



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIOS DE BIOELECTROQUÍMICA, FARMACOQUÍMICA Y
MECANISMOS DE REACCION**

“SÍNTESIS DE DERIVADOS N-BENZOIL-2-(2-NITROFENIL)-1-H-BENZIMIDAZOLES. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE N-(*p*-FLÚOR)-BENZOIL-2-(2-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL Y N-(*p*-NITRO)-BENZOIL -2-(2-NITROFENIL)-BENZIMIDAZOL”.

PROFESOR PATROCINANTE:

DR. ALEJANDRO ÁLVAREZ LUEJE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTORES DE MEMORIA:

DR. ALEJANDRO ÁLVAREZ LUEJE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DR. HERNÁN PESSOA MAHANA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGANICA Y FISCOQUÍMICA

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

CHRISTOPHER DAVID CERDA CAVIERES

SANTIAGO DE CHILE

2008

*A mi Madre, por su dedicación
incansable y apoyo incondicional*

Agradecimientos

A lo largo de estos años de mi vida son muchas las buenas situaciones vividas, pero sin embargo estos años en la universidad han sido sin duda los mejores, ya que han estado llenos de situaciones que forjan el carácter para el resto de la vida.

Quisiera primero dar mis agradecimientos a la “Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas” de la Universidad de Chile, por ser un lugar tan amplio de conocimientos e ideas, en donde cada estudiante puede desarrollarse de manera libre.

Otros agradecimientos, son los que se merecen el profesor Hernán Pessoa y el profesor Alejandro Álvarez, ya que con sus ayudas y consejos fue posible el desarrollo de esta memoria.

Ahora, en este día tan importante de mi vida en el cual por fin se cumple la meta que me impuse cumplir en mis años de colegio, quiero darle las gracias a mi Madre ya que debido a su esfuerzo y apoyo, pude llegar hasta acá y convertirme en la persona que soy hoy en día.

Gracias a mi familia y mi hermana por su apoyo incondicional y porque siempre han creído en mi. Gracias a Dieguito, quien con sus risas llegó a alegrar mi vida.

Quisiera también agradecer a mis amigos de toda la vida, a quienes en su mayoría conozco desde el colegio, por haberme aguantado todos estos años y haber estado siempre en todo momento que los necesitase.

Gracias a mis buenos amigos de la universidad, quienes ya a estas alturas serán para toda la vida, los nombraría uno a uno, pero no creo que me alcance la hoja, así que los nombrare al momento del brindis.

Quisiera agradecer a Margarita, el amor de mi vida, a quien en parte le dedico este logro. Le doy las gracias por su paciencia, consejos y por apoyarme en toda “cosa” que se me ocurra, le doy las gracias por haber estado a mi lado en uno de los momentos más difíciles que me ha tocado vivir.

Por último, quiero dar mis agradecimientos a Fondecyt por financiar esta memoria.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Materiales	13
2.1.1.1 Compuestos sintetizados	13
2.1.1.2 Compuestos estudiados y caracterizados	14
2.1.2 Reactivos y disolventes	14
2.1.3 Disoluciones tampón	15
2.1.4 Material de vidrio	15
2.1.5 Otros materiales	16
2.1.6 Equipos	16
2.2 Desarrollo de síntesis y métodos analíticos	17
2.2.1 Síntesis	17
2.2.2 Caracterización electroquímica	22
2.2.3 Desarrollo de la metodología electroanalítica	25
2.2.4 Caracterización espectrofotométrica	27
2.2.5 Desarrollo de la metodología espectrofotométrica	28
2.2.6 Caracterización cromatográfica	29
2.2.7 Desarrollo de la metodología cromatográfica	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Síntesis	32
3.2 Caracterización electroquímica	32
3.2.1 Caracterización de PNB	32
3.2.2 Polarografía de pulso diferencial (PPD)	36
3.2.3 Polarografía tast (PTAST)	41
3.2.4 Desarrollo de metodologías analíticas electroquímicas	43
3.3 Espectroscopía UV- Vis.	50
3.3.1 Desarrollo de metodología analítica en espectroscopía UV- Vis.	52
3.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	55
3.5 Aplicaciones	59
3.5.1 Estudio de excipientes por polarografía de pulso diferencial	59
3.5.2 Determinación de coeficiente de partición ($\log P_{ow}$)	61
3.5.3 Determinación de constantes de acidez (pKa)	62
3.5.4 Estabilidad	65
5. REFERENCIAS	70

RESUMEN

La presente Memoria se orientó al estudio y caracterización electro-analítica de una serie de derivados N-(4-R-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-1-*H*-benzimidazoles como sustratos de interés biológico.

Los compuestos estudiados fueron sintetizados a partir de 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol, generado por condensación entre 1,2-diamino-benceno y 2-nitro-benzaldehído. Posterior reacción del benzimidazol con una serie de cloruros de aroilo, generó la serie de cuatro N-(4-R-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-1-*H*-benzimidazoles en buen rendimiento (R = NO₂, Cl, F), con la excepción del producto denominado PMNB (R= OCH₃), que obtuvo un rendimiento promedio de un 5%.

Los estudios analíticos posteriormente a la síntesis, fueron desarrollados para los compuestos denominados PNB (R= NO₂) y PFNB (R= F) y correspondieron al desarrollo y la puesta punto de metodologías analíticas reproducibles y selectivas, y su posterior aplicación en la caracterización de éstos. Dichos estudios se llevaron a cabo usando las técnicas de polarografía de pulso diferencial (PPD), polarografía tast (PTAST), espectrofotometría UV-Vis y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

En una primera etapa se llevó a cabo el estudio de influencia del pH por PPD y PTAST, el que por razones de estabilidad fue realizado en un rango de pH entre 2,0 hasta 8,2 para ambos compuestos. En este rango de pH, PFNB y PNB exhibieron dos y tres señales de reducción respectivamente: una señal principal (dos en el caso de PNB) debida a la reducción del grupo nitro y una secundaria, probablemente correspondiente al enlace azometino presente en el anillo benzimidazólico. Ambas señales son dependientes de pH, desplazándose hacia potenciales más negativos mientras más alcalino es el pH.

En una segunda etapa se desarrollaron tres metodologías analíticas para la cuantificación de los compuestos en estudio (PPD, HPLC y espectrofotometría UV-Vis), las cuales exhibieron valores adecuados de reproducibilidad (CV < 4,5%) y repetibilidad (CV < 4%), presentando linealidad en un amplio rango de concentración (4,0×10⁻⁶ M a 1,0×10⁻⁴ M) para ambos compuestos.

Por espectrofotometría UV-Vis se determinaron las constantes de acidez para cada compuesto, debidas al nitrógeno ubicado en la posición 3 del anillo imidazólico,

en ambos casos. Los valores de pK_a determinados fueron de $4,79 \pm 0,06$ para PNB y $4,86 \pm 0,06$ para PFNB.

Utilizando la técnica de HPLC se determinaron los coeficientes de partición respectivos, presentando valores de $\log P$ de 2,77 para PNB y de 3,18 para PFNB.

Además, por medio de la técnica de PPD se llevó a cabo un estudio preliminar de estabilidad para PNB a pH 3,0 y a temperatura ambiente, observándose que el decaimiento se ajusta a una cinética de pseudo orden cero ($k= 1,9571 \times 10^{-7}$ M/min), con una vida media de alrededor de 4 horas para una concentración inicial de 1×10^{-4} M.

**Synthesis of N-benzoyl-2-(2-nitrophenyl)-1-H-benzimidazole derivatives.
Development of analytical methodologies and physicochemical characterization
of N-(4-nitrobenzoyl)-2-(2-nitrophenyl)-1-H-benzimidazole and N-(4-
fluorobenzoyl)-2-(2-nitrophenyl)-1-H-benzimidazole**

SUMMARY

This Memory was orientated to the study and electro-analytical characterization of a series of derivatives N-benzoyl-2-(2-nitrophenyl)-1-H-benzimidazole as substrata of biological interest.

The studied compounds were synthesized from 2-(o-nitrophenyl)-benzimidazole, generated by condensation between 1,2-diamine-benzene and 2-nitrobenzaldehyde. The following of reaction of benzimidazole with a series of aryl chlorides, generated the series of four N-(4-R-benzoyl)-2-(2-nitrophenyl)-1-H-benzimidazole with good yield (R = NO₂, Cl, F), the exception was PMNB (R = OCH₃) with an average yield of 5 %.

Then, analytical reproducible and selective methodologies for the determination and characterization of PNB (R = NO₂) and PFNB (R = F) were carried out, by using differential pulse polarography (DPP), fast polarography (PTAST), UV-Vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC).

Both compounds exhibited two polarographic signals between pH 2-8.2: a main signal due to the reduction of the nitro group and a secondary one, probably corresponding to the azometine moiety present in the benzimidazole ring. Both signals were pH-dependent, shifting cathodically as the pH increases.

The developed methodologies for the quantification of the compounds in study (DPP, HPLC and UV-Vis spectrophotometry), exhibited adequate reproducibility (CV < 4.5 %) and repeatability values (CV < 4 %), presenting linearity in a wide concentration range (4.0×10⁻⁶ M to 1.0×10⁻⁴ M) for both compounds.

By UV-Vis spectrophotometry the acidity constants (pKa) of each compound, due to the nitrogen in the position 3 of the imidazole ring in both cases were obtained. The pKa values obtained were 4.79 for PNB and of 4.86 for PFNB.

Partition coefficients (log P) were obtained using HPLC, presenting values of 2.77 for PNB and 3.18 for PFNB.

Furthermore, preliminary stability data were obtained by DPP for PNB at pH 3 and room temperature. In such condition PNB exhibited a pseudo zero order kinetic ($k=1.9571\times 10^{-7}$ M/min) with a half life of 4 h. for a 1×10^{-4} M PNB concentration.

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de un compuesto con fines farmacéuticos se determinan en una primera etapa, las propiedades *in vitro*, incluyendo su caracterización física y química. Esta última incluye la determinación del pKa, log P, tasa y perfil de estabilidad en función del pH, entre otras. De esta forma, rápidamente y a un bajo costo se obtiene un perfil farmacéutico de la sustancia bajo estudio. En esta etapa preliminar de investigación es necesario el desarrollo de metodologías analíticas cuali y cuantitativas, selectivas y reproducibles, tanto para la cuantificación de la sustancia en cuestión en distintas matrices (con vistas a las futuras aplicaciones en ensayos biológicos), como para la caracterización química propiamente tal (determinación de la estabilidad, pKa, log P, etc.).

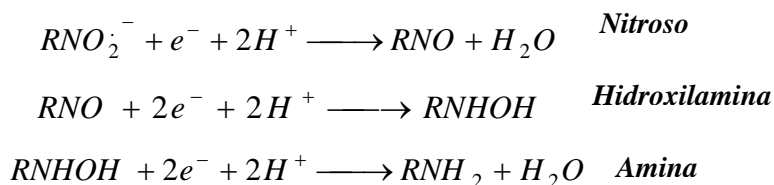
La presente Memoria se enmarca en la síntesis y desarrollo de metodologías analíticas en derivados del N-benzoil-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol y su aplicación a la cuantificación y caracterización de dos derivados benzimidazólicos: N-(4-nitrobenzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol y N-(4-flúor-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol. Estos derivados han sido seleccionados debido a que presentan una estructura donde se incluye el núcleo benzimidazólico funcionalizado con un sistema nitroaromático, ambos de reconocida y variada actividad biológica. Es así como el núcleo benzimidazólico se encuentra presente en distintos fármacos para el tratamiento de patologías muy diversas. Por ejemplo, algunos benzimidazoles son drogas de elección en el tratamiento de diversas parasitosis¹ o utilizados como agentes antibacterianos², antifúngicos³, antivirales⁴ y antineoplásicos⁵, entre otros. Por otra parte, los compuestos nitroaromáticos han sido extensamente usados como productos farmacéuticos, pesticidas y explosivos⁶⁻⁹. Para manifestar sus propiedades terapéuticas y/o citotóxicas, la mayor parte de nitroaromáticos debe sufrir la mono o bi reducción enzimática en el organismo. La mono reducción de nitroaromáticos es con frecuencia catalizada por flavoenzimas deshidrogenasas-electrontransferasas, por ejemplo, NADPH: citocromo P-450 reductasa¹⁰⁻¹² y nitroreductasas bacterianas sensibles a oxígeno¹³.

La reactividad de los nitroaromáticos con la reducción enzimática monoeléctrica aumenta concomitante con su potencial de reducción, dependiendo principalmente de factores estereo-electrónicos de la estructura en estudio. En este sentido, serán de interés aquellos compuestos que sean capaces de inducir el estrés oxidativo o inhibir enzimas específicas de detoxificación de parásitos como el *Trypanosoma Cruzi*. En general, los nitrocompuestos son buenos candidatos para interferir con el metabolismo de oxígeno, por medio de sus correspondientes aniones radicales¹⁴. En condiciones aeróbicas, la monoreducción electrónica de compuestos nitroaromáticos a su correspondiente anión radical provocan su nueva oxidación por oxígeno con la formación de superóxido y, posteriormente, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La reducción de dos electrones de los nitroaromáticos a nitroso compuestos y, posteriormente a hidroxilaminas, es catalizado en mamíferos por NADPH: quinona reductasa^{15,16} y nitroreductasas bacterianas insensibles a oxígeno¹⁷.

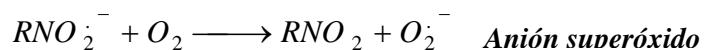
La reducción de los nitrocompuestos puede ser producida por dos diferentes vías según las condiciones del medio en que se encuentre el agente microbiano (aeróbico ó anaeróbico), pero en ambas condiciones el requisito primario es la reducción vía un electrón para la formación del anión radical nitro:



Bajo las condiciones anaeróbicas, el anión radical nitro formado, puede sufrir una serie de reacciones produciendo los siguientes derivados:



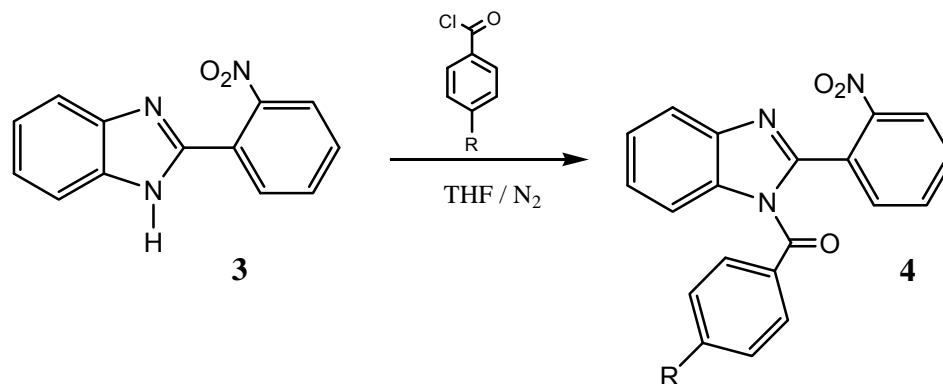
Por otra parte, en condiciones aeróbicas el anión radical nitro formado sufre una reoxidación regenerando así el compuesto nitro inicial y produciendo el anión superóxido provocando el llamado “ciclo fútil”.



En consecuencia, la incorporación de un núcleo benzimidazólico a un anillo nitroaromático, debería generar potencialmente sustancias de interés biológico. Es por ello el interés de desarrollar un estudio químico analítico para su aplicación a la caracterización básica de este tipo de compuestos, que a priori exhibe un elevado potencial biológico.

En base a los antecedentes expuestos, la presente memoria propone la síntesis de una serie *N*-(R)benzoil-2-(*o*-nitrofenil)-1H-benzimidazol (R= *p*-Cl, *p*-OCH₃, *p*-NO₂, *p*-F) y el desarrollo de metodologías analíticas cromatográficas, espectroscópicas y electroquímicas, con vistas a ser aplicadas en el estudio de la caracterización de *N*-(4-nitro-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol y *N*-(4-flúor-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol, en lo que se refiere a determinación de parámetros fisicoquímicos de interés farmacéutico, (pKa, logP), además de la realización de estudios de estabilidad.

Como ya se ha comentado, debido a la importancia que tiene el núcleo heterocíclico benzimidazólico en química medicinal, existen variadas rutas sintéticas para su obtención. En nuestro caso, la síntesis de los compuestos será realizada de acuerdo a un procedimiento previamente descrito por Pessoa-Mahana *et al*¹⁸, quienes por reacción de 2-(*o*-nitrofenil)-1H-benzimidazol con los correspondientes cloruros de aroilo¹⁹, obtuvieron los productos de *N*-benzoilación.



La funcionalización de la estructura benzimidazólica, genera por una parte mayores posibilidades de acceder a derivados con variadas actividades biológicas. Como también posibilidad de contar con más alternativas analíticas para su estudio, sobre la base de las propiedades fisicoquímicas, estructurales, espectroscópicas y electroquímicas. En este sentido, y como se comentó anteriormente, debido a las propiedades redox del grupo nitro, su reducción puede jugar un rol activo en distintos aspectos, como son las determinaciones analíticas respecto a generación, estabilidad y reactividad del radical libre. En este sentido, las técnicas electroquímicas serán de gran utilidad para el estudio de las moléculas propuestas.

El estudio de estabilidad de un compuesto con potencial actividad farmacológica constituye un quehacer que se debe llevar a cabo en etapas tempranas como fase exploratoria. Hay múltiples estudios en la literatura respecto a este punto²⁰⁻²². Además, el advenimiento de nuevas técnicas analíticas y el desarrollo tecnológico de nuevos equipamientos que facilitan la cuantificación y el desarrollo de ensayos de estabilidad y de dilucidación de productos de degradación de los mismos, ha producido un gran impacto en el área farmacéutica; tal es el caso, por ejemplo, de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección de arreglo de diodos, la cual permite la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla. En este sentido, cabe recordar que para la verificación de la estabilidad, se requiere de métodos analíticos que permitan determinar el principio activo intacto, como también los potenciales productos de degradación, y que a la vez sean

apropiados en cuanto a la sensibilidad, exactitud y reproducibilidad, y de aplicabilidad en presencia de sustancias auxiliares.

Por otra parte la biodisponibilidad de una sustancia y su posibilidad de acceder al blanco terapéutico son consideraciones importantes en el diseño racional de nuevos fármacos. Antes de que el fármaco pueda generar un efecto, por ejemplo si es administrado de forma oral, por lo general tiene que pasar una serie de barreras (membranas biológicas) por difusión pasiva y/o mediada por transportadores. Un factor que influye en la anfipaticidad de una droga es el pH, ya que dependiendo del mismo la molécula se puede encontrar formando especies hidrofílicas o hidrofóbicas. En este contexto, la afinidad de la molécula de fármaco para el sitio de interés, y su capacidad de partición en un ambiente lipofílico a distintos valores de pH, tienen que ser cuantificados para una predicción apropiada de su capacidad de actuar recíprocamente con el objetivo biológico y de ahí ser eficaz²³.

Por muchos años el coeficiente de partición 1-octanol/agua (K_{ow} , o expresado como $\log P_{ow}$) ha sido usado como una medida de lipofilidad y convencionalmente, la media estándar de la hidrofobicidad de un compuesto es el coeficiente de partición octanol-agua. K_{ow} es la proporción de equilibrio de la concentración en una fase octanol y su concentración en fase acuosa²⁴ y está estrechamente relacionada con la solubilidad acuosa de un compuesto²⁵ (por ejemplo, para un compuesto A se define como: $K_{ow} = [A]_{oct}/[A]_{agua}$).

Existen tres métodos estándar para obtener el K_{ow} de un compuesto. La clásica medición experimental, ya sea el método "slow stirring" o "shake flask"²⁶, la cual está restringida a compuestos con $\log K_{ow} < 5$. El segundo método esta basado en una relación estructura actividad cuantitativa molecular (QSAR), ampliamente estudiada por Hansch, Leo y otros²⁷. Pese a que es popular para compuestos farmacéuticos, este método no puede ser usado sin información estructural. El tercer método está basado en la correlación de K_{ow} con tiempos de retención HPLC en fase reversa^{28,29} y esencialmente se trata de obtener relaciones lineales entre $\log k'$ (factor de capacidad) y $\log K_{ow}$ con compuestos estándar^{30,31}.

Por otra parte, el parámetro de acidez pK_a es de suma importancia en la caracterización biofísica de un compuesto, además de que permite predecir el comportamiento de una sustancia *in vivo*. Debido a que existe una correlación entre el pK_a y la solubilidad de una sustancia en diferentes medios, es posible hacer predicciones referentes a la biodisponibilidad de miembros individuales de compuestos de una serie de congéneres. Específicamente, la farmacocinética y la toxicidad (ADMET: absorción, distribución, metabolismo, excreción, toxicidad) de xenobióticos dependen de su pK_a . Por lo tanto, las aproximaciones modernas para buscar nuevas drogas, requieren un rápido acceso a valores de pK_a de las drogas candidatas, por ejemplo, obtenidas por química combinatoria³².

La determinación de pK_a se hace en forma rutinaria por titulaciones pH-métricas y análisis espectrofotométrico³³. Sin embargo, estos procedimientos tienen limitaciones, tales como pobre solubilidad de los compuestos o ausencia de cromóforos, tal que las formas ionizadas y no ionizadas exhiban diferentes espectros. Debido a que muchos compuestos de interés farmacéutico tienden a tener una baja solubilidad en agua y usualmente no están disponibles en una forma de alta pureza, estas técnicas no son prácticas para todos los compuestos.

En base a los antecedentes expuestos y como OBJETIVO GENERAL, esta Memoria de Título propone *incrementar el conocimiento básico* a través del desarrollo de metodologías analíticas cromatográficas, espectroscópicas y electroquímicas, aplicadas al estudio de caracterización de dos compuestos heterocíclicos de naturaleza benzimidazólica. Principalmente en lo que se refiere a determinación de parámetros fisicoquímicos de interés farmacéutico, como por ejemplo pK_a y $\log P_{ow}$ y estabilidad.

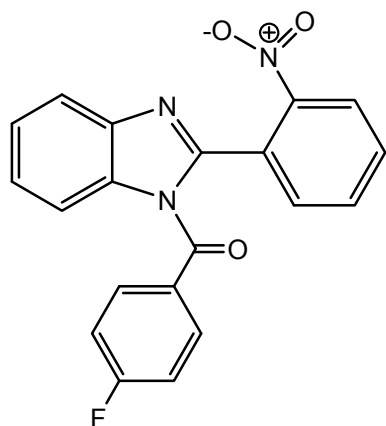
En función del objetivo general descrito, se plantean los siguientes OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Obtención de los derivados N-(4-nitro-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol, N-(4-flúor-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol, N-(4-metoxi-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol y N-(4-cloro-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol.

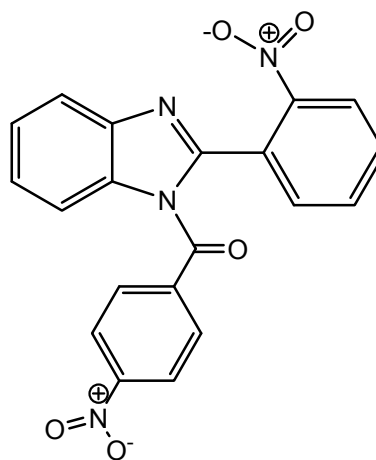
2. Implementar metodologías electroanalíticas (p.ej. polarografía de pulso diferencial), cromatográficas (HPLC-PDA) y espectrofotométricas (UV, visible), a objeto de contar con herramientas analíticas selectivas para la identificación y cuantificación de N-(4-nitro-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol y N-(4-flúor-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol.

3. Caracterizar los compuestos en estudio, haciendo uso de las herramientas analíticas previamente desarrolladas, de tal forma de determinar sus pK_a , $\log P_{ow}$, características de permeabilidad, comportamiento redox y estabilidad.

2.1.1.2 Compuestos estudiados y caracterizados



(PFNB)



(PNB)

2.1.2 Reactivos y disolventes

1,2-fenilendiamina, p.s., Sigma Aldrich

Acetonitrilo (99%) p.a., Merck

Ácido acético glacial (CH_3COOH) (100 %) p.a. Merck.

Ácido benzoico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$) p.a., Merck

Ácido bórico (H_3BO_3) p.a., Merck

Ácido clorhídrico (HCl) (36,5%) p.a Equilab

Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) (85%) p.a., Merck

Agua calidad HPLC (Milli-Q)

Almidón, calidad técnica

Avicel PH 101, calidad técnica

Benzofenona, p.a., Sigma Aldrich

Cloruro de benzoilo, p.s., Merck

Cloruro de potasio p.a. Merck

Cloruro de tionilo, p.s., Merck

Dicloro metano, calidad técnica

Difenilamina, May & Baker Ltd.

Dimetilsulfoxido (DMSO), p.a., Merck

Dióxido de titanio, calidad técnica

Etanol absoluto (etanol) (99,8%) p.a., Merck
Etanol, calidad técnica
Etil acetato, calidad técnica
Fosfato de sodio dibásico anhidro, p.a., Merck
Helio extrapuro AGA
Hexano, calidad técnica
Hidróxido de sodio (NaOH) (pellets) p.a. Merck
Hidroxiopropilcelulosa, calidad técnica
Hidroxiopropilmetilcelulosa, calidad técnica
Lactosa, calidad técnica
Metanol calidad HPLC, Merck
Mercurio metálico extrapuro
N,N-dimetilformamida (DMF) p.a. Merck
N-dodecano, (99,5%), EMD Chemicals.
Naftaleno, calidad técnica
Nitrato de potasio, p.a., Fluka
Nitrógeno extrapuro AGA
o-nitrobenzaldehido, p.s., Sigma Aldrich
PEG 400, calidad técnica
Sílica gel
Sorbitol, calidad técnica
Tabletas buffer fosfato salino, Sigma Aldrich
Talco, calidad técnica
Tetrahidrofurano, calidad técnica
Timol, calidad técnica

2.1.3 Disoluciones tampón

Tampón Britton-Robinson 0,1M
Tampón fosfato 0,2 M pH 3,0

2.1.4 Material de vidrio

Todo el material de vidrio transparente y ámbar utilizado fue clase A.

2.1.5 Otros materiales

Pipetas automáticas, eppendorf Research de volumen variable 0,5-1000 μL .

Jeringa de inyección Hamilton de 25 μL .

2.1.6 Equipos

2.1.6a Sistema voltamperométrico

Metrohm, procesador 693 VA

Electrodo de trabajo: Goteo de mercurio (EGM); Metrohm.

Electrodo de referencia: Calomelano saturado, Metrohm.

Electrodo auxiliar: Platino, Metrohm

Celda polarográfica de 25 mL, Metrohm.

Computador 486 DTK computer, modelo Multi Sync 4D, con programa de adquisición y tratamiento de datos Stand VA 693.

2.1.6b Sistema cromatográfico

Bomba WatersTM 600 Controller Millipore Model Code 6CE

Detector con arreglo de fotodiodos WatersTM 996

Columna cromatográfica Kromasil 100-5C-18 (4,6 mm×150 mm)

Precolumna C18 $\mu\text{Bondapak}$ (30 mm×4.6 mm)

Inyector Rheodyne de 20 μL .

Horno columna, WatersTM 600

Computador Pentium II con programa de adquisición y tratamiento de datos MILLENIUM versión 3.05

2.1.6c Espectrofotómetro (UV-VIS)

Espectrofotómetro UV-VIS Unicam UV2

Celdas de cuarzo de paso óptico de 10 mm

Computador Pentium III, con programa de adquisición y tratamiento de datos VISION 2.2

2.1.6d Equipos de uso general

Balanza analítica de precisión, Precisa 40SM-200A (sensibilidad 0,01 mg)

Agitador magnético, Heidolph MR 3002

Medidor de pH, WTW pMX 537

Sistema purificador de agua, Milli-Q *Ultra-Pure Water System*

Baño de Ultrasonido, Branson 2210

Estufa WTC Bindert

Agitador Heidolph DSG 304

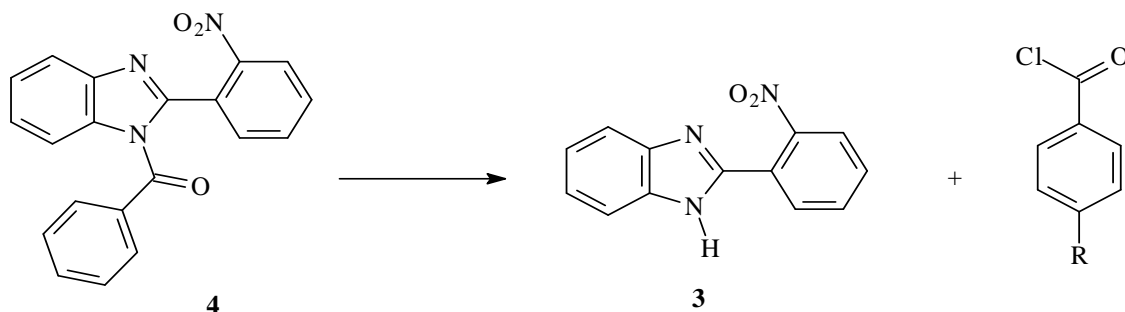
Reostato ELECTROTHERMAL 9100

2.2 Desarrollo de síntesis y métodos analíticos

2.2.1 Síntesis

Obtención de la serie *N*-benzoil-2-(2-nitrofenil)-1*H*-benzimidazoles, de estructura general **4**^{18,19}

El entorno estructural de las moléculas objetivo, toma lugar según se representa en el esquema retrosintético (I), y en la que se verifica la reacción entre un esqueleto benzimidazólico funcionalizado y el correspondiente haluro de aroílo, para generar los derivados de amida **4** (a-d)

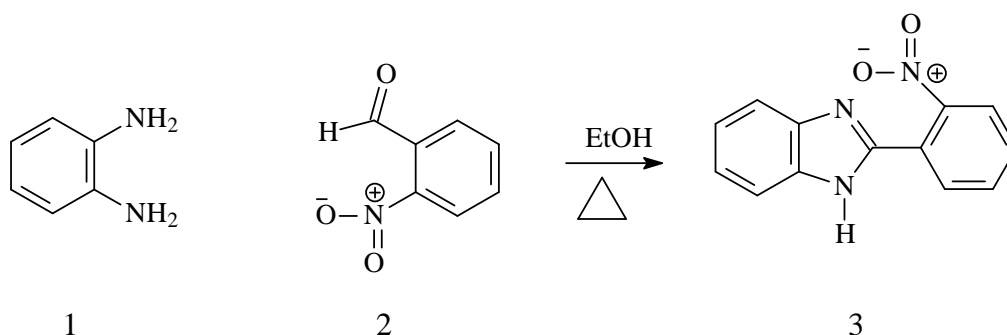


R : (a = F) / (b = NO₂) / (c = Cl) / (d = OCH₃)

ESQUEMA 1

La secuencia sintética específica considera las siguientes etapas:

Etapa 1. Condensación de 1,2-diaminobenceno (o-fenilendiamina) con 2-nitrobenzaldehído, llevada a cabo en un solvente prótico polar como etanol (Esquema 2), que estabilizaría de mejor forma los intermediarios cargados generados en el proceso.

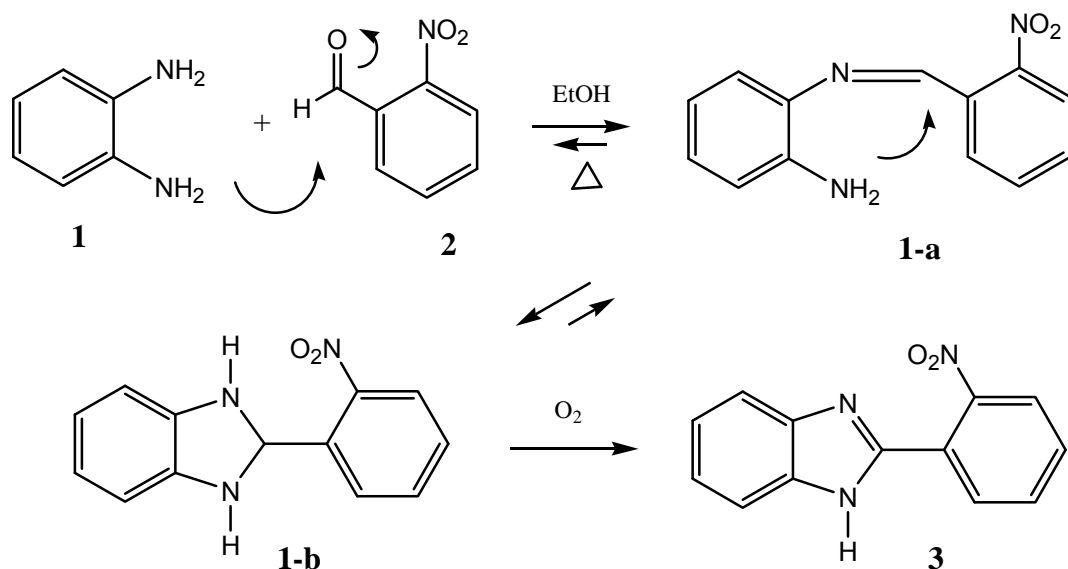


ESQUEMA 2

En esta etapa se comienza con el ataque nucleofílico del grupo amino sobre el centro electrofílico aldehídico, con formación de una monoimina intermediaria 1-a de intenso color rojo.

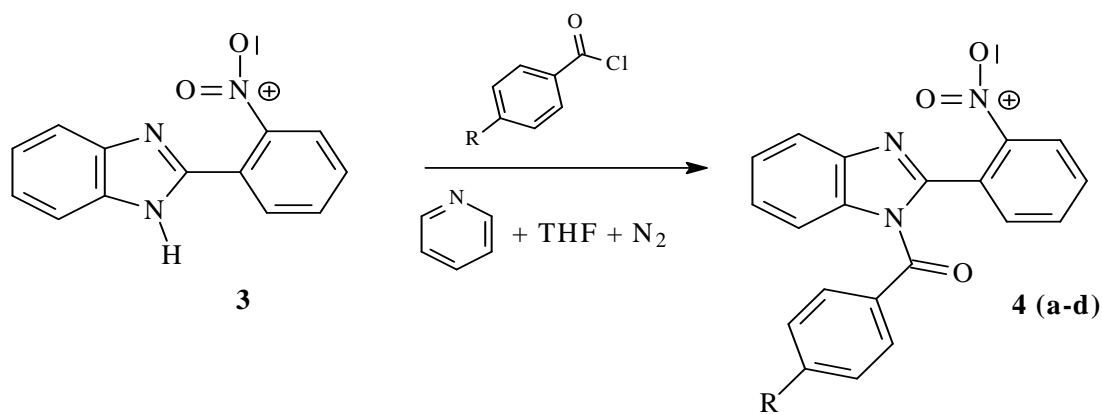
Luego de la formación del compuesto imínico 1-a, se produce un segundo ataque nucleofílico intramolecular por parte del grupo amino libre, llevando a la formación de la 2-(o-nitrofenil)-benzimidazolina intermediaria (compuesto 1-b), la que se estabiliza posteriormente en un compuesto aromático mediante una deshidrogenación radicalaria mediada por oxígeno (Esquema 3).

El producto final obtenido corresponden a cristales de color amarillo pálido, los cuales son filtrados al vacío en un embudo Büchner y luego redisolutos en etanol absoluto para purificarlos por recristalización, con un rendimiento de 55% (1100 mg).



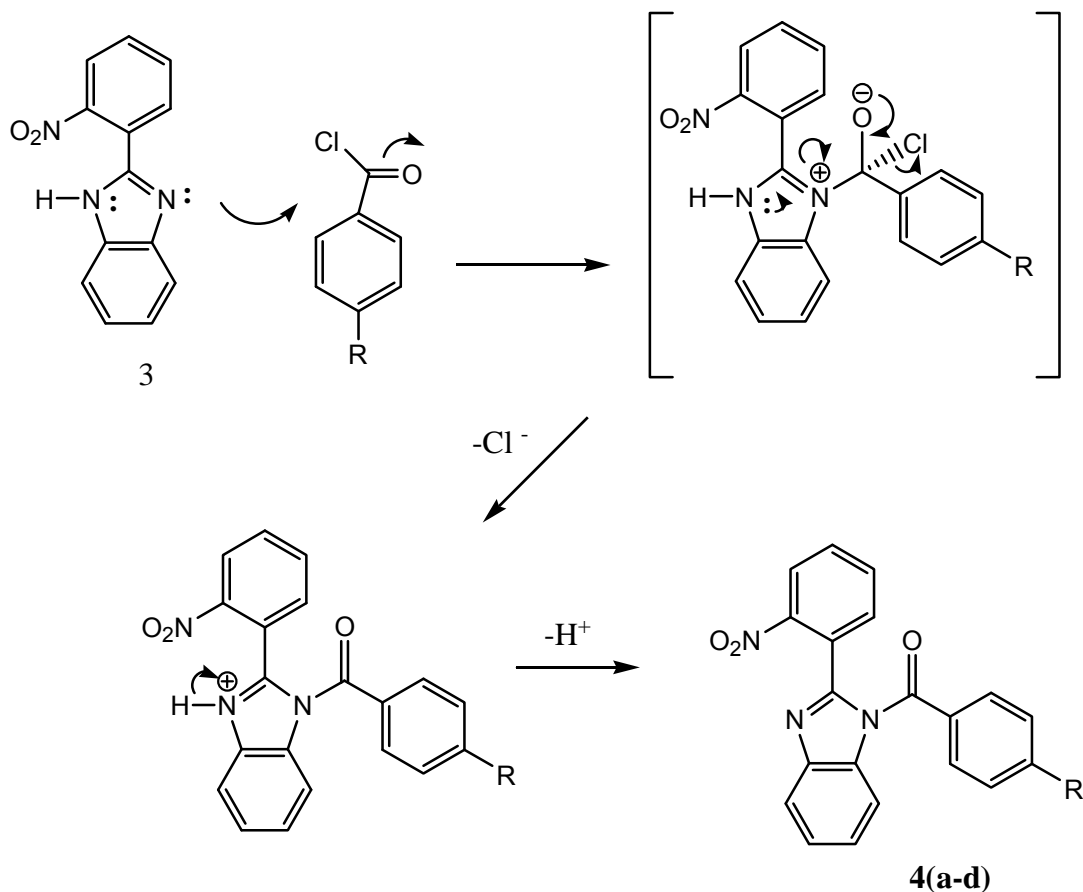
Procedimiento experimental: Se pesan 1,2649 g (8,37 mmol) de 2-nitrobenzaldehido, y se disuelven en etanol absoluto (60 mL) con agitación constante, luego se adiciona 1,2-diaminobenceno, (0,9051 g, 8,37 mmol), calentándose la reacción a 120 °C por 10 h.

Etapa 2: El benzimidazol (**3**) obtenido en la etapa 1 se trata posteriormente con una serie de cloruros de aroños en atmósfera inerte (N₂) y THF anhidro, para dar las amidas correspondientes **4 (a-d)** (Esquema 4)



4a: R = F **4b:** R = NO₂ **4c:** R = Cl **4d:** R = OCH₃

El mecanismo probable de formación se representa en el Esquema 5, y comienza con el ataque del par de electrones tipo piridínico del anillo de imidazol sobre el centro electrofílico de la función de haluro de aroílo.



ESQUEMA 5

Parte Experimental (Marcha tipo):

Se pesan 500 mg (2,092 mmoles) del compuesto **3** y se agrega aproximadamente 60 mL de tetrahidrofurano (THF) anhidro en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionan los haluros de aroílo gota a gota disueltos en THF. La solución se deja agitando a temperatura ambiente por un período de 3 h. Una vez transcurrido este tiempo se agrega agua al crudo de reacción, y se extrae con acetato de etilo (2x50 mL) y los extractos orgánicos se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y concentran al

vacío. Finalmente las mezclas crudas fueron purificadas por cromatografía en columna con gel de sílice.

Los cloruros de aroilo utilizados fueron comerciales (cloruro de 4-clorobenzoilo y el cloruro 4-fluorbenzoilo) y de síntesis (cloruro 4-metoxibenzoilo y cloruro de 4-nitrobenzoilo).

La obtención de los haluros no-comerciales contempló el siguiente trabajo sintético:

Se agregan 2,1 mmoles del respectivo ácido carboxílico luego se adiciona un exceso de cloruro de tionilo (20 mL). Esta mezcla se coloca a reflujo a unos 60°C por alrededor de unas 4 a 5 h., deteniéndose la reacción al cabo de este tiempo. Posteriormente se concentra al vacío la mezcla resultante y el crudo resultante, se disuelve en THF (20 mL) y se adiciona en corriente de N₂ a una solución del compuesto 3 en atmósfera inerte, con agitación por 24 h. a temperatura ambiente.

A continuación una se muestra una tabla resumen con los distintos compuestos obtenidos:

Tabla 1. Tabla resumen con los distintos compuestos obtenidos:

R	% de rendimiento	Intervalo de fusión
OCH ₃	5,36	128 – 129 °C
F	89	165 – 166 °C
Cl	87	126 – 127 °C
NO ₂	73	178,5 – 179,2 °C

2.2.2 Caracterización electroquímica

2.2.2.1 Preparación de disoluciones

a) Tampón Britton-Robinson 0,1 M

Se disolvieron 6,20 g de H_3BO_3 en agua Milli-Q con ayuda de ultrasonido en un matraz aforado de 1000 mL. Se agregó 6,8 mL de ácido ortofosfórico, 5,8 mL de ácido acético y se completó volumen con agua Milli-Q. Esta disolución Britton-Robinson 0,1 M permite trabajar en un rango de pH entre 2 y 12.

b) Tampón fosfato 0,2 M

Se disolvió 2,722 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en 50 mL de agua desionizada (Milli-Q), ajustando a pH 3,0 con ácido fosfórico. Se completó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada (Milli-Q).

c) Disolución stock de los compuestos en estudio

Se pesó exactamente cerca de 3,88 mg y 3,61 mg de PNB y PFNB, respectivamente, los cuales fueron disueltos en acetonitrilo con ayuda de ultrasonido y luego llevados a un volumen final de 10 mL en un matraz aforado, para obtener una disolución 1×10^{-3} M.

2.2.2.2 Polarografía de pulso diferencial (PPD)

a) Disolución de trabajo

Se transfirieron 1000 μL de disolución stock de cada compuesto en estudio en acetonitrilo a un matraz aforado de 10 mL y se completó volumen con disolución tampón acetonitrilo/tampón Britton-Robinson (30:70) para PFNB y con acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) para PNB, resultando una disolución de concentración de 1×10^{-4} M.

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo fueron burbujeadas con nitrógeno durante 10 minutos en la celda polarográfica, previo a la medición.

La temperatura de trabajo fue la temperatura ambiental.

Los electrodos usados fueron:

Electrodo de trabajo : Goteo de mercurio (EGM), Metrohm.
Electrodo de referencia : Electrodo de calomelano saturado, Metrohm
Electrodo auxiliar : electrodo de platino, Metrohm

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad : 2,5-10 μ A
Rango de potencial : 0 a -1800 mV
Tiempo de goteo : 0,60 s
Altura de pulso : 50 mV
Retardo de pulso : 40 ms
Incremento de potencial : 6 mV

c) Estudio de la influencia del pH

Se determinó el comportamiento electroquímico en el rango de pH 3,0 – 8,0 a las disoluciones de trabajo 1×10^{-4} M de PNB y un rango de pH 3,0 – 9,0 para las de PFNB. Se incrementó el pH en 0,5 unidades, empleándose soluciones concentradas de NaOH y HCl para regular este aumento. Para cada pH se realizó medición por duplicado, registrando el respectivo polarograma.

2.2.2.3 Polarografía tast (PTAST)

a) Disolución de trabajo

Se siguió la misma metodología descrita en el punto **2.2.2.2-a)**

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo en la celda polarográfica, fueron burbujeadas con nitrógeno durante 10 minutos, previo a la medición.

La temperatura de trabajo fue la temperatura ambiental.

Los electrodos usados fueron:

Electrodo de trabajo : Goteo de mercurio (EGM), Metrohm
Electrodo de referencia : Electrodo de calomelano saturado, Metrohm
Electrodo auxiliar : electrodo de platino, Metrohm

Las condiciones de operación fueron:

Sensibilidad	: 2,5 -10 μ A
Rango de potencial	: 0 a -1800 mV
Tiempo de goteo	: 0,60 s
Incremento de potencial	: 6 mV

c) Estudio de la influencia del pH

Se siguió misma metodología descrita en el punto 2.2.2.2-c)

2.2.2.5 Estudio cinético mediante polarografía de pulso diferencial (PPD)

a) Disolución de trabajo

Se siguió misma metodología descrita en el punto 2.2.2.1-a)

b) Condiciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo, en la celda polarográfica, fueron burbujeadas con nitrógeno durante 5 minutos, previo a la medición y para luego seguir realizando las mediciones de la disolución cada 20 minutos.

La temperatura de trabajo fue de 25°C, mantenida con baño termostatado en la celda polarográfica

c) Determinación del orden de reacción

Dentro de los métodos existentes para determinar orden de reacción se escogió el método gráfico³⁴. Si se grafica la concentración remanente *versus* el tiempo y la resultante del gráfico es una línea recta, se trata de reacción de orden cero. Si se grafica el logaritmo natural de la concentración remanente *versus* el tiempo y el resultado es una línea recta, se trata de una reacción de orden uno. Ahora bien, si se grafica el inverso de la concentración remanente *versus* tiempo y se obtiene una recta, se trata de una reacción de orden dos.

d) Determinación de la vida media

Vida media ($t_{1/2}$), es el tiempo necesario para que reaccionen la mitad de las sustancias iniciales presentes, es decir, el tiempo necesario para que se reduzca a la mitad la concentración inicial de las sustancias iniciales³⁵.

Para una reacción de orden cero, la vida media viene dada por ecuación 1:

Ecuación 1
$$t_{12} = \frac{[C_o]}{k_o}$$

Donde:
 k_o = pendiente de la recta para cinética de orden cero

2.2.3 Desarrollo de la metodología electroanalítica

A. Polarografía de pulso diferencial

a) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de PFNB y PNB, de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 4×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. Alícuotas de cada disolución stock de PFNB y PNB fueron transferidas a un matraz de 10 mL, completando volumen con acetonitrilo/tampón Britton-Robinson (30:70), para el caso de PFNB y de acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) para PNB. Se ajustó el pH para cada una de las soluciones de trabajo a pH 3,0 y 7,0 para PNB y pH 7,0 para PFNB. Estas soluciones fueron medidas por polarografía de pulso diferencial.

b) Estudio de repetibilidad³⁵

Se midieron 10 veces consecutivas, por la técnica de polarografía de pulso diferencial, 10 mL de disoluciones de trabajo de 9×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 6×10^{-6} M de PFNB y PNB, aforando en acetonitrilo/tampón Britton-Robinson (30:70) a pH 7,00 para PFNB y en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2M a pH 3,00 para PNB. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la corriente de pico de la señal obtenida.

c) Estudio de reproducibilidad³⁶

Se midieron 10 veces consecutivas, repitiendo el estudio de repetibilidad, por la técnica de polarografía de pulso diferencial, variando el día de medición y el operador.

d) Límite de detección y límite de cuantificación

Para la estimación del límite de detección y cuantificación³⁶ se procedió como sigue:

- ❖ A partir de la curva de calibración se obtuvo el valor de la pendiente de la recta (m).
- ❖ Se midió por duplicado cuatro soluciones en el rango inferior de la curva de calibración (2×10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 5×10^{-6} M). Para estas cuatro soluciones se obtuvo los valores promedios de la corriente de pico (I_p) y la desviación estándar (σ).
- ❖ Se representó gráficamente I_p versus la concentración de la muestra y se determinó la ecuación de la nueva recta. Al extrapolar la respuesta a concentración cero se obtuvo la respuesta del blanco (Y_{bl}).
- ❖ Se representó gráficamente σ versus la concentración de muestra y al extrapolar la respuesta a concentración cero, se obtuvo el valor de la respuesta de la desviación estándar del blanco (σ_{bl}).

El límite de detección (LD) (Ecuación 3) y el límite de cuantificación (LC) (Ecuación 4) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ecuación 3} \quad LD = \left(\frac{Y_{bl} + 3 \sigma_{bl}}{m} \right)$$

Donde,
m= pendiente de curva de calibración. Parámetro indicativo de la sensibilidad del método analítico.
 Y_{bl} = respuesta del blanco
 σ_{bl} = desviación estándar del blanco

$$\text{Ecuación 4} \quad LC = \left(\frac{Y_{bl} + 10 \sigma_{bl}}{m} \right)$$

e) Estudio de interferentes

i) Disolución de trabajo

Se transfirieron 1000 μ L de disolución stock de PFNB y PNB a un matraz aforado de 10 mL y se completó volumen con disolución acetonitrilo/ Britton-Robinson (30:70), ajustada a pH 7,0 en el caso de PFNB y acetonitrilo/ tampón fosfato 0,2 M (50:50), ajustada a pH 3,0 para PNB, resultando una disolución de concentración de 1×10^{-4} M.

ii) Condiciones de trabajo

A las disoluciones de trabajo, se adicionaron distintos excipientes (almidón, Avicel PH101, dióxido de titanio, Explotab, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, PEG 400, sorbitol, talco). En este estudio se realizaron 3 mediciones por cada solución de trabajo. Antes de agregar el excipiente debía realizarse una medición a la

solución de trabajo pero sin el excipiente y luego una vez agregado este, debía realizarse una medición por duplicado.

A todas estas soluciones se les registró su respuesta electroquímica frente a estos distintos excipientes por polarografía de pulso diferencial.

2.2.4 Caracterización espectrofotométrica

A. Preparación de disoluciones

a) Tampón Britton-Robinson 0,1 M

Se procedió de igual manera que en **2.2.2.2-a)**

b) Disolución stock de los compuestos en estudio

Se procedió de igual manera que en **2.2.2.2-c)**

c) Disolución blanco

Se realizó con acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (30:70) para PFNB y con acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80) para PNB.

B. Determinación de la constante de disociación [K_a]

A partir de disoluciones 5×10^{-5} M de PFNB y PNB se estudió la influencia del pH sobre su comportamiento espectral en un rango de pH de 2,0 a 7,0, utilizando como disolvente una disolución acetonitrilo/tampón Britton-Robinson (30:70) para PFNB y de pH 2,0 a 8,0, utilizando como disolvente en esta ocasión acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80) para PNB, a las cuales se les fue incrementando el pH en 0,5 unidades, empleando soluciones concentradas de NaOH o HCl, según sea necesario, para ajustar el pH requerido.

Las soluciones preparadas a cada pH fueron medidas en el espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico, efectuando un barrido de longitud de onda entre 200 y 400 nm.

Los resultados derivados del estudio de la influencia del pH en el comportamiento espectral de PFNB y PNB permitieron la determinación del pK_a aparente, mediante la utilización de la ecuación de Henderson - Hasselbach modificada³⁷:

Ecuación 5

$$pH = pK_a + \log \left[\frac{A_{max} - A}{A - A_{min}} \right]$$

Donde:
 A_{max} = máxima absorbancia observada en el rango de pH escogido
 A_{min} = mínima absorbancia observada en el rango de pH escogido
 A = absorbancia al pH de la disolución en el rango de pH escogido

Haciendo la representación gráfica de pH *versus* $\log [(A_{max} - A)/(A - A_{min})]$ se obtiene una recta cuyo intercepto es el valor de pK_a .

2.2.5 Desarrollo de la metodología espectrofotométrica

A. Espectroscopia UV- Vis

a) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de PFNB y PNB de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 1×10^{-5} M hasta 1×10^{-4} M. Alícuotas de la disolución stock de PFNB y PNB fueron transferidas a un matraz de 5 mL, completando volumen con acetonitrilo/tampón Britton-Robinson (30:70) para PFNB y con acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80) para PNB. Se ajustó el pH para cada una de las disoluciones de trabajo de PFNB y PNB a pH 4,0 y pH 2,5, respectivamente. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 237 nm y 263 nm para PFNB y PNB, respectivamente.

b) Estudio de repetibilidad

Se procedió de igual forma que en 2.2.3 A.b, pero en este caso las concentraciones fueron 8×10^{-5} M, 5×10^{-5} M y 1.5×10^{-5} M. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la señal obtenida experimentalmente a 237 nm y 263 nm para PFNB y PNB, respectivamente.

c) Estudio de reproducibilidad

Se repite estudio de repetibilidad, por la técnica de UV-Vis, variando el día de medición y el operador.

d) Limite de detección y limite de cuantificación

Para la estimación del límite de detección y límite de cuantificación se siguió metodología descrita en el punto **2.2.3 A.d**

2.2.6 Caracterización cromatográfica

A. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

a) Disolución stock

Se procedió de igual forma que **en 2.2.2 A.b)**

B. Determinación del coeficiente de partición [P]^{38,39}

Para la determinación de este parámetro se realizó una curva de calibración de log P *versus* log k' (k' = factor de capacidad). Para tal efecto se seleccionaron seis sustancias de referencia de coeficiente de partición octanol/agua conocidos, cercanos al coeficiente de partición estimado para PFNB y PNB (obtenidos en HyperChem 6.01, basado en el método de *Ghose, Pritvchett y Crippen*).

Se prepararon disoluciones de las sustancias de referencia, PFNB y PNB en una mezcla de metanol/agua (75:25), quedando de una concentración final de aproximadamente 1×10^{-4} M. Para finalizar a la disolución resultante se agregó 0,0080 g de KNO₃, como sustancia que no se retiene en la columna, con el fin de poder calcular posteriormente los parámetros de interés.

Las soluciones resultantes se monitorearon en las siguientes condiciones experimentales del método cromatográfico:

- ❖ Fase Móvil : metanol/ agua (75:25)
- ❖ Flujo : 1,0 mL/min.
- ❖ Volumen de inyección : 20 µL
- ❖ Temperatura : 25°C

Posteriormente se calculó el factor de capacidad para cada compuesto y se realizó la curva de calibración $\log P_{ow}$ versus $\log k$.

2.2.7 Desarrollo de la metodología cromatográfica

A. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

a) Estudios de estabilidad acelerada

i) Hidrólisis ácida

Se tomaron 3,0 mL de disolución stock de PFNB y PNB por separado y se llevaron a volumen final de 5,0 mL con HCl 36,5% en un matraz aforado. Luego se transfirió a un balón de destilación de 25 mL, conectado a un tubo refrigerante y se calentó a reflujo por una hora.

ii) Hidrólisis básica

Se tomaron 3,0 mL de disolución stock de PFNB y PNB por separado y se llevaron volumen final de 10 mL con NaOH 1N en un matraz aforado. Luego se transfirió a un balón de destilación de 25 mL, conectado a un tubo refrigerante y se calentó a reflujo por una hora.

iii) Fotólisis

Para realizar la fotólisis de los fármacos se procedió de la siguiente manera: se tomaron las dos disoluciones a fotolizar (soluciones stock), luego fueron colocadas en un lugar al alcance de la luz, en un matraz transparente y fueron mantenidas ahí por el lapso de 2 semanas.

b) Ensayo de aptitud del sistema⁴⁰

Se prepararon 10 mL de una disolución en la que contenía PNB y los productos de estudio de estabilidad acelerada (fotólisis, hidrólisis ácida e hidrólisis básica) y precursor(es) de síntesis. Para finalizar, a la disolución resultante se adicionó 0,0080 g de KNO_3 como sustancia que no se retiene en la columna, a fin de poder calcular los parámetros de interés.

Posteriormente se monitoreó la disolución resultante por HPLC, ensayándose distintas proporciones de acetonitrilo/agua, metanol/agua, acetonitrilo/tampón fosfato 50 mM, pH 4,5, donde se fue aumentando la proporción de fase orgánica en la fase móvil desde una proporción 20/80 a 80/20 (acetonitrilo/agua y/o tampón fosfato pH 4,50, metanol/agua y/o tampón fosfato pH 4.5), a fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas de trabajo.

En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α). Finalmente, luego del desarrollo de este estudio y el análisis de los diferentes parámetros, se obtuvieron las condiciones óptimas experimentales para el método cromatográfico.

c) Curva de calibración

A partir de una disolución stock de PFNB y PNB, de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon 9 soluciones de concentraciones desde 5×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. Alícuotas de la disolución stock de PFNB y PNB fueron transferidas a un matraz de 2 mL, completando volumen con acetonitrilo.

d) Estudio de repetibilidad

Se procedió de igual forma que en 2.2.3.A-b). Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la señal obtenida experimentalmente a 236 nm y 262 nm para PFNB y PNB, respectivamente.

e) Estudio de reproducibilidad

Se repite estudio de repetibilidad, por la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia, variando el día de medición y el operador.

f) Límite de detección y límite de cuantificación

Para la estimación del límite de detección y límite de cuantificación se siguió metodología descrita en el punto 2.2.3.A-d).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis

Los productos finales formados se obtuvieron en buen rendimiento, con la excepción del producto 4-d, que se formó en un bajísimo rendimiento (**Tabla 1**). Al estudiar las variables que condujeron a este resultado inicialmente pensamos que sería por problemas de formación del haluro de aróilo, sin embargo la cromatografía en placas indicaba que si se formaba plenamente. Más aún, el haluro formado reacciona completamente con el nitrobenzimidazol, como se pudo ver por placa cromatográfica. Esto nos llevó a postular que el producto experimenta una hidrólisis en su fase terminal, al momento de solubilizar las sales inorgánicas es probable que trazas de ácido fueran los responsables de una catálisis, generando un centro carbonílico de mayor electrofilia para el ataque del agua.

3.2 Caracterización electroquímica

3.2.1 Caracterización de PNB

Para el caso de este compuesto se debió realizar en primer lugar un estudio de condiciones óptimas, ya que al poseer dos grupos nitro, presentó dos señales principales, las cuales no se resolvieron de buena manera en el polarograma, así que se debió realizar un estudio de disolventes y pH (**figuras 1A- E**). En este estudio también se realizaron mediciones a distintos tiempos, entre los cuales la muestra se mantuvo en una celda polarográfica aislada de la luz y con corriente de nitrógeno, para poder pesquisar una posible degradación en función del tiempo y del pH.

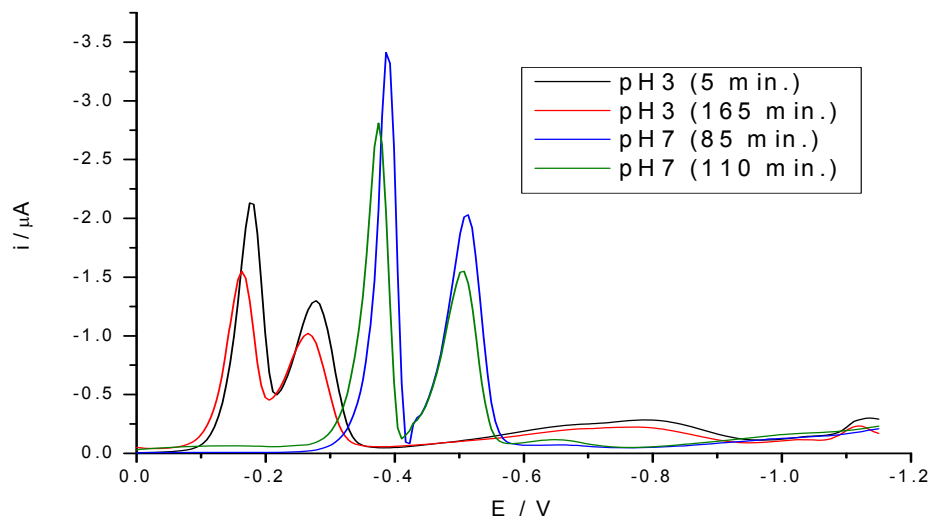


Figura 1.A: Polarogramas de PNB 1×10^{-4} M en acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1M (20:80), a pHs 3 y 7.

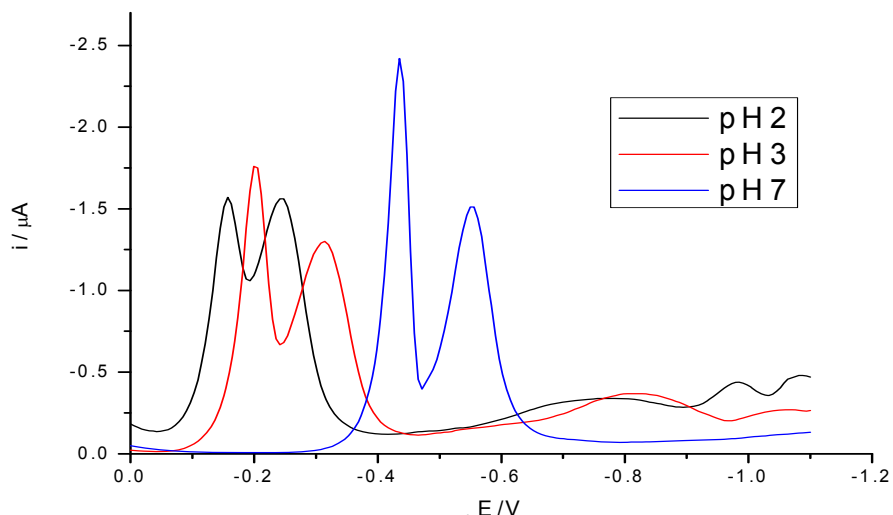


Figura 1.B: Polarogramas de PNB 1×10^{-4} M en acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1M (50:50) a pHs 2, 3 y 7.

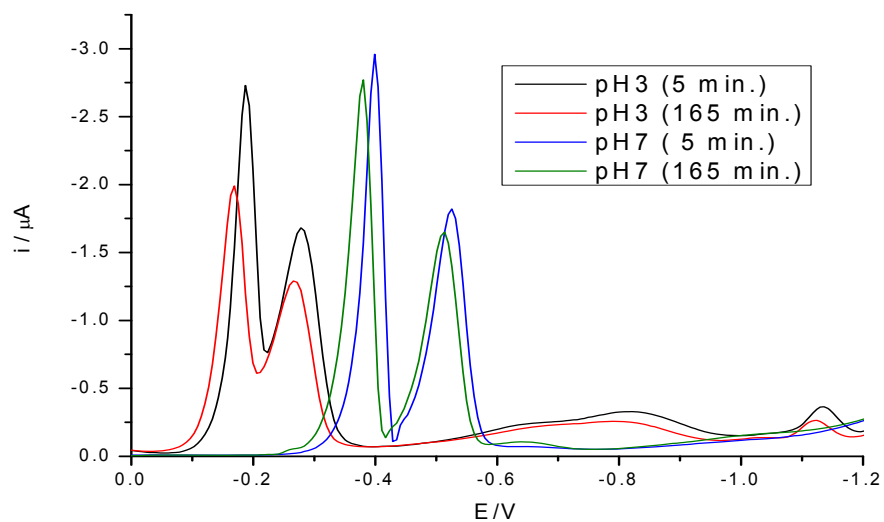


Figura 1.C: Polarogramas de PNB 1×10^{-4} M a pH 3 y 7 a distintos tiempos de medición. Acetonitrilo/ tampón fosfato 0,2M (20:80)

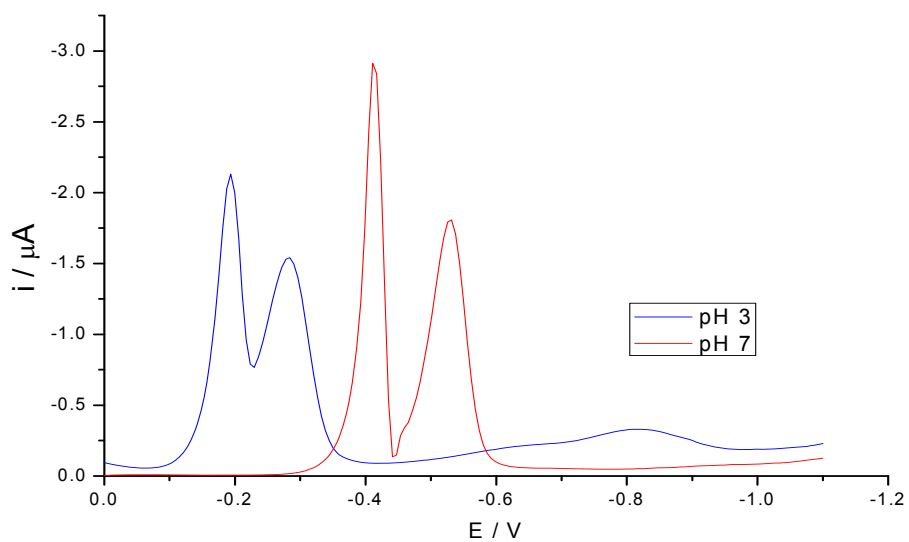


Figura 1.D: Polarogramas de PNB 1×10^{-4} M a pH 3 y 7 en Acetonitrilo/ Britton-Robinson 0,1M (30:70)

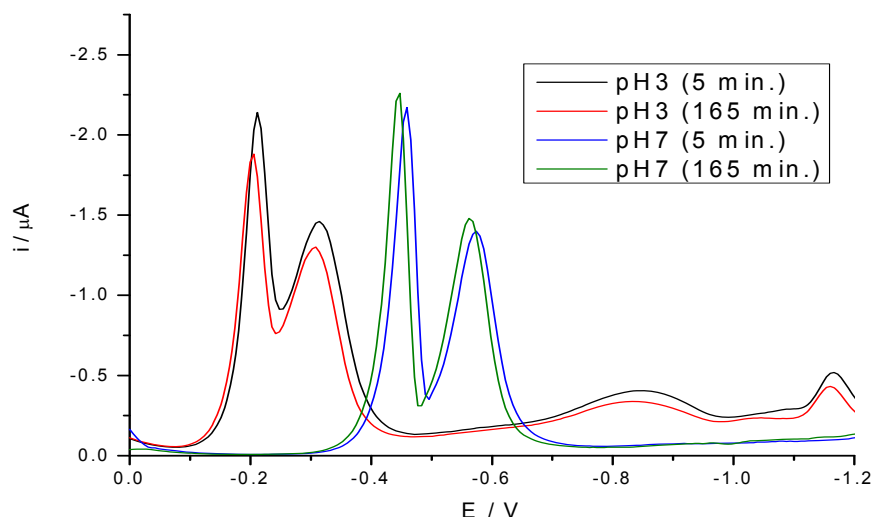


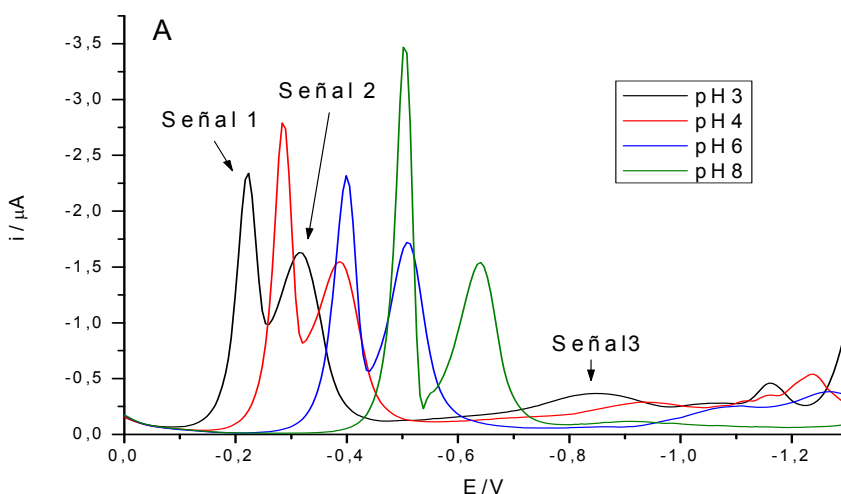
Figura 1.E: Polarogramas de PNB 1×10^{-4} M a pH 3 y 7, y a distintos tiempos de medición. Mezcla acetonitrilo/ tampón fosfato 0,2M (50:50)

En las figuras **1.A** y **1.C** se puede observar que existe un corrimiento de potencial y una disminución en la intensidad de corriente de las señales en función del tiempo y el pH, debida probablemente a una degradación por efecto del medio de trabajo. Por otra parte, en la figura **1.B** se puede apreciar que la mezcla de disolventes no es la adecuada para la resolución de las señales, ya que existe demasiado solapamiento entre ellas. Si bien la figura **1.D** presenta una buena resolución, tampoco es la adecuada ya que también presenta problemas de estabilidad. Finalmente, a partir de las distintas condiciones ensayadas, se seleccionó la mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) como condición óptima para realizar el estudio polarográfico de PNB (figura **1.E**). De las dos condiciones de pH mostradas en dicha figura, la señal a pH 3 es la más adecuada, ya que a pH 7 y como podrá verse más adelante en la gráfica que relaciona corriente vs. pH (Fig. 4A y 4B), la corriente presenta mayor estabilidad en medio ácido (alrededor de pH 3) vs. la zona neutra.

3.2.2 Polarografía de pulso diferencial (PPD)

PNB y PFNB en sus respectivas disoluciones (acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M y acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1M), presentan señales de reducción sobre el electrodo de goteo de mercurio (EGM), exhibiendo una respuesta catódica bien definida en el intervalo de pH 3-8 para PNB y pH 3-9 para PFNB (**Figuras 2.A y 2.B**).

En los intervalos de pH estudiados se observan tres señales de reducción para PNB y dos para PFNB. Para el caso de PNB; dos de estas señales (señales 1 y 2) corresponderían a las reducciones de los dos grupos nitro presentes en la molécula y una señal de menor intensidad (señal 3), probablemente correspondiente a la reducción del enlace azometino⁴¹. Dichas señales son pH dependientes, desplazándose progresivamente hacia potenciales más negativos mientras más alcalino es el pH. Cabe destacar también que a medida que el pH alcanza valores más alcalinos, las dos señales correspondientes a los grupos nitro de PNB se van separando.



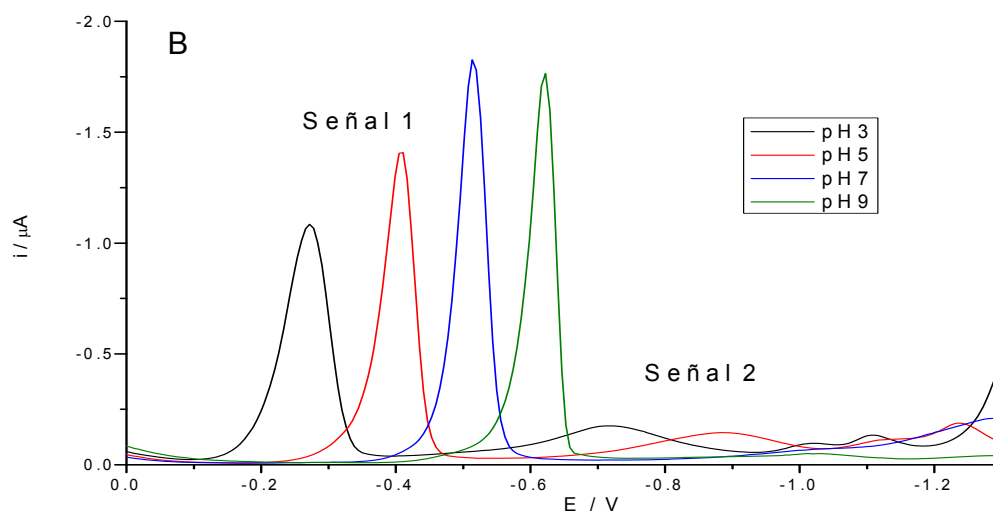


Figura 2: Polarogramas de pulso diferencial de: (A) PNB 1×10^{-4} M en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M. (50:50) y (B) PFNB 1×10^{-4} M en acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1 M, (30:70) a distintos pH.

Debido a que los estudios polarográficos no pudieron ser realizados en la misma mezcla de solventes para ambos compuestos, por los problemas de resolución y estabilidad, no es posible saber que grupo nitro se reduce primero en PNB con los polarogramas de las figuras 2a y 2b. Para hacer esta determinación es necesario realizar una comparación entre las figuras 1D y 2B, ya que estas están hechas en el mismo medio (**figura 2C**). Aquí se puede apreciar de manera clara que el grupo nitro presente en el sustituyente de la posición 1 ($p\text{-NO}_2$) es el primero en reducirse y que el de la posición 2 ($o\text{-NO}_2$), lo hace a continuación.

Respecto a lo que ocurre con la resolución de las señales 1 y 2 en el polarograma de PNB, en el cual se aprecia claramente que a medida que el pH aumenta ambas señales se van separando, podríamos decir que este fenómeno se debe a que el par de grupos nitro presentes en esta molécula están estabilizados de diferente manera, siendo la reducción del grupo presente en el sustituyente en posición 2 la menos favorecida. En este caso la densidad electrónica sobre este grupo sería afectada directamente por la protonación-desprotonación del nitrógeno perteneciente al enlace azometino, debido a que cuando este grupo se protona atraería la nube

electrónica del anillo, dejando al grupo nitro más susceptible a sufrir una reducción, razón por la cual las señales se solapan a pH ácido y se separan a pH alcalino.

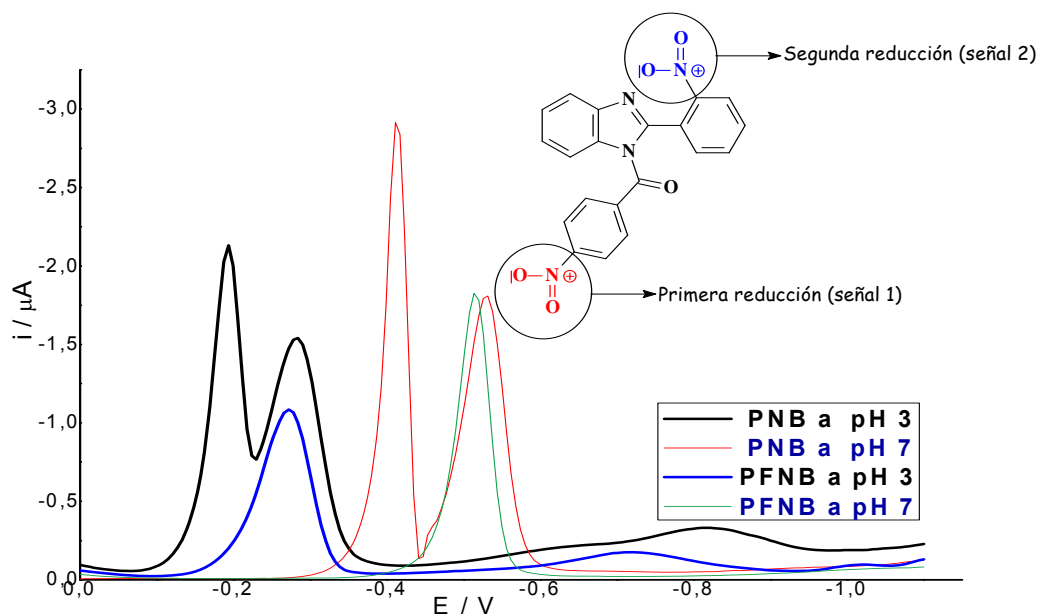


Figura 2c: Polarogramas comparativos entre PNB y PFNB a una concentración de 1×10^{-4} M en acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1 M, (30:70) a pH 3 y 7.

La evolución de los potenciales de pico (E_p) con el pH del medio de ambos compuestos (**Figuras 3A y 3B**), presentan puntos de quiebre a pH 4,0, lo cual tendría directa relación con la protonación–desprotonación del nitrógeno ubicado en posición 3 del anillo imidazólico.

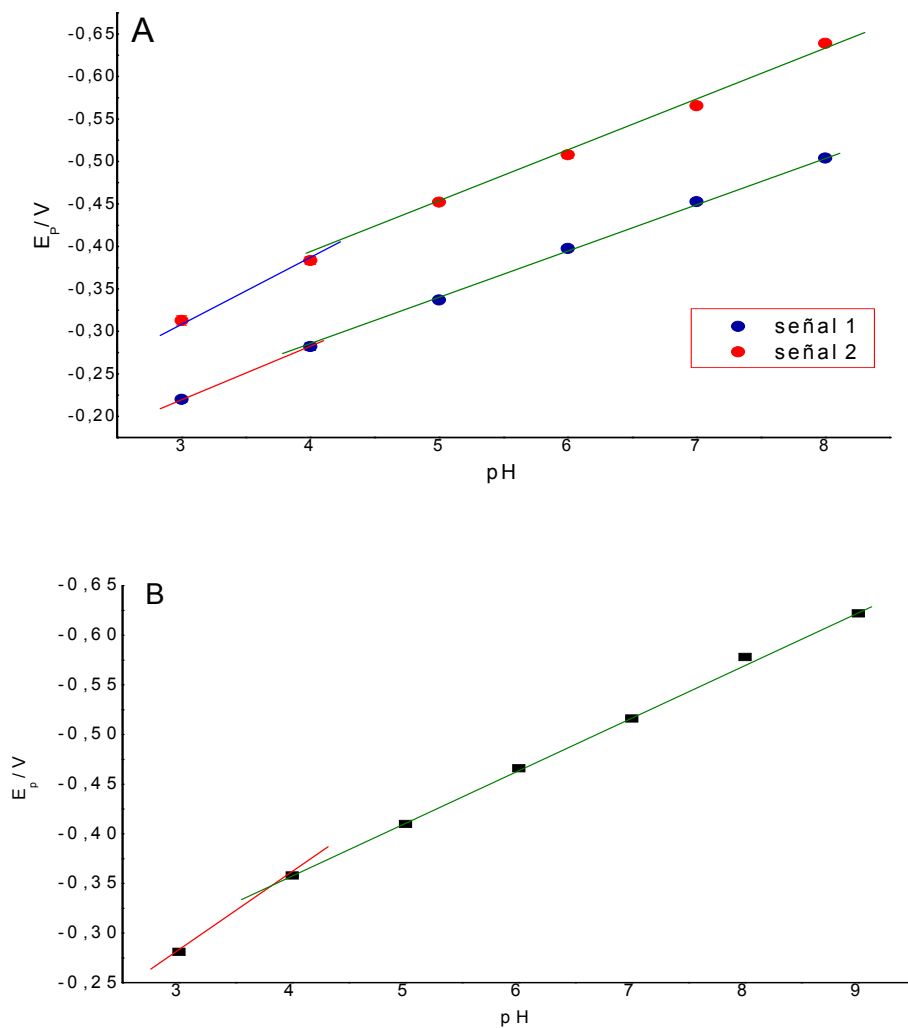
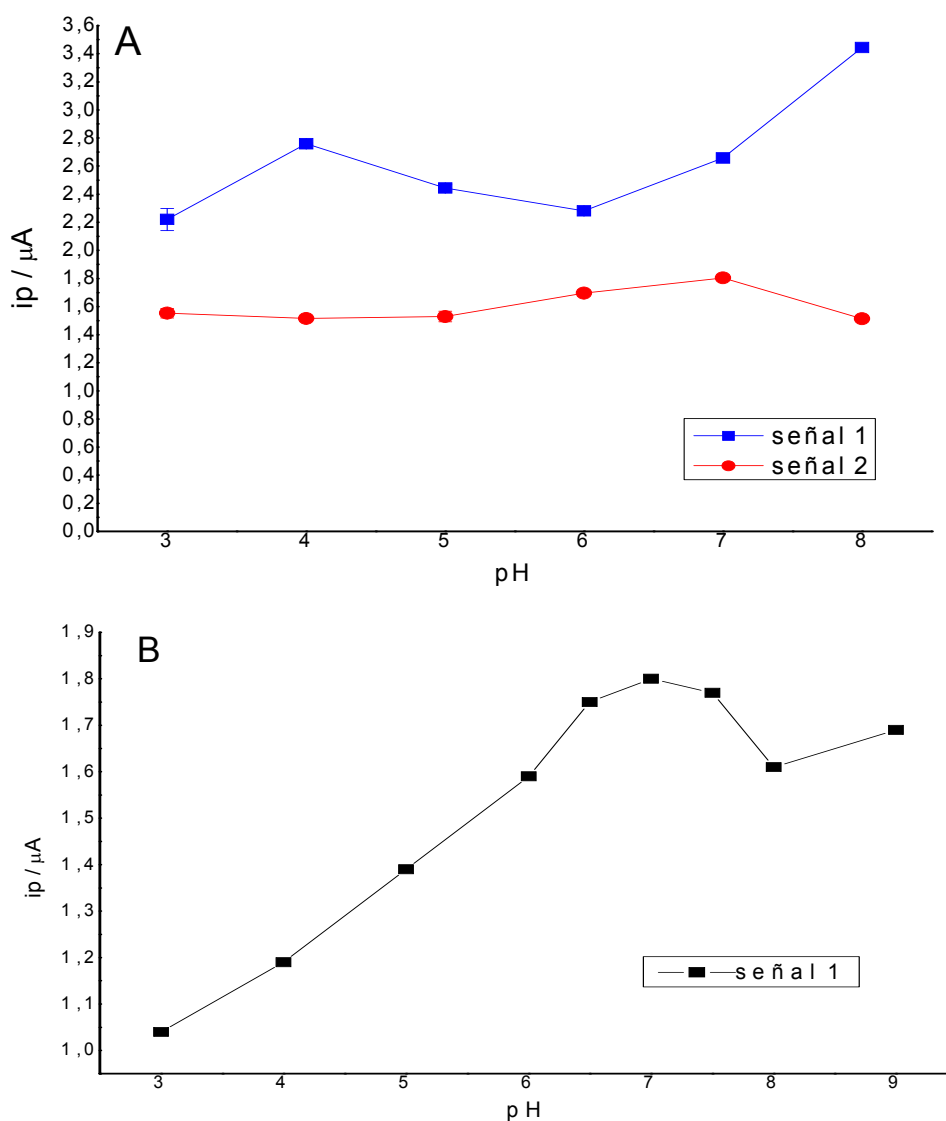


Figura 3a – b: Gráficas de E_p vs pH para una concentración 1×10^{-4} M de PNB (Fig. 3A), en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2M (50:50) y de PFNB (Fig. 3B) en mezcla acetonitrilo/tampón Britton Robinson 0,1M (30:70).

Graficando la evolución de las corrientes de pico (I_p) con el pH (**Figuras 4A y 4B**), se puede observar que la señal 1 de PNB (Fig. 4A) exhibe un comportamiento absolutamente cambiante, ya que entre pH 3 y 4 aumenta, entre pH 4 y 6 disminuye para luego volver a mostrar un comportamiento creciente hasta pH 8, pero sin embargo el comportamiento de la corriente en el rango de pH comprendido entre 3 y 6 se mantiene entre valores próximos. Para el caso de la señal 2, la gráfica muestra un comportamiento lineal, prácticamente sin variación en todo el rango de pH. Esto se

podría explicar, como en el caso anterior, por la protonación-desprotonación de los nitrógenos en el anillo imidazólico. Para el caso de PFNB se observa un incremento de i_p lineal desde pH 3,0 hasta pH 6,5; desde este pH hasta pH 7,5 la corriente se estabiliza para luego decaer. Al igual que en el caso anterior, estos incrementos y decrementos de la i_p podrían tener una relación con la protonación-desprotonación en el anillo imidazólico. Desde pH 8 en adelante no se puede realizar el seguimiento debido a la inestabilidad en soluciones alcalinas de ambos compuestos.



Figuras 4 A-B: Curvas de i_p v/s pH para una concentración 1×10^{-4} M de PNB (Fig. 4A) en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2M (50:50) y de PFNB (Fig. 4B) en mezcla acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1M (30:70).

3.2.3 Polarografía tast (PTAST)

El estudio de la influencia del pH sobre la reducción de PNB realizado por PTAST, presenta una respuesta catódica bien definida en un intervalo corto de pH (3-7) (**Figura 5**). Se pueden apreciar tres ondas polarográficas, las dos primeras ondas (señales 1 y 2) bien definidas en el rango de pH estudiado, mientras que la tercera onda (señal 3) no se define completamente en todos los pH. Lo mismo ocurre en el caso de PFNB, ya que en esta gráfica se aprecian dos ondas (señales 1 y 2), siendo la primera bien definida en el rango de pH estudiado. La segunda al igual que en el caso de la señal tres de PNB no se define de buena manera en todos los pH. Además se puede apreciar que las ondas son pH dependientes, de igual forma que en PPD.

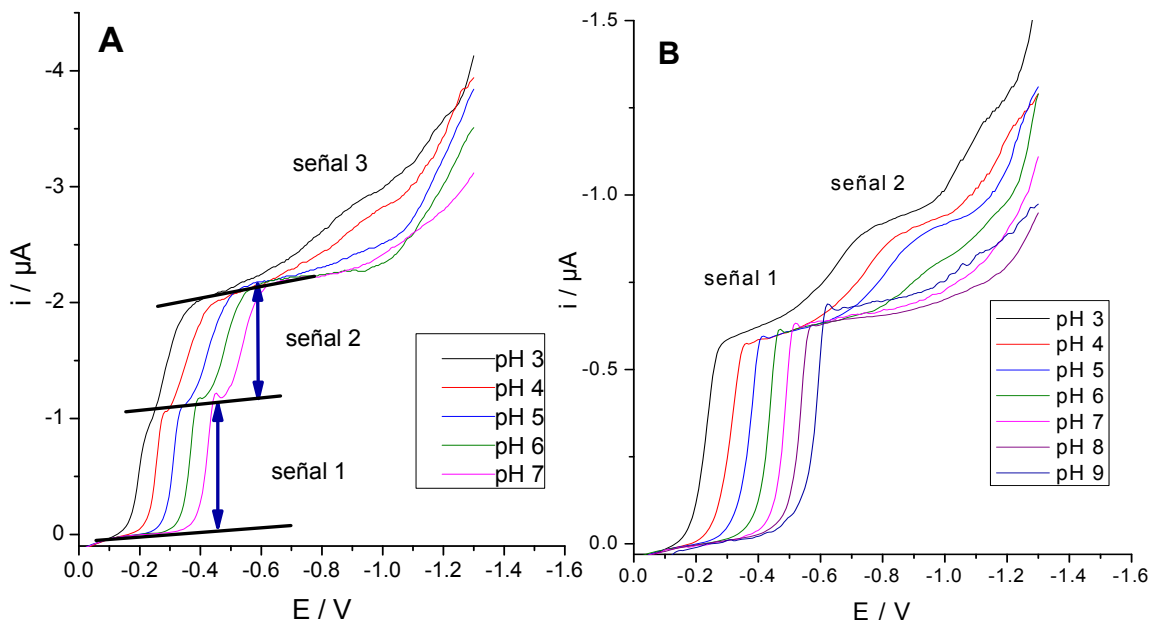


Figura 5: Polarogramas tast de PNB (**A**) y PFNB (**B**) a distintos pH.

La evolución del potencial de media onda ($E_{1/2}$) para PFNB respecto a las variaciones de pH (**Figura 6**), muestra un comportamiento lineal con el pH, presentando un quiebre a pH 5,5. Como se explicó anteriormente, este quiebre se

debería al equilibrio de protonación-desprotonación del nitrógeno ubicado en el anillo imidazólico en la posición 3. Para PNB no fue posible obtener estos datos ya que la resolución de las figuras no es buena, lo cual dificulta la medición.

La respuesta de la corriente límite (I_{lim}) con el pH para PNB no pudo ser obtenida debido a la inadecuada resolución, pero lo que si se puede determinar al apreciar la **figura 5A**, es que la intensidad de corriente en ambas ondas es la misma, lo cual indica que se transfiere la misma cantidad de electrones. Por otra parte, para PFNB (**Figura 7**) se observa que la corriente límite se mantiene prácticamente constante en el intervalo de pH estudiado.

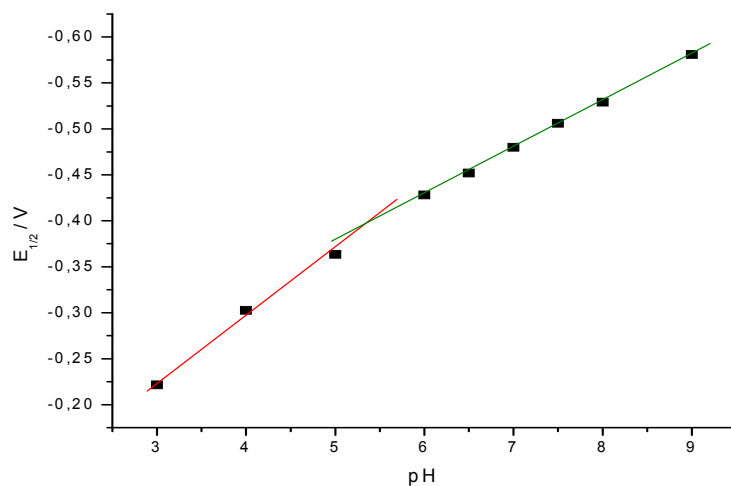


Figura 6: Dependencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) vs pH para PFNB 1×10^{-4} M en mezcla acetonitrilo/tampón Britton-Robinson 0,1M (30:70).

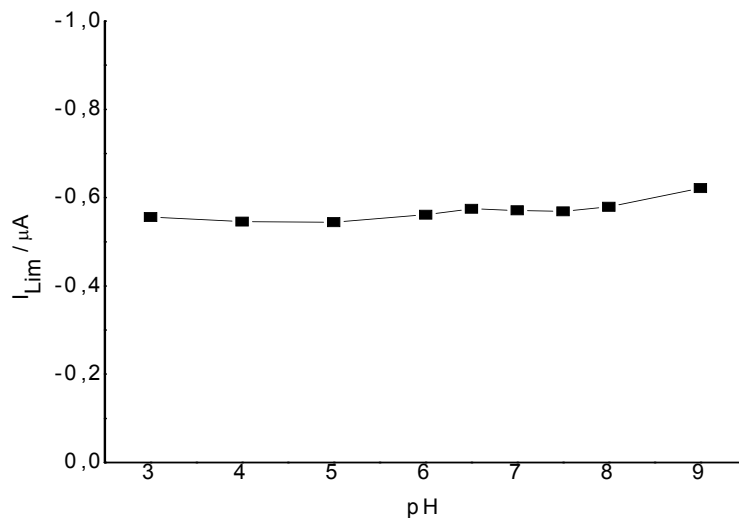


Figura 7: Dependencia de la corriente límite (I_{lim}) vs pH para PFNB 1×10^{-4} M en mezcla acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1M (30:70).

3.2.4 Desarrollo de metodologías analíticas electroquímicas

Con los resultados obtenidos anteriormente descritos, se procedió al desarrollo de la metodología analítica para la obtención de parámetros analíticos necesarios para la caracterización de los compuestos.

Luego de conocido el pH adecuado para la caracterización, se realizó un estudio de concentración para PNB y PFNB (**Figuras 8, 9 y 10**).

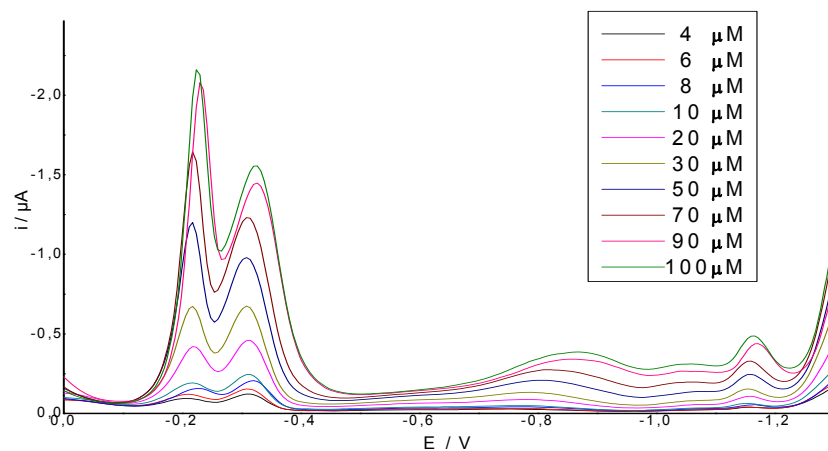


Figura 8: Polarogramas de la curva de calibración por PPD para PNB (4×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3,0.

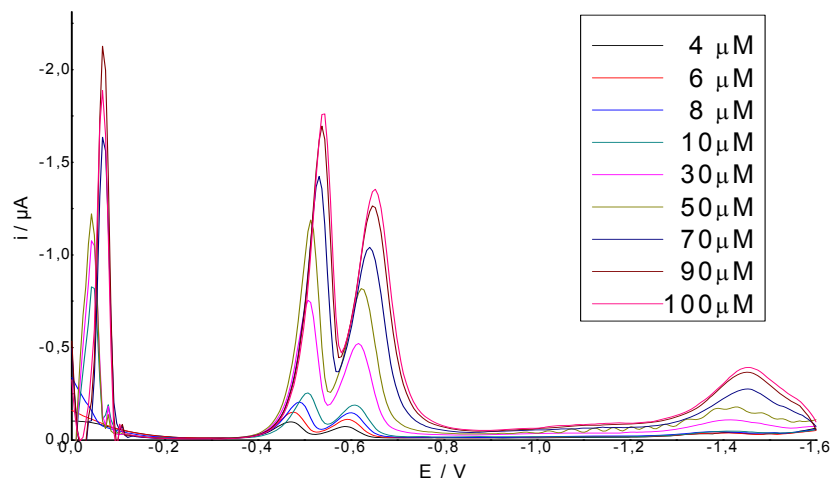


Figura 9: Polarogramas de la curva de calibración por PPD para PNB (4×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 7,0.

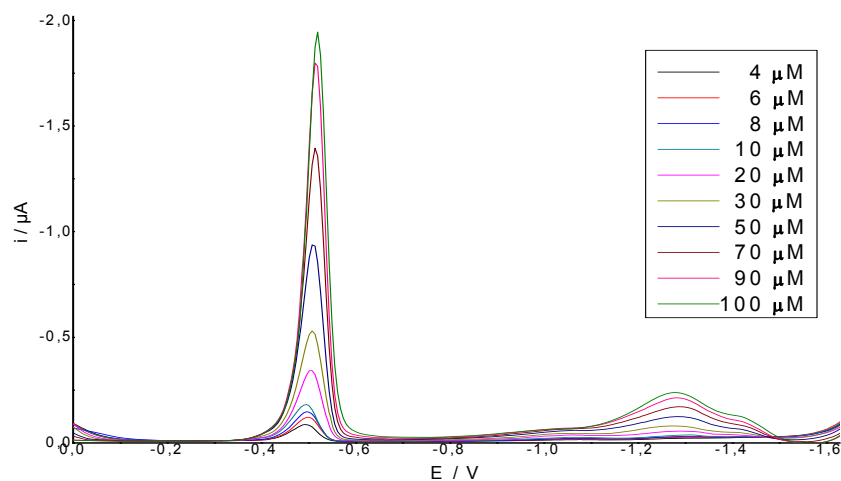


Figura 10: Polarogramas de la curva de calibración por PPD para PFNB (4×10^{-6} M - 1×10^{-4} M) en acetonitrilo/Britton-Robinson 0,1 M (30:70) a pH 7,0.

A continuación se procedió a construir las curvas de calibración para ambos compuestos. En el caso de PNB se obtuvieron 6 curvas de calibración en un rango de concentración de 4×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. Las curvas se construyeron a pH 3, tanto para la señal 1 como para la señal 2 (**Figuras 11A y 11B**), repitiéndose este estudio a pH 7 (**Figuras 11C y 11D**), luego se realizó la construcción de 2 curvas que buscaban relacionar el área bajo la curva (ABC) vs el pH (**Figuras 11E y 11F**). En 5 de las 6 curvas construidas puede apreciarse claramente que las concentraciones eran lineales en dos rangos.

Para PFNB la curva de calibración se construyó a pH 7 (**Figura 12**), que presentó una variación de la corriente de pico (I_p) a un potencial de -519 mV. Aquí también pudo apreciarse el mismo fenómeno de la linealidad en dos tramos de concentración.

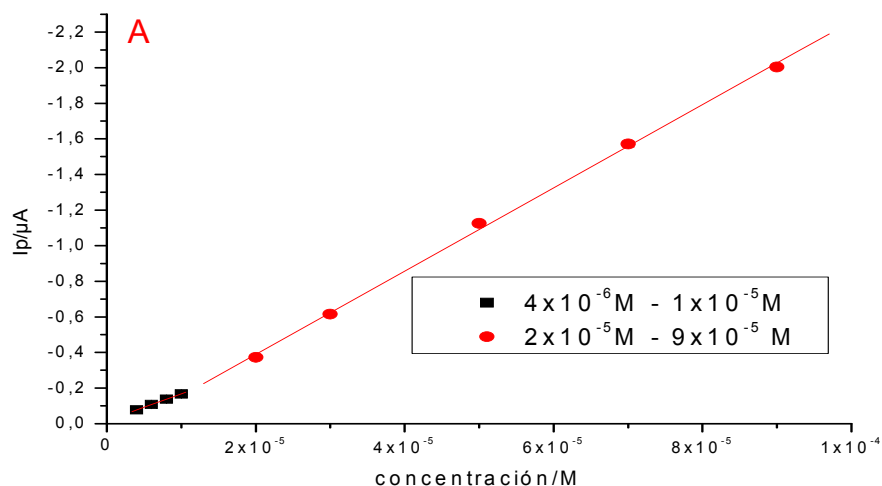


Figura 11A: Curva de calibración para PNB en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3,0. (Señal 1 a -223 mV).

(A) $I_p = 0,01503 [\mu A/M] \times C [M] + 1,7198 \times 10^{-8} [\mu A]$ ($4 \times 10^{-6} M - 1 \times 10^{-5} M$, $r = 0,99999$, $n = 4$)

(B) $I_p = 0,02338 [\mu A/M] \times C [M] - 7,8222 \times 10^{-8} \mu [A]$ ($2 \times 10^{-5} M - 9 \times 10^{-5} M$, $r = 0,99941$, $n = 5$)

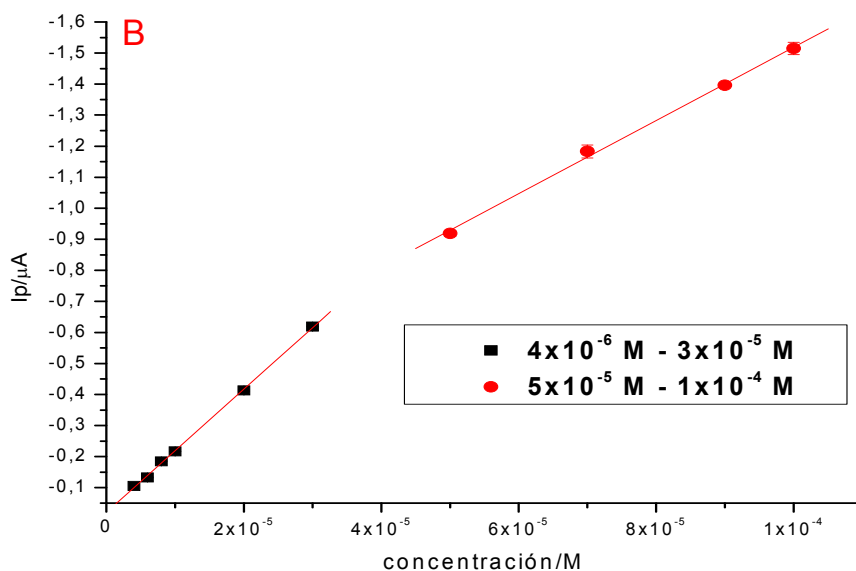


Figura 11B: Curva de calibración para PNB en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3,0. (Señal 2 a -326 mV).

(A) $I_p = 0,01983 [\mu A/M] \times C [M] - 2,078 \times 10^{-8} [\mu A]$ ($4 \times 10^{-6} M - 3 \times 10^{-5} M$, $r = 0,99964$, $n = 6$)

(B) $I_p = 0,01178 [\mu A/M] \times C [M] + 3,401 \times 10^{-8} [\mu A]$ ($5 \times 10^{-5} M - 1 \times 10^{-4} M$, $r = 0,99889$, $n = 4$)

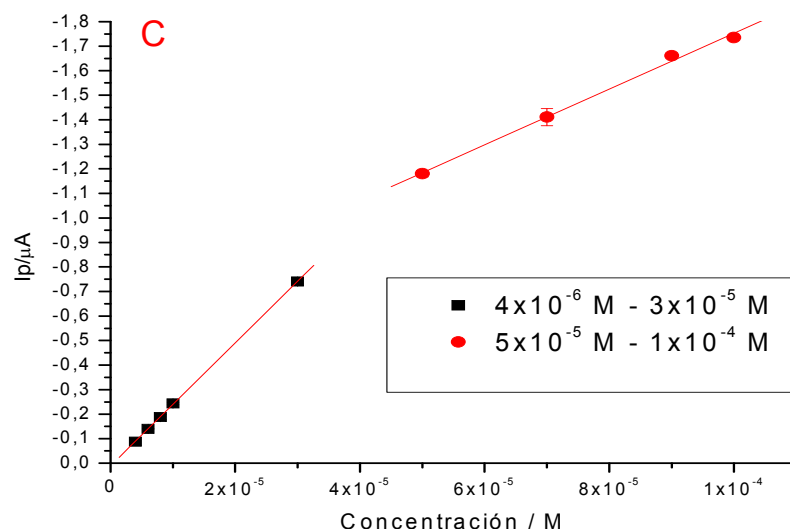


Figura 11C: Curva de calibración para para PNB a pH 7,0 en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2M (50:50), para la señal 1 (-543 mV).

(A) $I_p = 0,02508 [\mu\text{A}/\text{M}] \times C [\text{M}] - 1,0993 \times 10^{-8} [\mu\text{A}]$ (4×10^{-6} M- 3×10^{-5} M, $r = 0,99997$, $n = 5$)

(B) $I_p = 0,01137 [\mu\text{A}/\text{M}] \times C [\text{M}] + 6,1574 \times 10^{-7} [\mu\text{A}]$ (5×10^{-5} M- 1×10^{-4} M, $r = 0,99787$, $n = 4$)

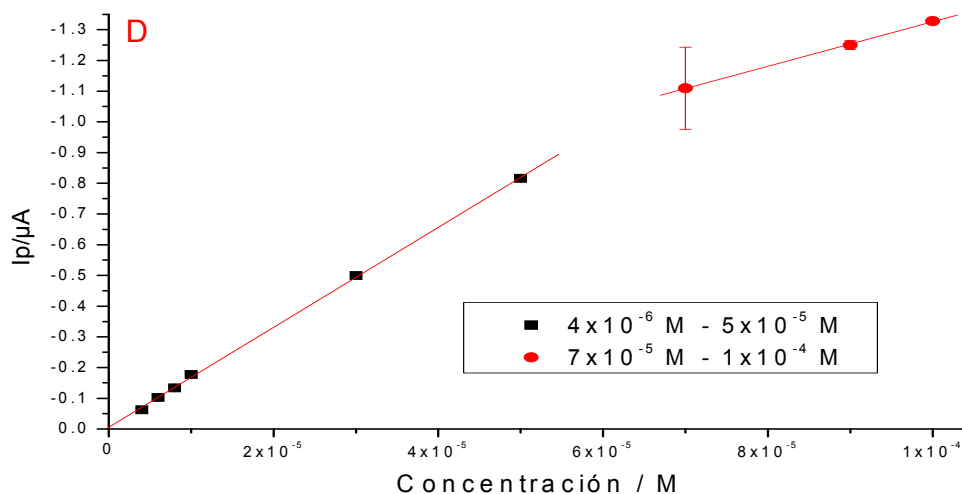


Figura 11D: Curva de calibración para PNB a pH 7,0 en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2M (50:50) para la señal 2 (-652 mV).

(A) $I_p = 0,0163 [\mu\text{A}/\text{M}] \times C [\text{M}] + 5,09662 \times 10^{-9} [\mu\text{A}]$ (4×10^{-6} M- 5×10^{-5} M, $r = 0,99978$, $n = 6$)

(B) $I_p = 0,00725 [\mu\text{A}/\text{M}] \times C [\text{M}] + 6,01 \times 10^{-7} [\mu\text{A}]$ (7×10^{-5} M- 1×10^{-4} M, $r = 0,99971$, $n = 3$)

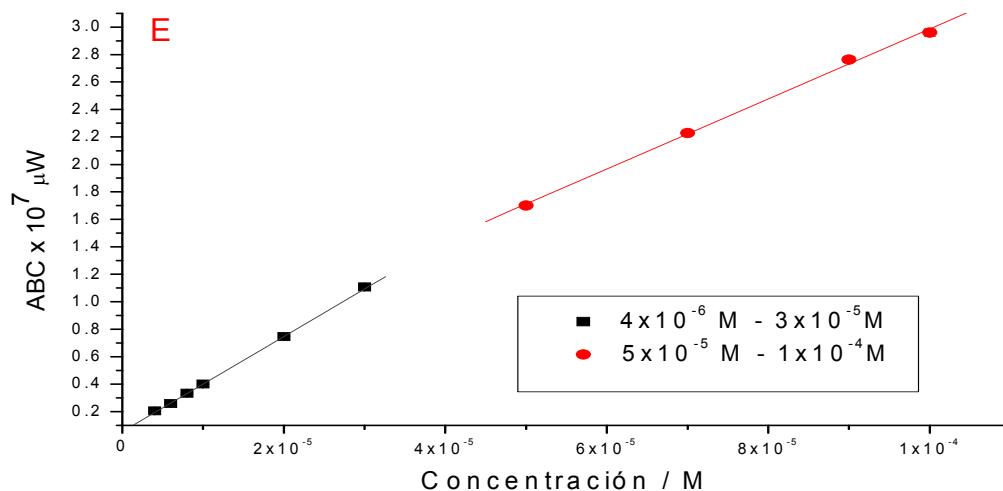


Figura 11E: Curva de calibración para PNB en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3.0, en ella se relaciona la concentración molar con el área bajo la curva de las señales 1 y 2.

(A) $ABC [\mu W] = 0,00346 \times C [M] + 5,56772 \times 10^{-9}$ ($4 \times 10^{-6} M - 3 \times 10^{-5} M$, $r = 0,99997$, $n = 6$)

(B) $ABC [\mu W] = 0,00255 \times C [M] + 4,36034 \times 10^{-8}$ ($5 \times 10^{-5} M - 1 \times 10^{-4} M$, $r = 0,99901$, $n = 4$)

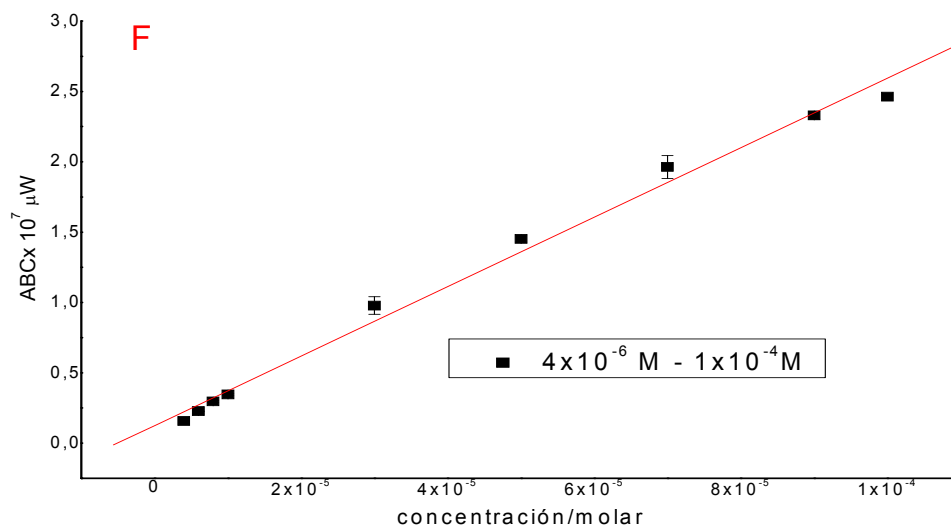


Figura 11F: Curva de calibración para PNB a pH 7,0 en mezcla acetonitrilo/tampón fosfato (50:50), relacionando la concentración molar con el área bajo la curva de las señales 1 y 2.

$ABC [\mu W] = 0,00247 \times C [M] + 1,25481 \times 10^{-8}$ ($r=0.99588$, $n=9$)

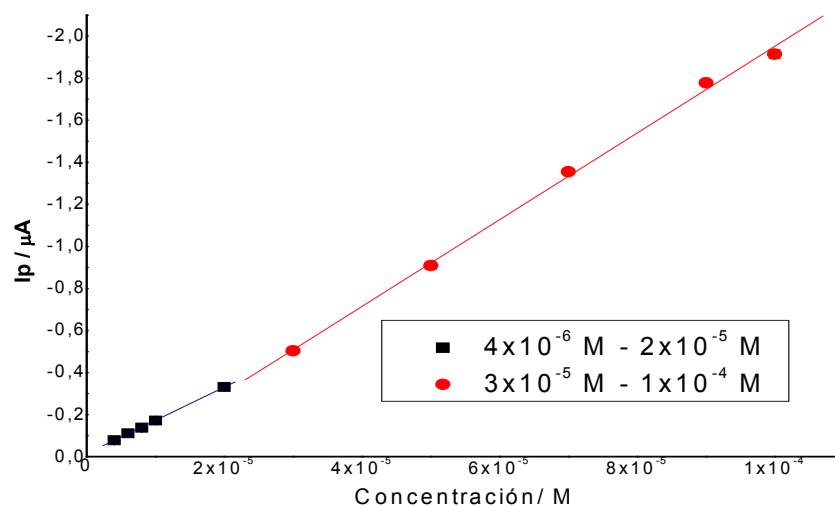


Figura 12: Curva de calibración para PFNB a pH 7,0 en mezcla acetonitrilo/Britton (30/70). El potencial de pico fue a -519 mV.

(A) $I_p = 1,5845 \times 10^7 \text{ } [\mu\text{A/M}] \times C \text{ [M]} + 14,1040 \text{ } [\mu\text{A}]$ ($4 \times 10^{-6} \text{ M} - 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r = 0,99983$, $n = 5$)

(B) $I_p = 2,0622 \times 10^7 \text{ } [\mu\text{A/M}] \times C \text{ [M]} - 110,4463 \text{ } [\mu\text{A}]$ ($3 \times 10^{-5} \text{ M} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $r = 0,99891$, $n = 5$)

En la tabla 2 se presenta un resumen de todos los parámetros analíticos obtenidos en la técnica electroquímica para PNB y PFNB.

Tabla 2. Parámetros analíticos para la determinación de PNB y PFNB por PPD

	PFNB	PNB a pH 3	PNB a pH 7
Potencial de detección	-519 mV	-223 mV pico 1 -326 mV pico 2	-543 mV pico 1 -652 mV pico2
Repetibilidad	0,42 (90 μM)	0,59 (90 μM)	3,7 (90 μM)
CV(%)	0,9 (30 μM) 1,71 (6 μM)	0,59 (30 μM) 1,3 (6 μM)	1,64 (30 μM) 5,1 (6 μM)
Reproducibilidad	1,12 (90 μM)	0,49 (90 μM)	4,1 (90 μM)
CV(%)	1,23 (30 μM) 1,35 (6 μM)	0,67 (30 μM) 1,8 (6 μM)	3,4 (30 μM) 4,5 (6 μM)

Rango de []	4µM a 20µM tramo A 30µM a 100µM tramo B		4µM a 30µM tramo A 50µM a 100µM tramo B		4 µM a 100 µM		
Sensibilidad	Tramo A	1,58 x 10 ⁷	Señal 1	Tramo A 0,0150	Señal 1	Tramo A 0,0250	
				Tramo B 0,0233		Tramo B 0,0114	
	Tramo B	2,06 x 10 ⁷	Señal 2	Tramo A 0,0198	Señal 2	Tramo A 0,0163	
				Tramo B 0,0178		Tramo B 0,0072	
				ABC	Tramo A 0,0035	ABC	0,0024
					Tramo B 0,0026		
LD	2,792x10 ⁻⁶ M		2,4x10 ⁻⁶ M		5,37x10 ⁻⁶ M		
LQ	6,509x10 ⁻⁶ M		3,6x10 ⁻⁶ M		1,74x10 ⁻⁵ M		
Condiciones experimentales	CH ₃ CN/ tampón B.R. 0,1 M (30:70) pH 7		CH ₃ CN/ tampón fosfato 0,2 M (50:50) pH 3		CH ₃ CN/ tampón fosfato 0,2 M (50:50) pH 7		

Al analizar esta tabla, se puede determinar que las condiciones óptimas para el estudio analítico de PNB son las que corresponden a las realizadas a pH 3 ya que en este caso los coeficientes de variación para la repetibilidad, nos ofrecen menor error y las sensibilidades son mayores.

3.3 Espectroscopía UV- Vis.

Con el objetivo de profundizar en el comportamiento químico de PFNB y PNB, se realizó el estudio de la influencia de pH en tampón Britton-Robinson por espectroscopía UV-Visible (Figura 13 A y B).

La **Figura 13A** presenta los espectros obtenidos para PFNB en un rango de pH de 2,0 a 7,0. Los espectros presentan un máximo de absorción importante a pH ácido en 236 nm y un máximo constante en toda la escala de pH en 254 nm. A medida que aumenta la alcalinidad del medio, se genera un efecto hipocrómico de la banda presente a 236 nm, mientras que sobre la banda que aparece 254 nm se aprecia una independencia de la absorbancia con respecto al aumento del pH.

En la **Figura 13B** se presentan los espectros obtenidos para PNB en un rango de pH de 1,5 a 8,0. Los espectros presentan máximos de absorción en medio ácido a 230 y un máximo constante en todo el rango de pH en 263 nm. A medida que aumenta la alcalinidad del medio, se genera un efecto hipocrómico de la banda a 230 nm, mientras que a 263 nm, al igual que en el caso de PFNB se puede apreciar una independencia de la absorbancia con el aumento del pH.

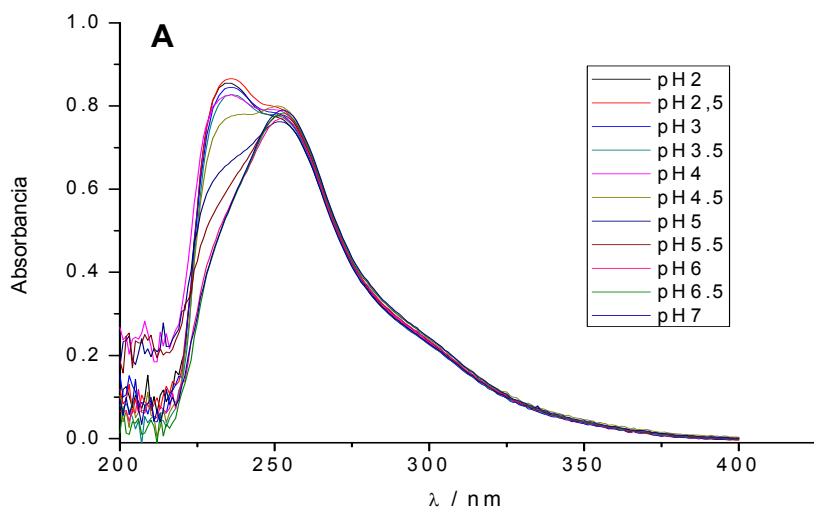


Figura 13a: Efecto del pH sobre el espectro de absorción de PFNB a una concentración 1×10^{-4} M, en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0.1 M (30:70)

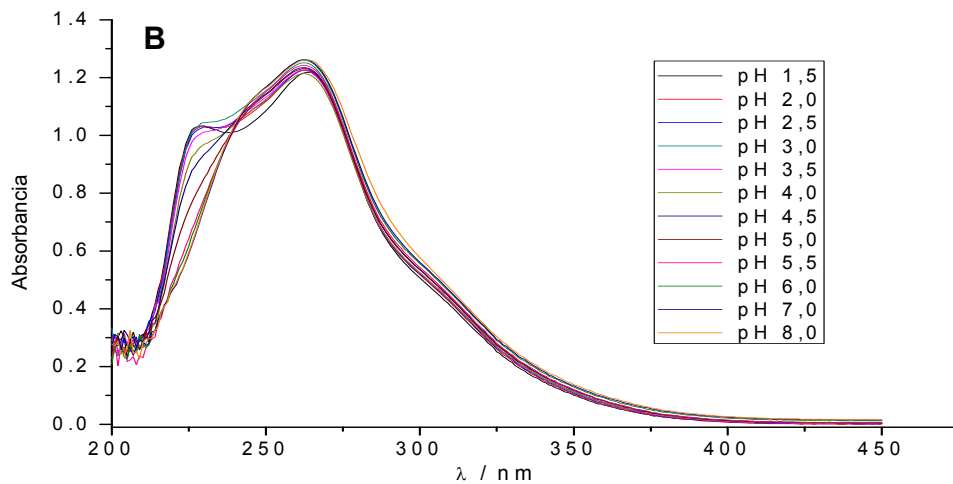


Figura 13b: Efecto del pH sobre el espectro de absorción de PNB a una concentración 1×10^{-4} M, en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80)

3.3.1 Desarrollo de metodología analítica en espectroscopía UV-Vis.

A continuación se muestran los espectros obtenidos por efecto de la concentración para PFNB y PNB (Figuras 14a y 14b).

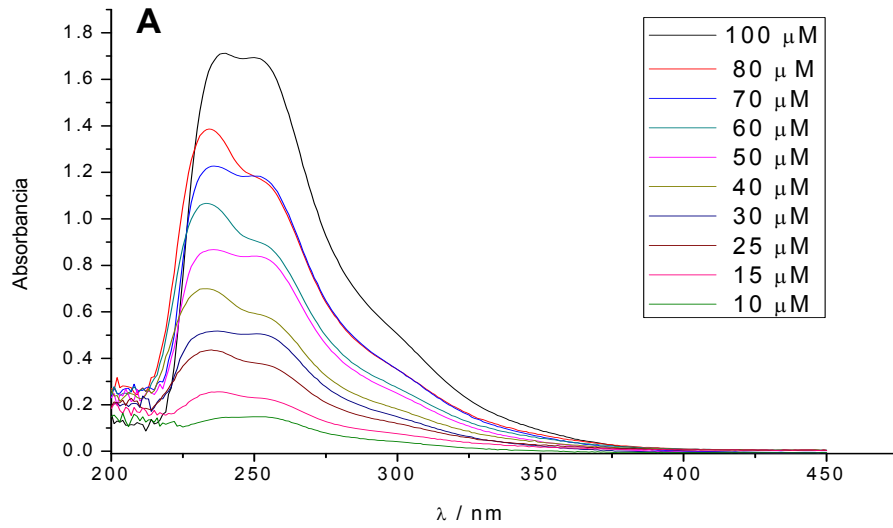


Figura 14A: Efecto de la concentración sobre PFNB, en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (30:70) a pH 4.

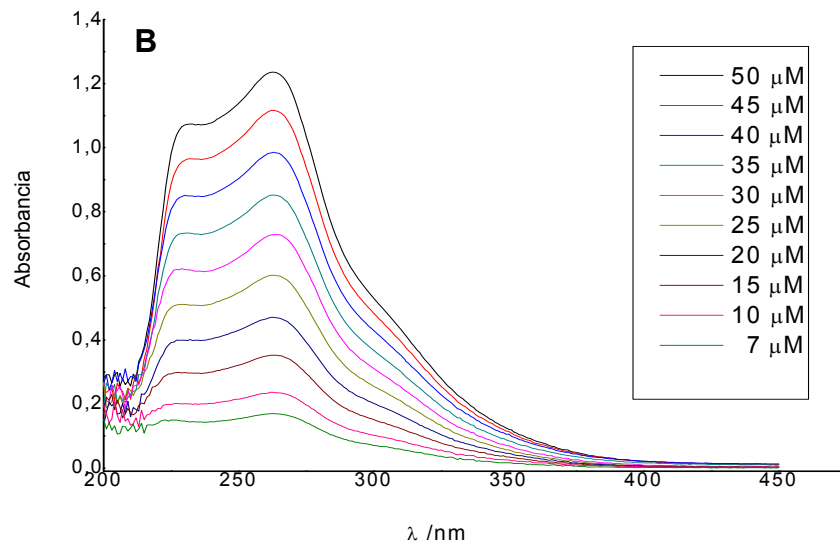


Figura 14B: Efecto de la concentración sobre PNB, en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80) a pH 2,5.

Una vez realizados los estudios de concentración se procedió a extraer los datos para la construcción de las curvas de calibración (**Figuras 15A – 15B**) y la obtención de los parámetros analíticos. Estas curvas se realizaron para PFNB a una longitud de onda de 236 nm y 263 nm para PNB.

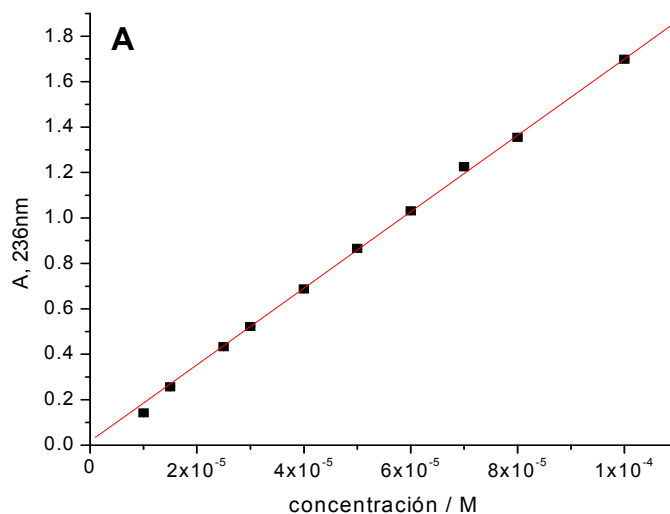


Figura 15A: Curva de calibración para PFNB, realizada en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (30:70) a pH 4.

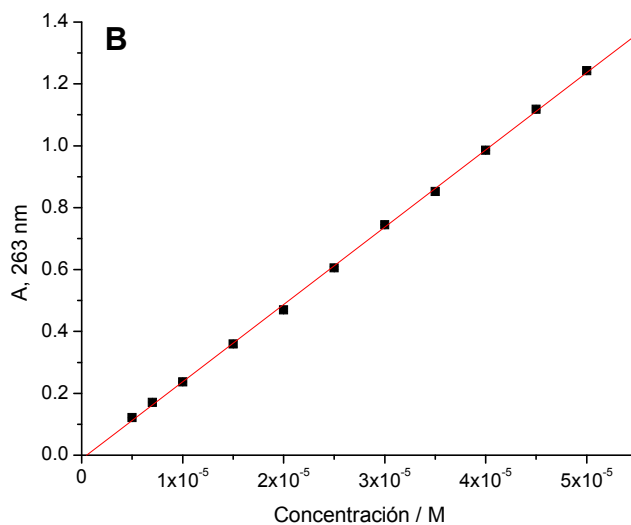


Figura 15B: Curva de calibración para PNB, obtenida en una mezcla de acetonitrilo/ tampón Britton-Robinson 0,1 M (20:80) a pH 2,5.

Una vez construidas las gráficas, las ecuaciones para cada curva de calibración serian las siguientes:

$$\text{PFNB} \Rightarrow A = 1,69 \times 10^4 [\text{M}^{-1}] \times C [\text{M}] + 0.01742 \quad (r=0,99991, n=10)$$

$$\text{PNB} \Rightarrow A = 2,5 \times 10^4 [\text{M}^{-1}] \times C [\text{M}] - 0.01246 \quad (r=0,99975, n=11)$$

Además, a partir de estos datos es posible obtener los valores de absorbilidad molar, los cuales fueron 16900 (236 nm, medio acuoso ácido) para PFBN y 25000 (263 nm, medio acuoso ácido) para PNB.

A continuación se presenta una tabla resumen (**tabla 3**) con los parámetros de análisis obtenidos en la técnica de UV-Vis para PNB y PFNB.

Tabla 3. Parámetros analíticos para la determinación espectrofotométrica de PNB Y PFNB

	PFNB	PNB
Condiciones Experimentales	CH ₃ CN/ tampón B.R. 0,1 M (30:70) pH 4 – λ 236	CH ₃ CN/ tampón B.R. 0,1 M (20:80) pH 2.5 – λ 263
Rangos de []	10 μM hasta 100 μM	7 μM hasta 50 μM
Repetibilidad CV (%)	0,31 (80 μM) 0,97 (50 μM) 1.84 (15 μM)	1,93 (30 μM) 0,79 (20 μM) 1,12 (10 μM)
Reproducibilidad CV (%)	1,15 (80 μM) 1,84 (50 μM) 1,02 (15 μM)	0,71 (30 μM) 0,6 (20 μM) 0,5 (10 μM)
Sensibilidad	1,69 x 10 ⁴	2,50 x 10 ⁴
LD	3,2x10 ⁻⁶ M	4,148x10 ⁻⁶ M
LQ	9,04x10 ⁻⁶ M	5,84x10 ⁻⁶ M

3.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

En esta fase del estudio, para el análisis y caracterización de ambos compuestos mediante esta técnica, se llevó a cabo el ensayo de aptitud del sistema de acuerdo a lo establecido en la USP XXVII⁴⁰ para el estudio de PNB. En cada condición cromatográfica se procedió a obtener los valores de resolución (R), factor de capacidad (k') y selectividad (α), obteniéndose como condiciones óptimas de selectividad para el método:

Para N-(4-nitro-benzoil)-2-(2-nitrofenil)-benzimidazol (PNB)

❖ Programa	: Isocrático
❖ Fase móvil	: acetonitrilo / agua (60:40)
❖ Flujo	: 1,0 mL/min.
❖ Tiempo de desarrollo de cromatograma	: 10 minutos
❖ Temperatura	: 25 °C
❖ Detector de arreglo de fotodiodos	: $\lambda = 262 \text{ nm}$

En el caso de PFNB se realizaron inyecciones del compuesto utilizando en la elución de cada una de ellas distintas proporciones de la mezcla de solventes acetonitrilo / agua, obteniéndose las siguientes condiciones experimentales:

Para N-(4-flúor-benzoil)-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (PFNB)

❖ Programa	: Isocrático
❖ Fase móvil	: acetonitrilo / agua (60:40)
❖ Flujo	: 1,0 mL/min.
❖ Tiempo de desarrollo del cromatograma	: 10 minutos
❖ Temperatura	: 25 °C
❖ Detector de arreglo de fotodiodos	: $\lambda = 254 \text{ nm}$

En estas condiciones, PNB (**Figura 16**) exhibió los siguientes parámetros cromatográficos (**Tabla 4**):

Tabla 4: Parámetros cromatográficos para PNB

Compuesto	tr	R	k'	α
PNB	6,184	6,626	7,11	2,972

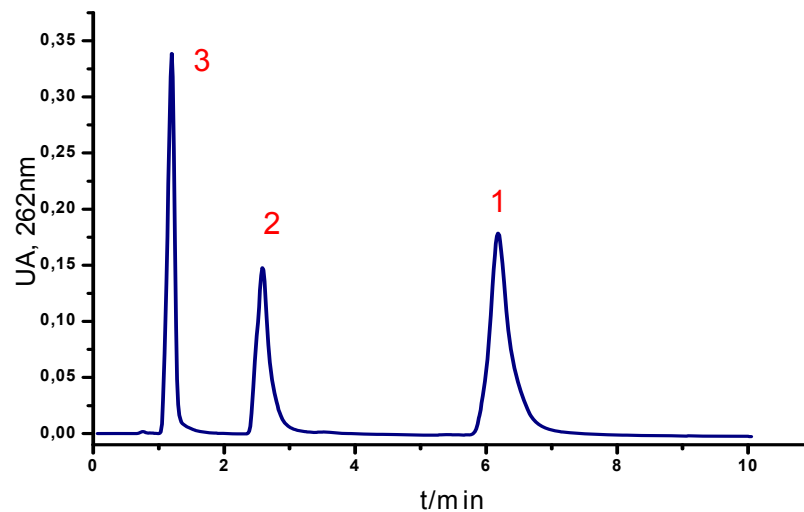


Figura 16: Cromatograma del ensayo de selectividad para PNB en condiciones óptimas: (1) PNB, (2) y (3) productos de hidrólisis. La concentración de la solución de PNB utilizada fue de 1×10^{-4} M.

A continuación se puede apreciar el cromatograma obtenido para PFNB (**Figura 17**) después de obtener sus condiciones óptimas, la señal presentó un tiempo de retención (tr) de 6,772 min.

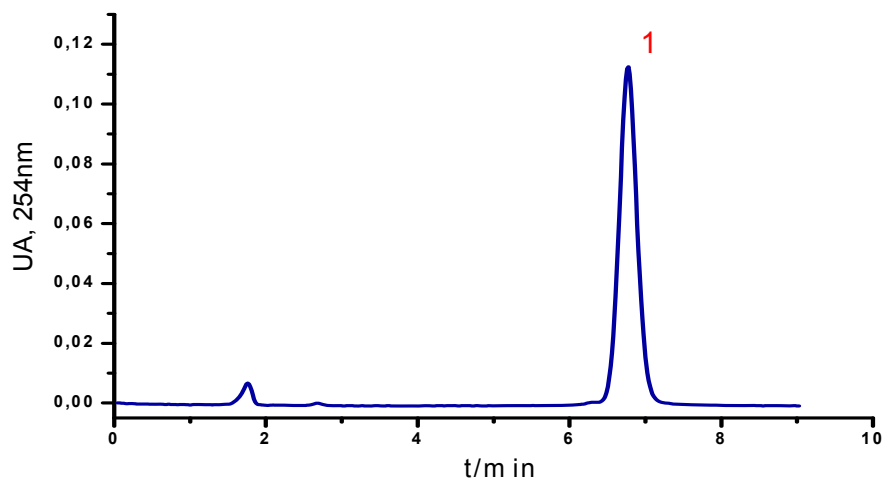
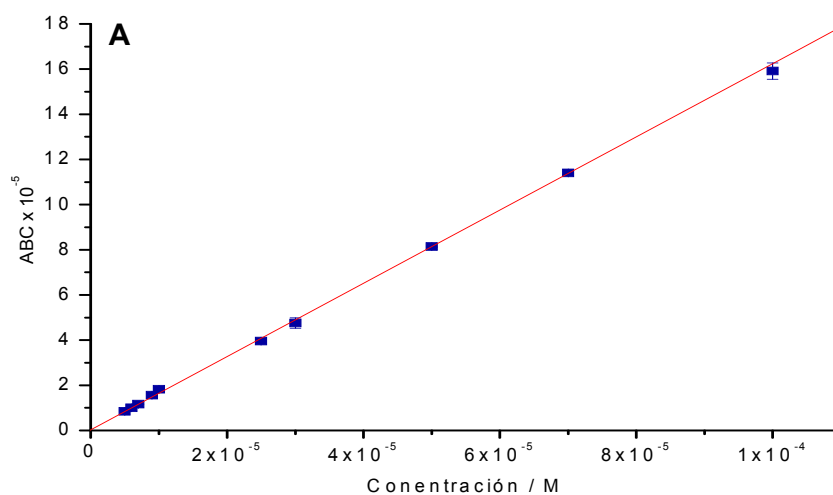


Figura 17: Cromatograma para PFNB (1), la solución utilizada en este estudio fue 1×10^{-4} M.

Una vez logradas las condiciones experimentales, se procedió a la obtención de los parámetros analíticos, comenzando por la construcción de las curvas de calibración (**Figura 18**).



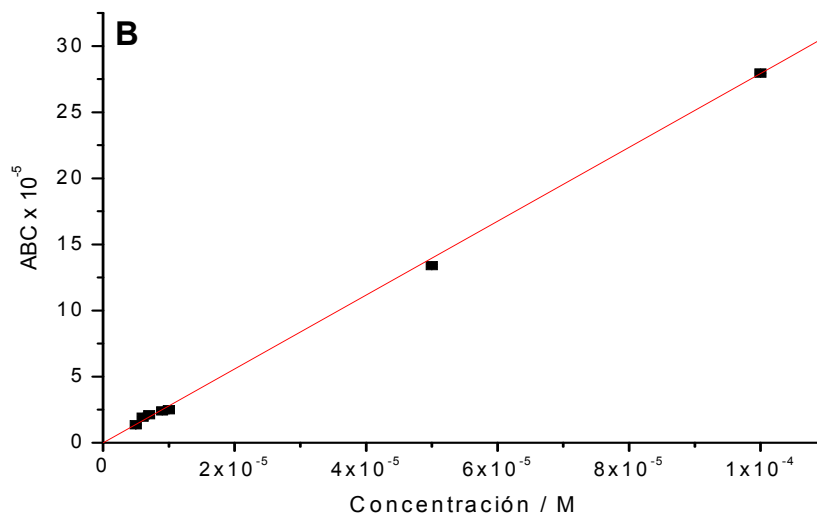


Figura 18: Curvas de calibración con sus respectivos rangos de concentración. (A) **PFNB**, (B) **PNB**

Una vez construidas las gráficas, las ecuaciones para cada curva de calibración serian las siguientes:

$$\text{PFNB} \Rightarrow \text{ABC} = 1,62 \times 10^{10} [\text{M}^{-1}] \times \text{C} [\text{M}] + 3073,4 \quad (r = 0,99997, n = 10)$$

$$\text{PNB} \Rightarrow \text{ABC} = 2,79 \times 10^{10} [\text{M}^{-1}] \times \text{C} [\text{M}] - 697,82 \quad (r = 0,99978, n = 7)$$

A continuación se expone un cuadro resumen (**tabla 5**) con los parámetros analíticos obtenidos.

Tabla 5. Parámetros analíticos para la determinación de PNB y PFNB por HPLC

	PFNB	PNB
Condiciones Experimentales	Acetonitrilo / agua (60:40) λ 254	Acetonitrilo / agua (60:40) λ 262
Rangos de concentración	5 μ M hasta 100 μ M	5 μ M hasta 100 μ M
Repetibilidad CV (%)	2,76 (100 μ M) 4,2 (25 μ M) 0,77 (6 μ M)	2,35 (100 μ M) 1,11 (9 μ M) 0,75 (5 μ M)
Reproducibilidad CV (%)	4,05 (100 μ M) 3,09 (25 μ M) 3,07 (6 μ M)	1,66 (100 μ M) 2,99 (9 μ M) 0,67 (5 μ M)
Sensibilidad	$1,62 \times 10^{10}$	$2,79 \times 10^{10}$
LD	$3,07 \times 10^{-6}$ M	$7,22 \times 10^{-7}$ M
LQ	1×10^{-5} M	$9,84 \times 10^{-7}$ M

3.5 Aplicaciones

3.5.1 Estudio de excipientes por polarografía de pulso diferencial

El estudio de interferentes fue realizado para PFNB y PNB, en disoluciones a las cuales se adicionaron distintos excipientes clásicos de formulaciones farmacéuticas, para apreciar el impacto que puedan tener sobre la respuesta electroquímica.

Los resultados de este estudio son los expuestos en la **Tabla 6**, en ella se muestra para el caso de PFNB, el porcentaje de respuesta que presenta la solución (más el excipiente) en cuanto a la intensidad de la corriente, respecto a la solución sin excipiente. Para el caso de PNB, por el hecho de presentar mucha dispersión en la

señal de respuesta, se optó por determinar el porcentaje de respuesta respecto al área bajo la curva de la señal 2.

Como se puede apreciar en la tabla, los excipientes que más afectan la respuesta electroquímica para PFNB, disminuyendo la respuesta frente al electrodo, son la hidroxipropilmetilcelulosa y el PEG 400. En el caso de PNB son los dos excipientes antes nombrados más la hidroxipropilcelulosa. Esto puede deberse a un aumento en la viscosidad de la solución, razón por la cual se podría ver afectado el proceso de difusión de los compuestos.

Tabla 6: Estudio de excipientes realizado para ambos compuestos a una concentración de 1×10^{-4} M.

	PFNB	PNB (señal 2)
Excipiente	% de respuesta (A)	% de respuesta (B)
Almidón	93,6	98,4
Explotab	98,6	100,1
Avicel PH 101	96,4	99,9
Lactosa	101,4	100,4
Hidroxipropilcelulosa	95	82,3
Hidroxipropilmetilcelulosa	26,1	11,4
Sorbitol	102,1	100,3
Dióxido de titanio	102,8	100,3
PEG 400	39,4	70
Talco	101,4	99,1

- **A:** I_p solo de PFNB = $-1,41 \mu A$ (correspondiente al 100% de la respuesta)

- **B:** Potencial solo de PNB = $-199,11 nV$ (correspondiente al 100% de la respuesta)

Una vez realizados estos estudios de excipientes por separado, se procedió a realizar una nueva medición por triplicado (**Tabla 7**) con aquellos excipientes que no provocaron gran variación. En el caso de PNB, esta medición se realizó a dos concentraciones, cada una perteneciente a los distintos tramos lineales de su curva de calibración, esto para ver si hay influencia de la concentración.

Tabla 7: Porcentajes de recuperación con la mezcla de excipientes

	PFNB	PNB 9×10^{-5} M	PNB 8×10^{-6} M
Porcentaje de recuperación	101,5	99,06	98,76

3.5.2 Determinación de coeficiente de partición ($\log P_{ow}$)

Para la determinación de este parámetro se realizó una curva de calibración mediante HPLC, en la cual se graficó $\log P$ versus $\log k$ (k = factor de capacidad). Para tal efecto se seleccionaron seis sustancias de referencia⁴² de coeficiente de partición octanol/agua conocidos (ácido benzoico, benzofenona, difenilamina, fenantreno, naftaleno, timol) (**Tabla 8**), cercanos al coeficiente de partición estimado para PFNB y PNB (obtenidos en HyperChem 6.01, basado en el método de *Ghose, Pritvchett y Crippen*), los cuales fueron de 4,44 y 4,26, respectivamente. Para realización de esta determinación se siguió la metodología descrita, obteniéndose los siguientes valores de $\log k$ descritos en la tabla 8.

Tabla 8: Valores obtenidos de $\log k$ y valores de $\log P_{ow}$ de sustancias de referencia utilizadas

Referencia	Log k	Log P_{ow}
Ac. benzoico	-0,513	1,9
Benzofenona	0,303	3,2
Timol	0,403	3,3
Difenilamina	0,438	3,4
Naftaleno	0,596	3,6
Fenantreno	1,009	4,5

Al graficar los valores obtenidos, se obtuvo la siguiente curva:

$$\log k = - 1,59 + 0, 59 \log P_{ow} \quad (r = 0,995, n = 6)$$

Para PFNB y PNB se obtuvieron valores de $\log k$, de 0,288 y 0,047 respectivamente, al reemplazar estos valores en la ecuación de la recta se interpolaron los valores de $\log P_{ow}$ y se obtuvo para PFNB un valor de $\log P_{ow}$ igual a 3,18 y para

PNB un valor igual a 2,77. Estos valores dan cuenta del alto carácter apolar de los compuestos en estudio, lo cual los hace buenos candidatos para un paso a través de membranas biológicas por difusión pasiva.

3.5.3 Determinación de constantes de acidez (pKa)

En el estudio espectrofotométrico realizado anteriormente, las longitudes de ondas máximas de absorción fueron a 236 - 254 nm para PFNB y 230 - 263 para PNB. Posteriormente se construyeron gráficas que relacionan el pH con la absorbancia a una longitud de onda fija, revelando que la absorbancia es independiente de la acidez del medio, a valores de pH 2,0 - 3,5 y superiores a 6,0 (**Figura 19A - 19B**). Del comportamiento de la absorbancia de las señales espectrales a 236 nm para PFNB y a 230 en el caso de PNB, se puede inferir que ambos compuestos presentan sólo una constante de disociación en el rango de pH estudiado y que esa constante sería similar para ambos compuestos, ya que ambos están sustituidos en la misma posición además de ser similares estructuralmente.

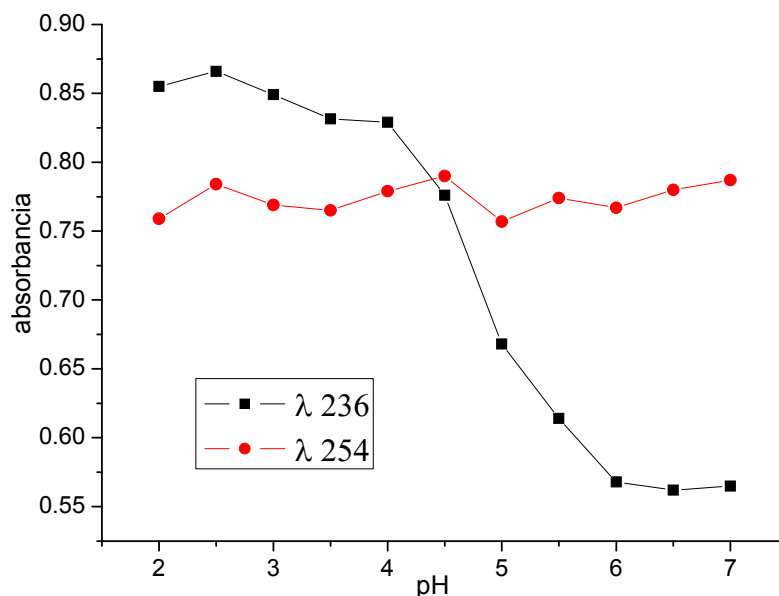


Figura 19A: Dependencia de la absorbancia de PFNB con el pH (2.0 - 7.0) a λ 236 y 254 nm.

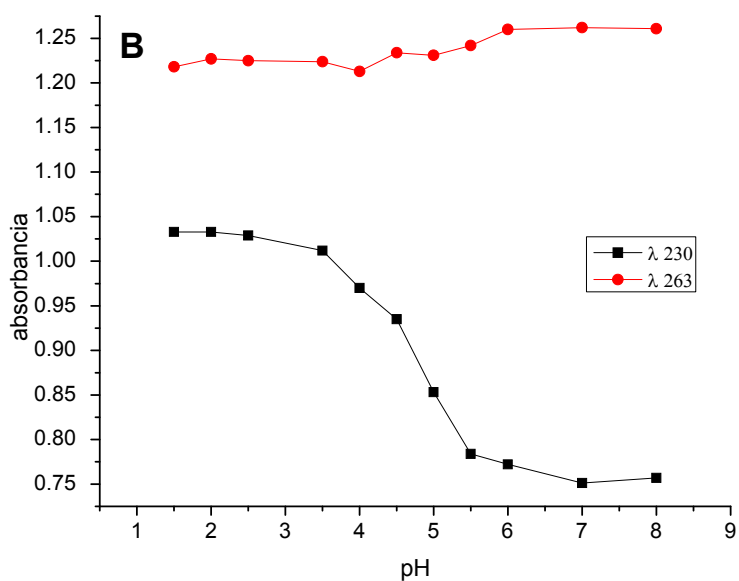


Figura 19B: Dependencia de la absorbancia de PNB con el pH (2.0 – 8.0) a λ 230 y 263 nm.

Los datos obtenidos en este estudio fueron utilizados para calcular los pK_a de NB y BNB, de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbach modificada (Ecuación 5). Los valores de pK_a para NB y BNB fueron calculados por el método de regresión lineal, donde el pH fue la variable dependiente y el $\log [(A_{\max} - A)/(A - A_{\min})]$ la variable independiente, como se presenta en la **Figura 20**. De esta forma, los valores de pK_a obtenidos fueron de $4,86 \pm 0,06$ para PNB y de $4,78 \pm 0,06$ para NB.

De acuerdo a la literatura⁴³, el valor de la constante de acidez determinado para benzimidazol por el sistema predictivo computacional, corresponde a un pK_a de 5,41 para el nitrógeno en posición 3 (-N=C-). Por otra parte, existen descritos valores de pK_a determinados por titulación potenciométrica⁴⁴ para el nitrógeno en posición 3 del anillo benzimidazólico de 5,47 y 5,69, en tanto que para 2-fenilbenzimidazol se reportan valores de 5,14 y 5,36. En nuestro caso, a través de la técnica espectrofotométrica, se obtuvieron para PNB un pK_a de 4,86 y para NB uno de 4,79, ambos para el nitrógeno en posición 3. Estos valores coinciden con los pK_a calculados para los otros compuestos integrantes de la serie, lo que daría cuenta del equilibrio ácido base del nitrógeno en posición en 3 (**Figura 21**). Estos valores son cercanos a

los reportados en literatura para moléculas con el anillo base benzimidazol, lo cual concordaría con los valores obtenidos para nuestros compuestos de síntesis. Además en comparación con el pK_a obtenido para el nitrógeno en posición 3 de 2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol (**5,69**), los valores son menores, lo que estaría de acuerdo a lo que se esperaba obtener con una sustitución en la posición 1 del anillo benzimidazólico.

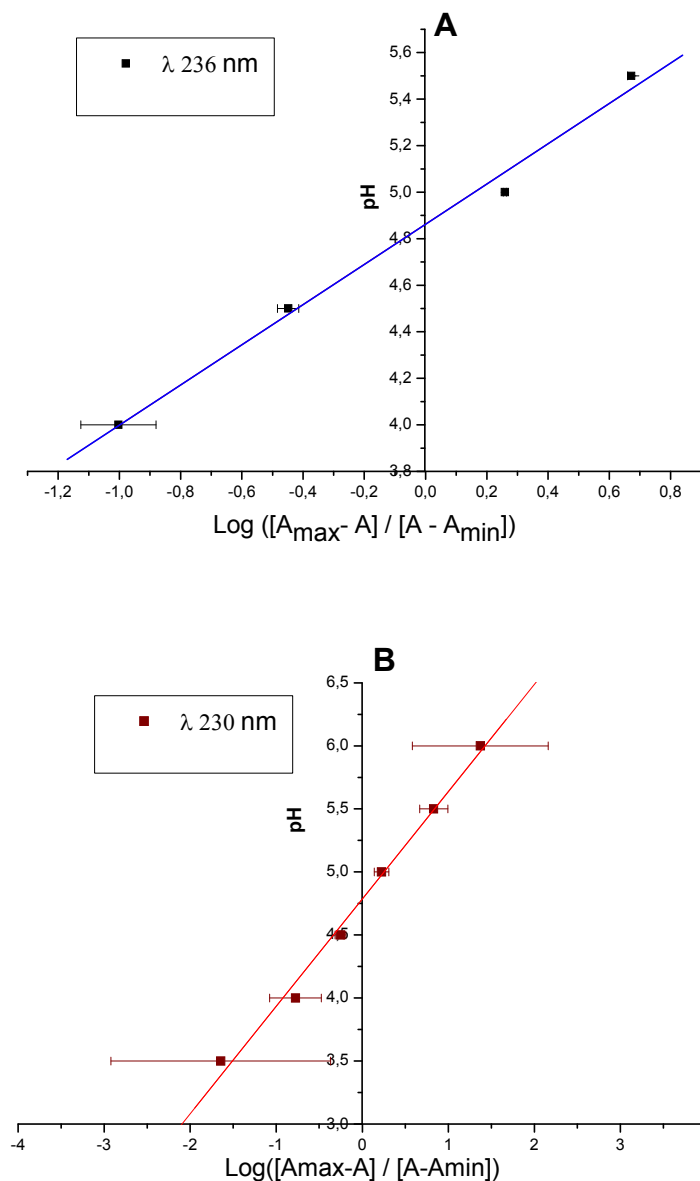


Figura 20: Determinación de pK_a por UV-Vis mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach. **(A)** PFNB **(B)** PNB.

Por otro lado, comparando los pK_a calculados para PNB y PFNB con el comportamiento electroquímico, se puede apreciar que existe una relación directa entre los quiebres a pH 4,0 para ambos compuestos en el comportamiento del potencial de reducción de estos con el pH (Figuras 3a - c).

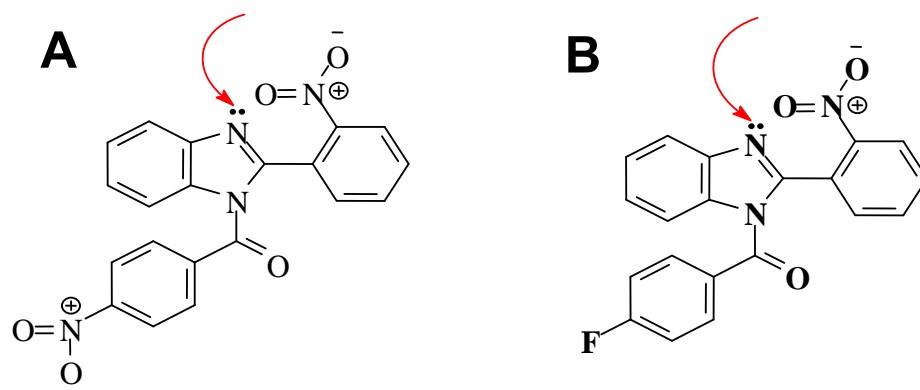


Figura 21: (A) Sitio de ionización de PNB. (B) Sitio de ionización de PFNB.

3.5.4 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de PNB por PPD, en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3,0 a temperatura ambiente por 5 horas. Para tal efecto se siguió la disminución de la señal 2 de PNB, a aproximadamente -330 mV. En las condiciones ensayadas se encontró que PNB decae aproximadamente un 14% (**Figura 22**)

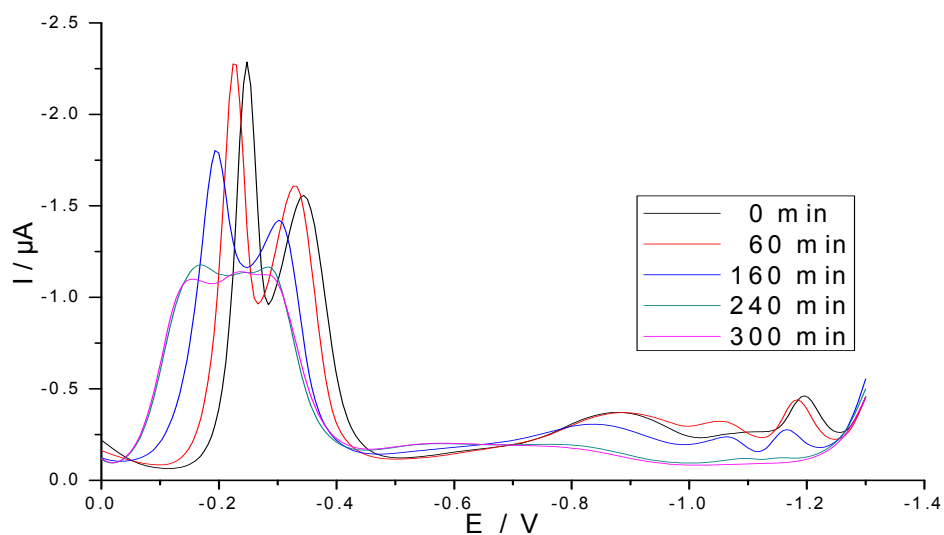


Figura 22: Evolución en el tiempo de los polarogramas de PNB en acetonitrilo/tampón fosfato 0.2 M (50:50) a pH 3, a temperatura ambiente por 5 horas

Al graficar la evolución de la intensidad de corriente de la señal 2 en el tiempo (Fig. 23), se puede apreciar que esta no sufre grandes cambios durante los primeros 30 minutos, sin embargo luego decae linealmente a medida que transcurre el tiempo. Al graficar las concentraciones correspondientes en esta zona lineal vs tiempo (Fig. 24), se observa que el decaimiento se ajusta a un pseudo orden cero, de acuerdo a la ecuación: $C (M) = -1,9571 \times 10^{-7} t (\text{min}) + 1,36 \times 10^{-4}$ ($r = 0,993$).

De esta forma, la constante de degradación para PNB en estas condiciones corresponde a $1,9571 \times 10^{-7} \text{ M/min}$, con lo cual, una disolución de PNB de concentración $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ presentaría una vida media de alrededor de 4 horas

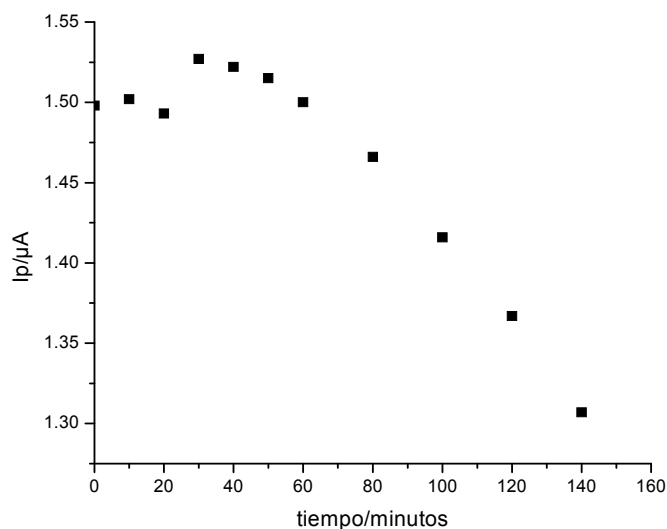


Figura 23: Evolución en el tiempo de la corriente de la señal 2 de PNB en acetoniitrilo/tampón fosfato 0.2 M (50:50) a pH 3, a temperatura ambiente por 5 horas.

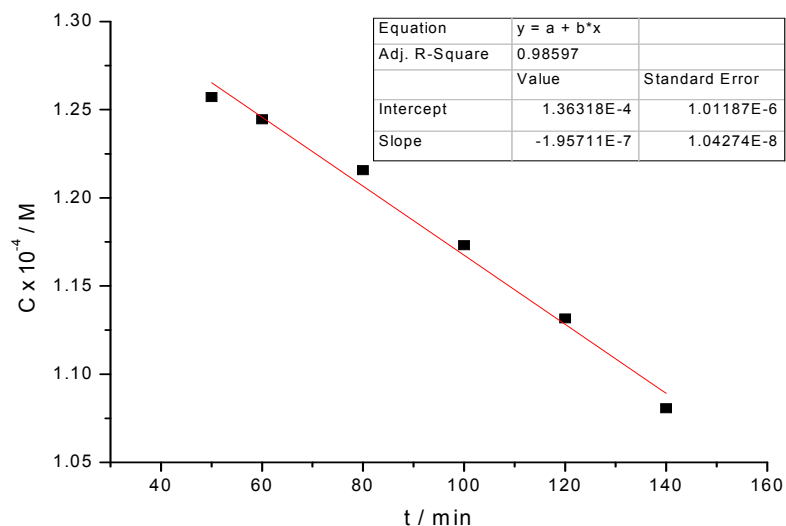


Figura 24: Gráfica de orden cero para la degradación de PNB en acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) a pH 3,0 a temperatura ambiente.

También se evaluó la estabilidad de PNB a pHs más alcalinos (7 y 8,2); encontrándose una disminución en la intensidad de corriente de la señal 2 de un 70% a las 6 horas y 75% a las 4 horas, respectivamente, a 25°C en solución de acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50:50) (**Figura 25**).

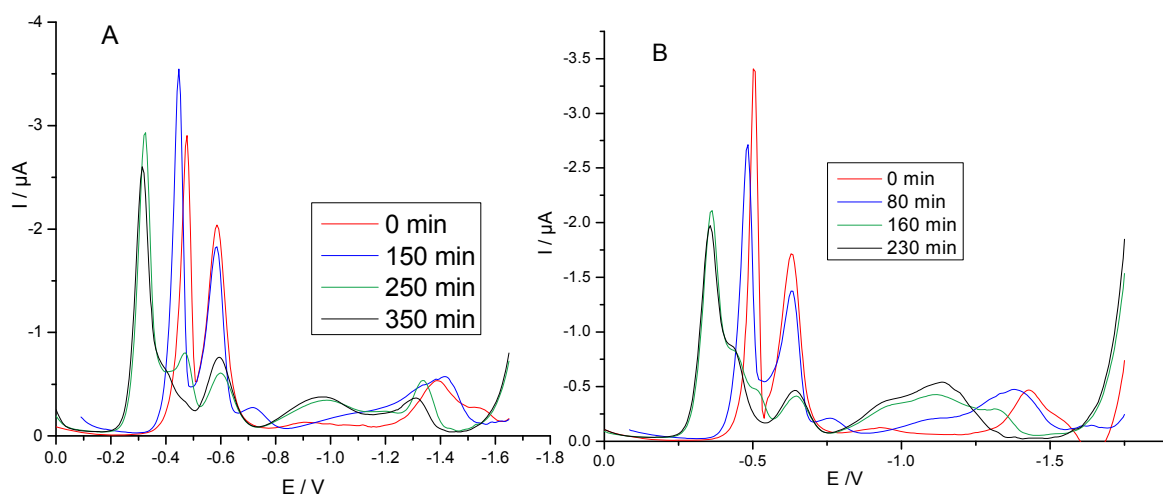


Figura 25: Evolución de los polarogramas de PNB en el tiempo a temperatura ambiente. A. pH 7,0, acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50/50). B. pH 8,2, acetonitrilo/tampón fosfato 0,2 M (50/50).

4. CONCLUSIONES

- ❖ PNB y PFNB en sus respectivas mezclas de solventes, fueron electro-activos, presentando respuesta catódica (con dos señales para PFNB y tres para PNB) bien definidas en los rangos estudiados para cada compuesto, empleando PPD o PTAST, respectivamente. Además las señales de reducción fueron dependientes del pH, desplazándose hacia potenciales negativos con el aumento de este.
- ❖ Si bien, las rutas sintéticas para estos compuestos ya estaban descritas, es importante tener en cuenta para una futura repetición de estas síntesis, el hecho de que los compuestos son muy sensibles a la presencia de agua en el medio de reacción al momento de realizar la acilación con el haluro de benzoilo, constituyendo el caso extremo el compuesto N-(4-metoxi-benzoil)-2-(*o*-nitrofenil)-benzimidazol, cuyo rendimiento cayó a un 5,36 %.
- ❖ Por UV-Vis ambos compuestos presentaron sólo un máximo de absorción dependiente del pH a 236 nm para PFNB y a 263 nm para PNB, los cuales fueron utilizados para determinar sus constantes de acidez, obteniéndose: $pK_a = 4,86$ para PFNB y un $pK_a = 4,79$ para PNB. El pK_a para ambos compuestos corresponde al nitrógeno (-N=C-) ubicado en la posición 3 del anillo benzimidazol.
- ❖ Se desarrollaron metodologías analíticas por PPD, espectrofotometría UV-Vis y HPLC, obteniéndose resultados con buena resolución y selectividad. Las tres técnicas presentaron valores adecuados de reproducibilidad ($CV < 4.5\%$) y repetibilidad ($CV < 4\%$), presentando linealidad en un amplio rango de concentración, desde $4,0 \times 10^{-6}$ M hasta $1,0 \times 10^{-4}$ M, para ambos compuestos.
- ❖ En el estudio de excipientes farmacéuticos realizado por la técnica PPD con vistas a futuras formas farmacéuticas, se puede decir que afectan la señal de reducción frente al electrodo de mercurio, disminuyendo la respuesta en forma significativa, los interferentes involucrados son hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y PEG 400, para ambos compuestos en estudio.

- ❖ El método empleado para la obtención de $\log P_{ow}$ resultó satisfactorio y rápido. Además, de los resultados obtenidos, se puede decir que se estos presentan un alto valor, debido al elevado carácter apolar que presentan el anillo base y los sustituyentes en el, presentes.

- ❖ Del estudio preliminar de estabilidad realizado para PNB a pH 3,0 y a temperatura ambiente, se obtuvo un decaimiento que se ajusta a un pseudo orden cero, con una vida media de alrededor de 4 hrs. A pHs más alcalinos (7,0 y 8,2) hubo una degradación de la señal cercana al 70 y 75%, a las 6 y 4 horas, respectivamente, lo cual indica la elevada inestabilidad de este compuesto en soluciones acuosas a pHs alcalinos.

- ❖ En base a los conocimientos fisicoquímicos logrados para estos integrantes de la serie, podría existir la factibilidad de incluir cambios en las estructuras moleculares de los compuestos para así lograr una mayor estabilidad o un mejor paso a través de membranas.

5. REFERENCIAS

1. E. Lacey, *Int. J. Parasitol.* 1988, 18, 885.
2. C. Kus, H. Goker, G. Ayhan, R. Ertyan, N. Altanlar, A. Akin, *Farmaco* 1996, 51, 413.
3. C.J. Going, V.W. Mayer, *Mut. Res.* 1995, 343, 185.
4. L. Hall, L. Kier, *J. Pharm. Sci.* 1978, 67, 1743.
5. J.S. Kim, B. Gatto, C. Yu, A. Liu, L.F. Liu, E.J. Lavoie, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 992.
6. H. Nivinskas, R. L. Koder, Ž. Anusevičius, J. Šarlauskas, A. Miller, N. Čėnas, *Arch. Biochem. and Biophysics.* 2001, 385, 170.
7. E. Grundberg, E.H. Titsworth, *Annu. Rev. Microbiol.* 1973, 27, 317.
8. G. L. Kedderis, G. Miwa, *Drug. Metab. Rev.* 1988, 19, 31.
9. J. C. Spain, *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, 49, 523.
10. J.L. Holtzman, D.L. Crankshaw, F.J. Peterson, C. F. Polnaszek, *Mol. Pharmacol.* 1981, 20, 669.
11. V. M. Orna, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 12379.
12. N. Čėnas, Ž. Anusevičius, D. Bironaitė, G.I. Bachmanova, A.I. Archakov, K. Ollinger, *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 315, 400.
13. F.J. Peterson, R.P. Mason, J. Hovsepian, J.L. Holtzman, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 4009.
14. C. Viodé, N. Bettache, N. Cenas, L. Krauth-Siegel, G. Chauvière, N. Bakalara, J. Périé, *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57, 549.
15. R. J. Riley, P. Workman, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 1657.
16. R. J. Knox, F. Friedlos, M.P. Bolland, *Cancer Metastasis Rev.* **1993**, 12, 195.
17. C. Bryant, M. DeLuca, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4119.
18. I.A. Valderrama, H. Pessoa-Mahana, G. Sarrás, R. Tapia, *Heterocycles* **1999**, 51, 2193.
19. H. Pessoa-Mahana, C.D. Pessoa-Mahana, R. Salazar, J.A. Valderrama, E. Saez, R. Araya-Maturana, *Synthesis* **2004**, 3, 436.
20. K.C. Waterman, R.C. Adami, *Int. J. Pharm.* **2005**, 293, 101.
21. B.D. Glass, C. Novak, M.E. Brown, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, 77, 1013.
22. M. Bakshi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28, 1011.
23. L. Xing, R.C. Glen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42, 796.

24. C. Hansch, H. Gao, D. Hoekman, In *Comparative QSAR*; Devillers, J., Ed.; Taylor and Francis: Washington, DC, **1998**, 285.
25. W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**.
26. A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525.
27. C. Hansch, D. Hoekman, A. Leo, L.T. Zhang, P. Li, *Toxicol. Lett.* **1995**, 79, 45.
28. T. Braumann, *J. Chromatogr.* **1986**, 373, 191.
29. K. Mjesnik-Dejanovic, S.E. Cabaniss, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 1108.
30. W. Klein, W. Kordel, M. Weis, M.J. Poremski, *Chemosphere* **1988**, 261, 361.
31. M. Roses, I. Canals, H. Alleman, K. Siigur, E. Bosch, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4094.
32. C. Coty, *Drug Discovery Dev.* **2003**, 6, 55.
33. A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson, K.Y. Tam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 20, 631.
34. J.L. Ganuza, M^a Pilar Casas, M^a Pilar Queipo. Química, Mc Graw Hill **1998**, 163-183.
35. M. Castro, S. Gascon, M. Pujol, J. Soms, L. Vicente, Validación de métodos analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, **1989**, 67-93
36. O.A. Quattrocchi, S.A. de Andrizzi, R.F. Laba. Introducción a HPLC aplicación y práctica **1992**, 321-328.

- 37 K. Connors. Curso de análisis farmacéutico. Ed Reverté. **1980**.
- 38 W. Klein, W. Kordel, M. Weis, M.J. Poremski, *Chemosphere* **1988**, 261, 361.
- 39 M. Roses, I. Canals, H. Alleman, K. Siigur, E. Bosch, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4094.
- 40 USP 27-NF 22. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville M.D. USA. **2004**
- 41 E. Hammam, A. Tawfik, M.M. Ghoneim, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 36 149.
- [42] European commission, European Chemicals Bureau, documentation ANNEXV A.8. Partition Coefficient, disponible en <http://ecb.jrc.it/>
- 43 T.N. Brown, N. Mora-Diez, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 9270.
- 44 K. K. Donkor, B. Kratochvil. *J. Chem. Eng. Data* **1993**, 38, 569.