura 4.15 se puede observar la señal electroquímica del par redox, observándose que los potenciales de pico se desplazan, aumentado la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico, a medida que aumentamos la velocidad de barrido, indicando que el proceso no es completamente reversible.

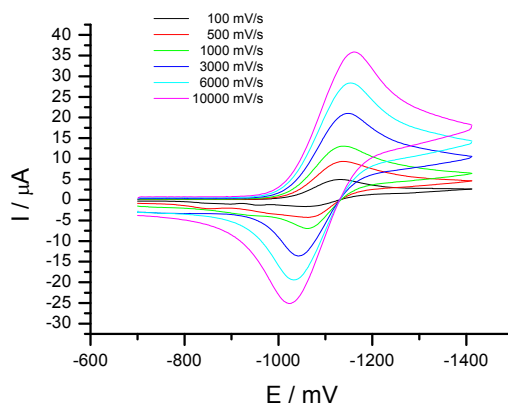


Figura 4.15. CV correspondientes al Aislamiento de la cupla cuasi reversible de 4N-1MImzCHO 0,1 M; estudiado a distintas velocidades de barrido, en una solución DMF 100% con PTBA 0,1 M.

En la figura 4.16 observamos la dependencia entre la corriente de pico y la velocidad de barrido, obteniendo pendientes que, según las ecuaciones 3.1, 3.2 y 3.5 nos dan cuenta de procesos controlados por difusión. En el caso del 4N-1MImzCHO, el valor de pendiente es levemente inferior al valor esperado de 0,5 (para un proceso difusional)

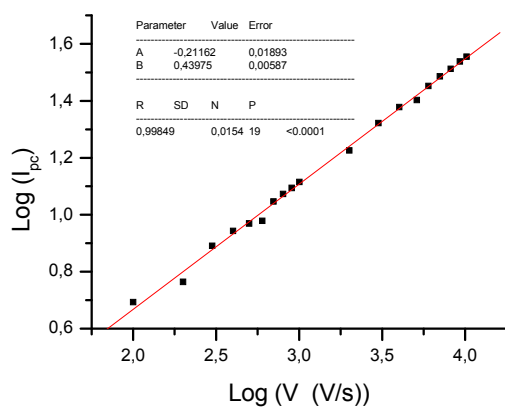


Figura 4.16. Dependencia de el $\log(I_{pc})$ sobre el $\text{Log}(\text{velocidad de barrido})$ para la cupla $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{*+}$, correspondiente a 0,1 mM de 4N-1MImzCHO en medio DMF 100% + 0,1 M de PTBA.

En la figura 4.17 podemos observar la relación de la velocidad de barrido sobre la razón de corriente (I_{pa}/I_{pc}) y el diferencial entre el pico catódico y anódico (ΔE_p) respectivamente. La primera relación, incrementa con el aumento de la velocidad de barrido hasta alcanzar valores cercanos a la unidad (figura 4.17 A). Por otro lado, la segunda relación, mantiene un comportamiento reversible a velocidades bajo 0,8 V/s, por sobre esta velocidad de barrido, la señal cambia a un comportamiento cuasi reversible (figura 4.17 B).

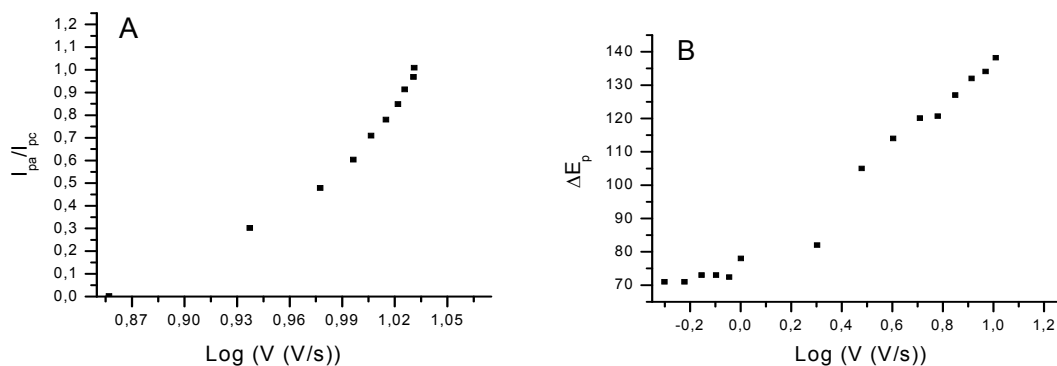


Figura 4.17. Dependencia de la razón de corriente sobre la velocidad de barrido (A) y dependencia de ΔE_p sobre la velocidad de barrido (B), de 4N-1MImzCHO 0,1 M en DMF 100% + PTBA 0,1 M.

Estos resultados nos llevan a concluir la existencia de una reacción química cuasi reversible, seguida a la etapa de transferencia de carga reversible, de acuerdo al criterio de Nicholson.²⁰

Por ultimo, al linealizar los valores de Ψ interpolados en función de la velocidad de barrido, para el compuesto estudiado, obtenemos un valor de pendiente igual a 1,57 (figura 4.18).

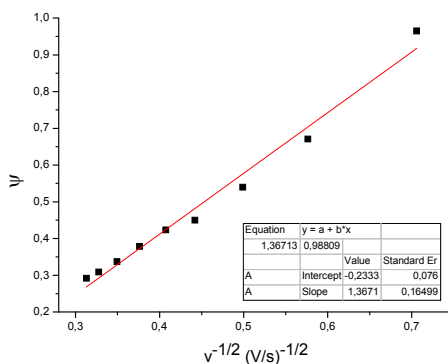


Figura 4.18. Regresión lineal obtenida a partir de los valores de Ψ y velocidad de barrido para 4N-1MImzCHO.

Al igualar la pendiente de la recta anterior (figura 4.18) con $k^{\circ}/(D_0 \cdot \pi \cdot n(F/RT))^{1/2}$ y considerando un coeficiente de difusión igual a $1,59 \cdot 10^{-5}$ (cm²/s), es posible determinar k° .

4N-1MImzCHO
($k^{\circ} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
$6,92 \times 10^{-2}$

Tabla 4.4 Constante de transferencia heterogénea para 4N-1MImzCHO, en Medio 100 % DMF

5. CONCLUSIÓN

Sólo fue posible sintetizar el derivado 1-metil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído. Para los demás compuestos, 1-H-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído y 1-bencil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído, no fue posible completar su síntesis, debido a fracasos en sus rutas de síntesis o ínfimos rendimientos.

Pese a lo anterior, para este nuevo compuesto sintetizado se estudió su comportamiento electroquímico tanto en medio acuoso mixto como no acuoso, pero sólo en este último medio es posible generar un anión radical nitro capaz de ser detectado dentro de la escala de tiempo de la técnica voltamétrica cíclica y aislar la señal del anión. En medio mixto fue imposible aislar completamente la señal correspondiente al anión radical nitro mediante voltamétrica cíclica.

La facilidad de reducción de este compuesto varía con el medio de estudio, siendo el medio Britton Robinson / Etanol (70/30) el más favorecido. Por el contrario, se encontró que el medio menos favorecido corresponde al medio no acuoso (100% DMF) al poseer potenciales de reducción elevados.

Además, a pH 10 el potencial de reducción atribuido al 4N-1MImzCHO fue el más pequeño, en comparación a sus homólogos tanto sustituidos como no sustituidos. Este comportamiento es atribuido al carácter atractor del grupo aldehído, en la posición dos del anillo imidazólico. Sin embargo, solo a pH cercanos a 7, el potencial de reducción del 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol fue ligeramente inferior al compuesto en estudio.

6. ANEXO SÍNTESIS.

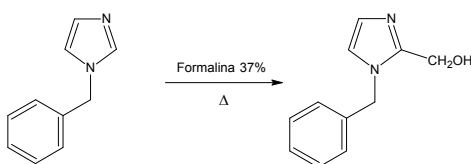
6.1 Estrategia de síntesis: 1-H-4-nitroimidazol – 2-carboxaldehído y 1-bencil-4-nitroimidazol – 2-carboxaldehído.

Hasta el término de esta tesis, solo fue posible sintetizar un compuesto, de los tres propuestos inicialmente, debidos principalmente a fallidas estrategias sintéticas o ínfimos rendimientos de producto final.

Pese a lo anterior y en afán de instruir a la comunidad científica sobre estas rutas, las he incluido en esta tesis, con el fin de que sean usadas como futuras referencias.

Las siguientes rutas sintéticas buscan elaborar 1-H-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído y 1-bencil-4-nitroimidazol- 2-carboxaldehído.

a) Síntesis de 1-bencil-2-hidroximetilimidazol



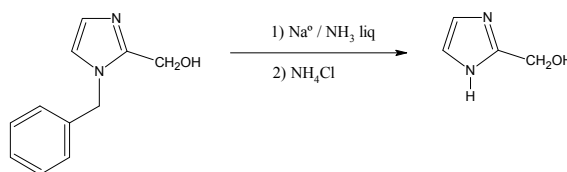
Se preparó una solución de 10 gr de 1-bencilimidazol en 90 mL de formaldehído al 37% calentándose a reflujo por 27 hrs. La solución resultante se lavó con etanol y se evaporó al vacío, resultando un líquido viscoso (jarabe) de color amarillo, el cual no cristaliza.

Rendimiento: Se obtuvieron 20 gr de producto impuro Rf (Bz:MeOH:ACOH) = 45:4:1): 0,55

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm). 4,75 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 5,20 (s, 1H, C-OH); 5,35 (s, 2H, Bz- $\text{CH}_2\text{-N}$); 6,40 (d, 1H, $-\text{CH}=\text{CH-N}$, $j = 1$ Hz); 7,25 (d, 1H, $-\text{CH}=\text{CH-N}$, $j = 1$ Hz); 7,4 (m, grupo Bz).

^{13}C NMR (75,5 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm). 49 (Bz- $\text{C-CH}_2\text{-N}$); 56 ($\text{C-CH}_2\text{-OH}$); 121 (N- $\text{C}=\text{C}=\text{N-CH-CH}_2\text{-Bz}$); 126 (N- $\text{C}=\text{C}=\text{N-CH}_2\text{-Bz}$); 128-138 (Bz); 158 (N= C-N).

b) Síntesis de 2-hidroximetilimidazol

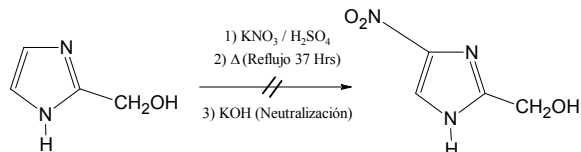


Se agregó 20 gr (0,106 moles) de 1-bencil-2-hidroximetilimidazol en una cantidad suficiente de amoníaco líquido recién preparado (70 mL de amoníaco líquido por cada 10 gr de 2-hidroximetilimidazol), luego se agregaron pequeñas piezas de Na^+ (6,8 gr; 0,29 moles) hasta obtener un color azul permanente. La solución se neutraliza con 24,4 gr de cloruro de amonio (0,46 moles), en pequeñas porciones. La mezcla resultante se extrajo con 200 mL (40 ml X 5) de alcohol absoluto y se concentrada al vacío hasta sequedad, apareciendo un jarabe de color café claro. Si aparece un sólido (sales) se agrega etanol absoluto frío, se filtra y nuevamente se evapora hasta sequedad. El jarabe no cristaliza.

Rendimiento: 70 % Rf (Bz:MeOH:ACOH = 45:4:1): 0,43

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm). 4,50 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 7,05 (d, 2H, N- $\text{CH}=\text{CH-N}$, $j = 1,22$ Hz para ambos protones); 7,06-7,2 (m, señal achatada y ancha, presencia de una grupo alcohol o amina).

c) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol



La síntesis de este compuesto es esencial ya que no solo forma parte de la ruta sintética del 1-H-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído, sino que además, constituye un precursor para la elaboración de 1-benzil-4-nitroimidazol-2-carboxaldehído al ser bencilado y posteriormente oxidado a aldehído.

Etapa sintética

A una mezcla formada por 0,5 gr (3,49 mmoles) de 2-hidroximetil-imidazol y 1,02 gramos (10,13 mmoles) de nitrato de potasio, se le agrega lentamente sobre 3 mL (0,432 moles) de ácido sulfúrico sin sobrepasar los 50° c.

Manteniéndose en un baño de agua por 3 horas a una temperatura entre 65 - 75° C, se agitó a temperatura ambiente por 15 hrs. El producto se neutraliza con hidróxido de potasio hasta pH 7-8. Se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 5). Se secó con sulfato de sodio anhidro por 24 hrs y posteriormente se concentra al vacío.

El sólido se recrystalizó en acetona seca, obteniéndose 66 mg (13,3 %) de cristales amarillo claro.

Rf (CH₂Cl₂:AcOEt = 9:1) : 0,52

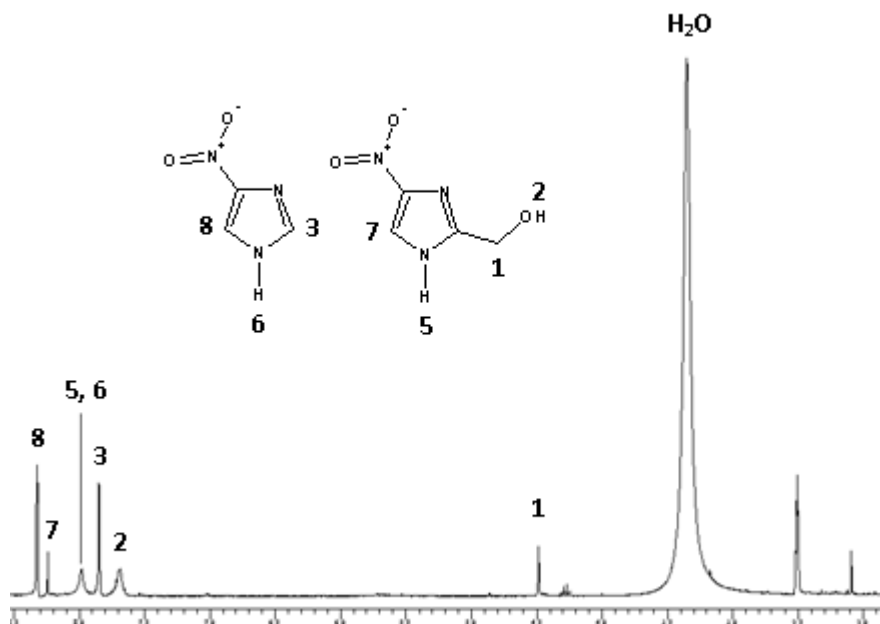
Caracterización por $^1\text{H-NMR}$ 

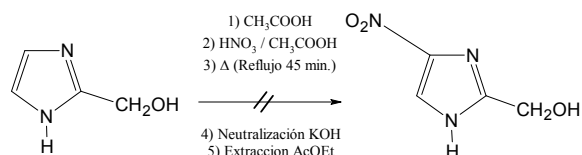
Figura 6.1 $^1\text{H-NMR}$ perteneciente al compuesto resultante de la síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol.

Como podemos observar, en la reacción de nitración se produce una deshidroximetilación, en la posición dos del anillo imidazólico, generando 4-nitroimidazol (reactivo comercial). A pesar de enfriar la reacción al ocurrir el alza de temperatura, la reacción de deshidroximetilación descompone el 95% del reactivo inicial (razón de altura, entre el compuesto hidroximetilado con respecto al deshidroximetilado), indicando que la presencia del ácido sulfúrico y nitrato de potasio oxida al grupo alcohol hasta el ácido carboxílico, y éste último, posteriormente se descarboxila.

En base a lo anterior, fue necesario controlar y suavizar más la reacción de nitración del 2-hidroximetilimidazol, con el fin de evitar la reacción de deshidroximetilación.

6.2 Otros ensayos de nitración

a) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol ²¹

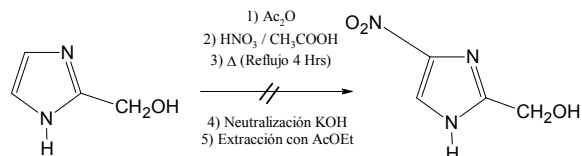


Se pesan 500 mg (5,09 mmoles) de 2-hidroximetilimidazol, los cuales son enfriados a -5°C en un baño de agua/hielo (adición de NaCl), posteriormente son agregados 18 mL de CH_3COOH glacial. A continuación se agregan 9 mL de HNO_3 (69%) gota a gota, con agitación vigorosa, no sobrepasando una T° de -3°C . Por último, se deja la solución con agitación a T° ambiente por 24 Hrs

La solución se neutralizó con KOH y se extrajo con acetato de etilo (6 X 20 mL). El extracto se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose una mezcla de compuestos (final e inicial) con un rendimiento menor al 5 % (23 mg de mezcla)

El reactante al ser líquido fue separado del producto en forma de cristales. Por la baja producción fue imposible caracterizarlo por RMN, solo se realizaron determinaciones por TLC dando una señal o marca con un r_f de 0,3 distinto del reactante (r_f 0,04 (CH_2Cl_2 : AcOEt) (9:1))

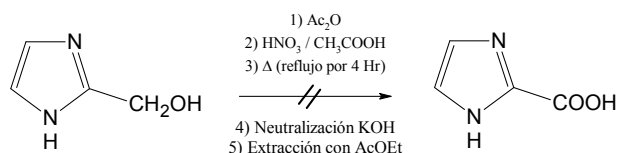
La síntesis anterior también se realizó en caliente, a una temperatura controlada de 60°C , posterior a la etapa de adición del HNO_3 , logrando resultados similares a los anteriores (42 mg de mezcla).

b) Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetilimidazol^{22,23}

Se pesan 500 mg de 2-hidroximetilimidazol, los cuales son enfriados a -5° C en un baño de agua/hielo (adición de NaCl), posteriormente son agregados 3,8 gr (36,7 mmoles) de Ac₂O a la misma temperatura. Por otra parte; 6,12 gr (0,102 moles) de Ac₃COOH son adheridos a 1,19 gr (12,2 mmoles) de HNO₃, gota a gota, no sobrepasando los 10° C (reacción exotérmica), con agitación vigorosa constante.

La solución es puesta a reflujo por 4 Hrs, posteriormente son adheridos 20 gr de una mezcla agua/hielo (descomposición de Ac₂O) y puesta en un soporte metálico con agitación por 24Hrs.

Caracterización por TLC mostró que el producto no es nitrado en forma exitosa, sino que el grupo alcohol es oxidado a ácido carboxílico, debido al ambiente oxidante de la reacción.

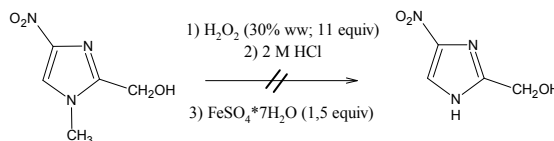


Además de lo anterior, otros grupos protectores²⁴ como tiocarbonilos y acetatos fueron usados para proteger al grupo hidroximetilo, ubicado en la posición dos del anillo imidazolico. Sin embargo, debido a sus malos rendimientos fueron descartados.

6.3 Reacciones de desmetilación

Al no encontrar buenos resultados, fue necesario cambiar la metodología de síntesis, tomando como reactivo de partida 1-metil-4-nitro-2-hidroximetilimidazol e iniciando reacciones de desmetilación en la posición uno del anillo imidazólico, con el fin de sintetizar 4-nitro-2-hidroximetilimidazol.

a) 1° N-Desmetilación de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol



Se procedió a realizar una N-desmetilación del compuesto en la posición uno, usando una modificación no clásica de la reacción de Polonovski.^{25,26}

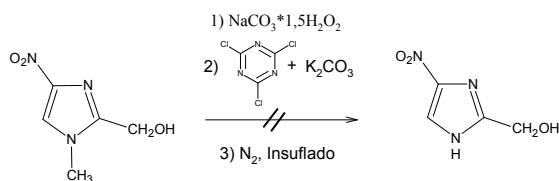
500 mg (3,2 mmol) de 1-metil-2-hidroximetil-4-nitroimidazol fueron disueltos en 20 mL de metanol P.A. y enfriados en un baño de agua-hielo. Peróxido de hidrogeno (30 % w.w.; 11 equiv) fueron adheridos lentamente, y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente por 18 Hrs. El exceso de peróxido fue desactivado adicionando MnO₂ (98 %; 150 mg), la solución fue filtrada y posteriormente concentrada al vacío al vacío, obteniéndose un precipitado amarillo claro como crudo.

El crudo de reacción fue disuelto en 22 ml de metanol P.A.; enfriado sobre hielo y acidificado a pH 1-2 mediante una solución de HCl 6 M. Esta solución fue extraída con AcOEt (5 X 20 mL). El extracto es secado (MgSO₄ anhidro), filtrado y concentrada al vacío lográndose un precipitado amarillo. Este precipitado fue disuelto en 30 mL de metanol P.A. y enfriado en un baño de agua-hielo. FeSO₄*7H₂O (1,5 equiv)²⁷ fueron agregados manteniéndose la agitación por 6 Hrs. a temperatura ambiente.

El solvente es evaporado al vacío, una vez que el producto fue secado, es redisolto mediante una solución 0,1 M de EDTA, basificada a pH 10 (NH_4^+OH , 25% solución acuosa). La solución fue extraída con AcOEt (3 X 20 mL), la fase orgánica es secada con MgSO_4 anhidro, filtrada y concentrada al vacío obteniéndose un precipitado amarillo claro.

En virtud del desconocimiento en los cambios de r_f , se continuó con la síntesis hasta el final, en ninguna de las etapas anteriormente nombradas se detectó un cambio en los valores de r_f con respecto al reactivo inicial, concluyendo que la desmetilación, por parte del 1-metil-2-hidroxi-4-nitroimidazol, no ocurrió.

b) 2° N-Desmetilación de 1-metil-2-hidroxi-4-nitroimidazol



500 mg (3,18 mmoles) de 1-metil-2-hidroxi-4-nitroimidazol fueron disueltos en 50 mL de THF, posteriormente, se adicionaron 5,5 gr (17,5 mmoles) de percarbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}_2$; 30%), agitándose a temperatura ambiente por 18 Hrs. Para luego ser filtrada, lavada con THF P.A. y el exceso de solvente evaporado al vacío. Esta solución, más concentrada, es enfriada a 0°C mediante baño de hielo-sal, se adicionan 6 mg de cloruro cianúrico²⁸ ($\text{C}_3\text{Cl}_3\text{N}_3$ 99%; 0,01 eqiv) y 5 mg (0,03 mmoles) de K_2CO_3 anhidro, tornándose la solución color rojiza. La mezcla fue agitada a 0°C e insuflada con N_2 (para remover el HCHO formado). Después de 15 min. la mezcla fue calentada a temperatura ambiente, el sólido fue removido por filtración a través de alúmina. Posteriormente el solvente es removido en vacío obteniéndose un precipitado anaranjado. Mediante cromatografía de placa fina, no se observó cambios en los valores de r_f con respecto al producto inicial.

Ambas reacciones de desmetilación poseen una primera etapa en común, correspondiente a la oxidación del compuesto original hacia una especie N-oxidada, la cual, mediante reacciones de reducción sucesivas posteriores, logran producir la desmetilación, presumiendo que ésta etapa es determinante para la obtención de producto.

Debido a los resultados anteriores podemos concluir que la etapa de formación del n-óxido no fue lograda, recomendándose para futuras síntesis la utilización de ácido meta cloro perbenzoico como una mejor fuente de oxidación en comparación al peróxido de hidrogeno.

7. Bibliografía

-
- ¹ . Mukherje, A. Kumar, S. Seth, M. Bhaduri, A. *Ind. J. Chem.* 28B: 391, 1989.
- ² Norman, M. *Plant Physiol.* 80: 122, 1986.
- ³ Purohit, M. Srivastava, S. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. Índia.* 61^a: 461, 1991.
- ⁴ Buschini, A. Giordani, F. Rossi, C. Pellacani, C. Pelosi, G. Araújo, T. A. Zucchi, D. Poli, P. *Biochemical Phamacology.* en prensa doi :10.1016/j.bcp.2007.01.024, 2007.
- ⁵ Edwards D.I. *Biochem. Pharmacol.* 35: 53, 1986.
- ⁶ Viodé, C. Bettache, N Cenas, N. Krauth-Siegerl, L. Chauviere, G. Bakalara, N. Périé, J. *Biochem. Farmacol.* 57: 549, 1999.
- ⁷ Cosar, C. Crisan, C. Horclois, R. Jacob, R. M. Robert, j. Tchelitcheff, S. Vaupre, R. *Erzneim-forsch.* 16: 23, 1966.
- ⁸ Auria, M. D'. O'nofrio, F. D. Suwinski, J. Swierczek, K. *Tetrahedron.* 49: 3899, 1993.
- ⁹ Chu, T. Hu, S. Wei, B. Wang, X. *Bloorg. Med. Chem. Lett.* 14: 747, 2004.
- ¹⁰ Marcel Dekker. *Organic Electrochemistry.* Fourth Edition. N.Y, John Wiley ξ Sons. 1991. 150p.
- ¹¹ Richard S. Nicholson. *Analitical Chemistry.* 37(11): 1351, 1965.
- ¹² Connors K.A. Curso de Análisis Farmacéutico. En su: Ensayo de medicamento. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 1980. pp.145-153.

- ¹³ Yañez, C. Pezoa, J. Rodríguez, M. Niñez-Vergara, L. J. Squella, J. A. *J. of the Electrochemical Society*. 152: j46-j51, 2005.
- ¹⁴ Laviron, E. Vallat, A. Meunier-Prest, R. *J. of Electroanalytical Chemistry*. 379: 427-435, 1994.
- ¹⁵ Bollo, S. Finger, S. Sturm, J.C. Nuñez-Vergara L.J. Squella J.A. *Electrochimica Acta*. 52: 4892-4898, 2007.
- ¹⁶ Squella, J. A. Nuñez-Vergara, L. J. Campero, A. *J of Electrochemical Society*. 154. 4: F77-F81, 2007.
- ¹⁷ Muñoz, F. Memoria de título "Síntesis y estudio electrolítico de nitro benzaldehídos y del derivado 5,8-Quinazolidinona". Memoria para optar a la carrera de químico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica. 1996.
- ¹⁸ Olmstead, M.L. Hamilton, R.G. Nicholson, R.S. *Anal. Chem*. 41: 862, 1969.
- ¹⁹ Carbajo, j. Bollo, S. Nuñez-Vergara, L. J. *J. of Electroanalytical Chemistry*. 531: 187-194, 2002.
- ²⁰ Nicholson, R. S. *Anal. Chem*. 36: 260, 1964.
- ²¹ Simonov, A. M. Koshchienko, Yu. V. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 7(8): 1064, 1971.
- ²² Babasinian, V. S. *Organic Syntheses*. 14: 76, 1934. y 2: 466, 1943.
- ²³ Freeman, Jeremiah P. Shepard, Inella G. *Organic Synthesis*. 5: 839, 1973. y 43:83, 1963.

²⁴ Moscoso Cabello, Raúl. Memoria de título "Síntesis y caracterización electroquímica de cuatro nitroimidazoles: efecto del sustituyente en posición 1". Memoria para optar a la carrera de químico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica. 2008.

²⁵ McCamley, Kristy. Ripper, Jusytin A. Singer, Robert D. *J. Org. Chem.* 68: 9847, 2003

²⁶ Mary, Aude. Renko, Zafiarisoa. *Tetrahedron Letters.* vol. 38. Nº 39 : 5151-5152, 1997.

²⁷ Thavaneswaran, Shanti. Scammells, Peter J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 2868-2871, 2006.

²⁸ Rosenau, Thomas. Potthst, Antje. Kosma, Paul. *Tetrahedron.* 58: 9809-9815, 2002.