

**ESTUDIO Y DETERMINACION ELECTROANALITICA DE NITRO
DERIVADOS DE IMPORTANCIA BIOLOGICA**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Química

04-02/2035

Facultad de Ciencias



por

Pablo Roberto Richter Duk

-1990-

Patrocinante: Dr Alfonso Morales Barañao

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato:

PABLO ROBERTO RICHTER DUK

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Química.

Director Patrocinante de Tesis:

Prof. Dr. Alfonso Morales B.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Alfonso Morales B.", written over a horizontal line.

Comisión Informante de Tesis:

Prof. Dr. Mario Bodini

Prof. Dr. Jaime Chiang

Prof. Dr. Raul Morales

Prof. Dr. J. Arturo Squella

Four handwritten signatures in dark ink, each written over a horizontal line. The signatures are: "Mario Bodini", "Jaime Chiang", "Raul Morales", and "J. Arturo Squella".

1990



A MIS PADRES, por su apoyo sincero e incondicional.

A LILIAN, por su paciencia y comprensión

A MIS HERMANOS, por su cariño y apoyo

A MI HIJA, por su dulzura.

Agradecimientos

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

- Mi profesor guía Dr. Alfonso Morales B. por su interés, inapreciable amistad, su constante ayuda y estímulo en el desarrollo de esta tesis.
- Prof. Maria Inés Toral P. por su gran ayuda, apoyo y amistad.
- Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Un especial reconocimiento a los profesores Dra. Irma Crivelli y Dr. Carlos Andrade por su importante contribución en mi formación.
- Dr. Bruce Cassels por realizar la síntesis del compuesto:
(±)-1-(2,5-Dimetoxi-4-nitrofenil)-2-aminopropano.
- DTI de la Universidad de Chile (Proyecto Q-2443) y a FONDECYT (Proyecto 90-0028) por los aportes financieros que hicieron posible la realización de esta tesis.
- A todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis.

Indice de materias

	Pág.
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales de los Nitro Derivados en Estudio	6
1.1.1. Cloranfenicol	6
1.1.2. Paratión	8
1.1.3. (\pm)-1-(2,5-Dimetoxi-4-Nitrofenil)-2-aminopropano	10
1.1.4. 7-Nitrobenzodiazepinas	10
1.1.5. Derivados Nitrofuránicos	14
2. Parte Experimental	18
2.1. Reactivos	18
2.2. Instrumentos	20
2.3. Procedimiento General	21
2.4. Calibración	21
2.5. Determinaciones Polarográficas en Formulaciones Farmacéuticas	22
2.6. Determinación de Paratión en Vegetales	23
2.7. Determinaciones Polarográficas de Nitro Derivados en Orina	23
3. Resultados y Discusión	25
3.1. Estudio Electroquímico de Nitrobenzeno	28
3.2. Estudio Electroquímico de Nitrofenoles y Nitroanilinas	44
3.3. Estudio Electroquímico de Nitro Derivados de	

Importancia Bilógica	59
3.3.1. Estudio Electroquímico de Cloranfenicol	59
3.3.2. Estudio Electroquímico de Paratión	60
3.3.3. Estudio Electroquímico de (±)-1-(2,5-Dimetoxi-4-Nitrofenil)-2-aminopropano	61
3.3.4. Estudio Electroquímico de 7-Nitro-1,4-Benzodiazepin-2-onas y de sus Productos de Hidrólisis ácida 2-Amino-5-nitrobenzofenonas	71
3.3.5. Estudio Electroquímico de Nitrofuranos	90
3.4. Determinación Polarográfica de Nitro Derivados de Importancia Biológica	120
3.4.1. Rango de pH para las Determinaciones Analíticas	122
3.4.2. Límites de Detección y de Cuantificación	125
3.5. Aplicaciones Analíticas	129
3.5.1. Determinación Polarográfica de Nitro Derivados en Formulaciones Farmaceuticas	129
3.5.2. Determinación Polarográfica de Paratión en Tejidos Vegetales	129
3.5.3. Determinación Polarográfica de Nitro Derivados en Orina	135
3.5.4. Límites de Detección y de Cuantificación Utilizando Polarografía de Pulso Diferencial	136
3.5.5. Determinaciones Simultaneas de Nitro Derivados	138
4. Conclusiones	143
5. Referencias	146

Lista de Tablas

	Pág.
1.- Datos voltamétricos para la reducción de NB en CTMA-piridina-ácido fórmico, pH = 4,5.	38
2.- Efecto de la concentración de NB y pNF sobre los valores de la corriente de difusión i_d .	48
3.- Datos polarográficos para la reducción de Cloranfenicol, Paratión y DON, a una concentración de 0,124 mM. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico.	67
4.- Datos Coulombimétricos para la reducción de Cloranfenicol, Paratión y DON. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido Fórmico, pH 4,5. Tiempo de electrólisis, 40 min.	67
5.- Coeficientes de difusión y datos coulombimétricos para la reducción electroquímica de Nitrofurantoina, Nitrofurazona, Furazolidona y Nifuroxima. Electrolito soporte, CTMA-Piridina-ácido fórmico, pH 4,5.	96
6.- Datos polarográficos y coulombimétricos para la reducción de compuestos derivados del 2-Nitrofurano. Electrolito soporte, CTMA-	

piridina-ácido fórmico. Concentración, 0,124 mM, pH 4,5.	99
7.- Ecuaciones que describen el comportamiento del potencial de media onda polarográfico con el pH, para Nitrofurantoina, Nitrofurazona y Furazolidona.	107
8.- Datos voltamétricos para la reducción de Nitrofurazona y Furazolidona. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico pH 4,5.	115
9.- Resumen de datos voltamétricos para todos los nitro derivados estudiados. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico. pH=4,5	117
10.- Rango de pH óptimo para la determinación polarográfica de diferentes compuestos nitro derivados. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico.	123
11.- Ecuaciones de regresión que describen el comportamiento de la corriente de difusión $i_d/\mu A$ con la concentración/mM de compuestos nitro derivados.	124
12.- Límites de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.) para la determinación de diferentes nitro derivados de importancia biológica mediante polarografía d.c. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.	128

- 13.- Análisis del método polarográfico en dos series de soluciones de concentración 2 $\mu\text{g/ml}$ y 40 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. 130
- 14.- Determinación polarográfica de diferentes nitro derivados en formulaciones farmacéuticas. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. 131
- 15.- Estudio de la recuperación de Nitrofurantoina en muestras sintéticas. Cantidad agregada: 100 mg. 132
- 16.- Estudio de la cantidad de Paratión remanente en hojas de maiz al segundo día de haber sido fumigadas. 134
- 17.- Análisis de Paratión en hojas de maiz previamente fumigadas. 134
- 18.- Porcentaje de excreción urinaria de nitro derivados en muestras de orina obtenidas a diferentes intervalos de tiempo despues de la administración de una dosis única de droga. 137
- 19.- Límites de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.) para la determinación de diferentes nitro derivados de importancia biológica mediante polarografía de pulso diferencial. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. 139

Lista de Figuras

	Pág.
1.- Estructura molecular de Cloranfenicol [D-Treo-2-cloroacetamido-1-(4-nitrofenil)-propanodiol-(1,3)].	7
2.- Estructura molecular de Paratión [O,O-dietyl-O-(4-nitrofenol)-fosforotioato].	9
3.- Estructura molecular de los 4-derivados del 1-(2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano. X=Br, DOB; X=CH ₃ , DOM; X=C ₂ H ₅ , DOET y X=NO ₂ , DON.	11
4.- Estructura molecular de derivados 7-nitro-1,4-benzodiazepinicos. R ₁ =H y R ₂ =H, Nitrazepam; R ₁ =CH ₃ y R ₂ =F, Flunitrazepam; R ₁ =H y R ₂ =Cl, Clonazepam.	13
5.- Estructuras moleculares de derivados 5-Nitro-furánicos: Nitrofurazona, Furazolidona, Nitrofurantoína y Nifuroxima.	15
6.- Onda de reducción polarográfica de Nitrobenceno 0,631 mM. Electrolito Soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. E _½ - 0,40; i _d 8,70 µA.	29
7.- Efecto del pH sobre los potenciales de media onda para la reducción de Nitrobenceno a 0,210 mM.	31

- 8.- Espectros U.V. de una solución 0,424 mM de NB, pH 4,5. (A) antes y (B) después de una electrólisis a potencial controlado a -0,7 V vs ECS 33
- 9.- Voltamograma cíclico de Nitrobenceno a 0,631 mM. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. Electrodo de Carbono vitreo; Velocidad de barrido 0,1 V/s; Pico A corresponde a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina; Picos B y C denotan la cupla redox nitroso- hidroxilamina. 36
- 10.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión para la reducción de Nitrobenceno a 0,210 mM. $i_{d1} + i_{d2}$ 39
- 11.- Voltamograma cíclico de Nitrobenceno a 0,196 mM en medio alcalino; pH 11,8; Electrodo de Carbono vitreo; Velocidad de barrido 0,1 V/s; Picos A, B y C como en la fig. 9 pero desplazados catódicamente; Pico E denota la oxidación del nitro-anión radical formado en D. Línea segmentada se obtiene al invertir el barrido después del pico D. 41
- 12.- Onda de reducción polarográfica de p-Nitrofenol a 0,124 mM; condiciones como en fig. 6; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 2,40 μ A. 46
- 13.- Dependencia de la onda de reducción

- polarográfica de p-Nitrofenol con el pH. (Esquemáticamente) en tampones: Britton Robinson, Mc Ilvaine, Citrato y Acetato. 49
- 13a.-Espectros U.V. de una solución de:(a) p-nitrofenol 0,424 mM, pH 4,5; (A) antes y (B) despues de una electrólisis a potencial controlado -0,7 V. (b) Espectro U.V. de una solución de p-aminofenol 0,424 mM, pH 4,5. 52
- 14.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión en la reducción de p-Nitrofenol a 0,124 mM. $i_{d1} + i_{d2}$. 54
- 15.- Ondas de reducción polarográficas de Cloranfenicol, Paratión y DON a la misma concentración de 0,289 mM. Otras condiciones como en Fig. 6. (A) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,420 V; i_d 3,60 μ A. (B) Paratión; $E_{1/2}$ -0,320 V; i_d 3,50 μ A. (C) DON; $E_{1/2}$ -0,390 V; i_d 3,38 μ A. 63
- 16.- Ondas de reducción polarográficas de Paratión y de p-Nitrofenol a la misma concentración de 0,226 mM. Otras condiciones como en Fig. 6. (A) Paratión; $E_{1/2}$ -0,320 V; i_d 2,87 μ A. (B) p-Nitrofenol; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 4,00 μ A. 65
- 17.- Voltamograma cíclico de Cloranfenicol a 0,476 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. 68
- 18.- Voltamograma cíclico de Paratión a 0,124

mM. Otras condiciones como en Fig. 9.	69
19.- Voltamograma cíclico de DON a 0,219 mM, pH 3. Otras condiciones como en Fig. 9.	70
20.- Ondas de reducción polarográficas de Nitrazepam a 0,184 mM. Otras condiciones como en Fig. 6.	73
21.- Voltamograma cíclico de Nitrazepam a 0,196 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. Pico B denota la reducción del grupo 4,5 azometino. Línea segmentada se obtiene cuando el barrido se invierte antes del pico B.	76
22.- Ondas de reducción polarográficas de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,184 mM. Otras condiciones como en la Fig. 6.	79
23.- Polarogramas de 2-amino-5-nitrobenzofenona 0,062 mM en tampón acético-acetato. (A) pH 1,9 (B) pH 4,5 (C) pH 6,8 (D) pH 8,0 (E) pH 9,0 (F) pH 12,5.	81
24.- Voltamograma cíclico de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,196 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. Para detalles ver el texto.	83
25.- Voltamograma cíclico de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,196 mM. Otras condiciones como en la Fig. 9, excepto que el tampón pH 4,5 corresponde a ácido fórmico-	

- formiato. Para mayores detalles ver el texto. 86
- 26.- Voltamograma cíclico de p-fenilendiamina a 0,196 mM en (a) Tampón piridina-ácido fórmico; pH 4,5. (b) Tampón acético-acetato; pH 4,5. Otras condiciones como en Fig. 9. 88
- 27.- Ondas de reducción polarográficas de Nitrofurazona, Furazolidona y nitrofurantoína a la misma concentración de 0,124 mM. Otras condiciones como en Fig. 6.
- (A) Nitrofurazona; $E_{1/2}$ -0,180 V; i_d 2,30 μ A.
(B) Furazolidona; $E_{1/2}$ -0,170 V; i_d 2,29 μ A.
(C) Nitrofurantoína; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 2,27 μ A. 92
- 28.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoína y p-nitrofenol a la misma concentración de 0,124 mM. Otras condiciones como en Fig. 6. (A) Nitrofurantoína; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 2,40 μ A. (B) p-Nitrofenol; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 2,38 μ A. 94
- 29.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoína y cloranfenicol a la misma concentración de 0,250 mM. Otras condiciones como en Fig. 6. (A) Nitrofurantoína; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 4,70 μ A. (B) Cloranfenicol $E_{1/2}$ -0,430 V; i_d 3,20 μ A. 95
- 30.- Voltamogramas cíclicos de: (a) Nitrofurazona; (b) Furazolidona; (c)

- Nitrofurantoina a la misma concentración de 0,476 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. Pico A denota la reducción del grupo nitro a la amina primaria y B corresponde a la oxidación de la amina a la correspondiente imina. 102
- 31.- Voltamograma cíclico de nitrofurazona en las mismas condiciones de la Fig. 30, excepto que la velocidad de barrido de potencial es de 0,3 V/s. Picos B,C denotan la cupla redox amina-imina. 104
- 32.- Efecto del pH sobre los potenciales de media onda para la reducción de (a) Nitrofurazona y (b) Furazolidona a una concentración de 0,124 mM. 106
- 33.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión en la reducción de nitrofurazona a 0,124 mM. 109
- 34.- Análisis logarítmico de la onda de reducción polarográfica de nitrofurantoina a pH 2,6. Pendientes 50 y 77 mV. 111
- 35.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoina a 0,124 mM y a pH 11,1. Este valor de pH se logró agregando NaOH 6 M al electrolito soporte propuesto. 112
- 36.- Voltamograma cíclico de Nitrofurazona a

0,476 mM en medio alcalino; pH 10. Electrodo de carbono vitreo; velocidad de barrido 0,1 V/s; picos A y B como en la fig. 30 pero desplazados catódicamente; Pico D denota la oxidación del nitro anión radical formado en C. La línea segmentada se obtiene al invertir el barrido despues del pico C.

114

37.- Ondas de reducción polarográficas de Furazolidona y cloranfenicol a la misma concentración de 0,122 mM. Otras condiciones como en la Fig. 6. (A) Furazolidona; $E_{1/2}$ - 0,17; i_d 2,09 μ A. (B) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,41 V; i_d 1,42 μ A.

140

38.-Ondas de reducción polarográficas de nitrofurazona y cloranfenicol a la misma concentración de 0,122 mM. (A) Nitrofurazona; $E_{1/2}$ -0,18 V; i_d 2,10 μ A. (B) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,41 V; i_d 1,42 μ A.

141

39.- Ondas de reducción polarográficas de Furazolidona y Clonazepam a la misma concentración de 0,122 mM. (A) Furazolidona; $E_{1/2}$ -0,17 V; i_d 2,07 μ A. (B) Clonazepam; $E_{1/2}$ - 0,28 V; i_d 1,43 μ A.

141

40.- Polarogramas de pulso diferencial de Nitrofurantoina y cloranfenicol a la misma concentración de 0,037 mM. Electrolito

soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Tiempo de goteo, 1 s; Amplitud de pulso, 50

mV; velocidad de barrido, 5 mV/s. (A)

Nitrofurantoina; E_p -0,18 V; i_p 4,96 μ A. (B)

Coranfencol; E_p -0,42 V; i_p 2,32 μ A.

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un detallado estudio del comportamiento electroquímico de diferentes nitro derivados aromáticos de importancia biológica mediante técnicas tales como polarografía, voltametría cíclica y electrólisis a potencial controlado. En el curso de la investigación se pudo constatar que en un electrolito soporte constituido por cloruro de tetrametilamonio, piridina y ácido fórmico, todos los nitro derivados son reducidos irreversiblemente en una sóla onda que es dependiente del pH y está controlada por difusión. Este comportamiento se observó en el rango ácido de la escala de pH tanto al utilizar un electrodo goteante de mercurio o electrodos estacionarios sólidos.

Compuestos de estructura molecular simple tales como nitrobenzono y algunos de sus derivados sustituidos fueron utilizados como modelos para el posterior estudio de otras moléculas cuyas estructuras moleculares son más complejas y cuya determinación analítica no siempre es fácil de realizar si no se conocen previamente los parámetros que gobiernan el proceso electródico global. Los estudios realizados nos permitieron postular que el comportamiento electroquímico de todos estos compuestos depende

principalmente de la naturaleza y posición de los sustituyentes con respecto al grupo nitro. Es así como la reducción a una amina primaria como producto final con un consumo total de seis electrones, ocurre siempre que los sustituyentes poseen electrones π disponibles para conjugarse con el grupo nitro del anillo aromático, lo cuál determina la transformación del intermediario hidroxilamina en la correspondiente amina vía la formación de otro intermediario imínico altamente reductible. Por el contrario, si no es posible la formación de este intermediario imina, la hidroxilamina no experimenta una posterior reducción y queda como producto final. En primer lugar, sobre la base de los resultados voltamétricos y coulombimétricos obtenidos se sugieren mecanismos de reducción donde se analiza la importancia de las reacciones químicas acopladas a los pasos de transferencia de electrones.

Una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas, se llevaron a cabo una serie de experimentos que permiten aplicar el método propuesto al análisis de diferentes drogas. Uno de los mayores logros fué la determinación de estas drogas en formulaciones farmacéuticas, tejidos vegetales y orina a los bajos niveles a los cuales las drogas inalteradas se encuentran presentes o son excretadas y para lo cual no fué necesario realizar extracciones o separaciones previas. Para la cuantificación

de los analitos se utilizó el método de las adiciones estándares, el cual da resultados tan satisfactorios como el uso de una curva de calibración.

Aun más la apreciable diferencia observada en los potenciales de media onda de diferentes compuestos hizo posible la determinación simultánea de nitro derivados en los rangos de concentración disponibles para su aplicación a formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos.

Abstract

The electrochemical reduction of different aromatic nitro derivatives of biological importance, was studied by polarography, cyclic voltammetry and controlled potential electrolysis. It was observed that, when a solvent-buffer system containing pyridine-formic acid in conjunction with tetramethylammonium chloride as supporting electrolyte, the nitro containing compounds are reduced in a single, well defined irreversible, diffusion-controlled and pH-dependent wave at dropping mercury or solid electrodes.

Nitrobenzene and substituted derivatives were used as models in the electrochemical studies of other molecules in which the molecular structure is more complex, and whose analytical determination are complicated if the parameters that drive the electrode processes are not known.

The electrochemical behaviour of all these compounds depends mainly on the nature and position of the substituents. Reduction to the primary amine occurs when the substituents possess available π electrons to conjugate with the nitro group of the aromatic ring, which determines the transformation of the hydroxylamine into the amine via formation of a highly reducible intermediate imine. In contrast, if the formation of the intermediate imine is made

impossible, the hydroxylamine does not undergo further reduction.

On this basis, and according to the voltammetric and coulombimetric data, reduction mechanisms are suggested, in which the importance of the homogeneous chemical reactions associated with the electron-transfer steps are examined.

When the best experimental conditions were established, several applications of the polarographic method were carried out.

The proposed method permits these drugs to be determined, without any prior separation or extraction, in pharmaceutical formulations, vegetal tissues, and in urine at levels at which the unchanged drugs are excreted. The standard additions techniques provided results as satisfactory as the use of a calibration graph.

The difference in the half wave potential values of different compounds makes simultaneous determinations possible in a concentration range suitable for application to pharmaceutical formulations and body fluids.

Lista de Abreviaturas

NB	Nitrobenceno
ECS	Electrodo de calomelano saturado
h	Altura de la columna de mercurio
i_d	Corriente de difusión
C	Concentración de depolarizador/ mM
n	Número de electrones transferidos
n_a	Número de electrones transferidos en la etapa determinante de la reacción
α	Coefficiente de transferencia
$E_{1/2}$	Potencial de media onda polarográfico
P	Número de protones consumidos en la etapa determinante de la reacción
i_p	Corriente de pico
v	Velocidad de barrido de potencial
E_p	Potencial de pico
pNF	p-Nitrofenol
BR	Tampón Britton-Robinson
CTMA	Cloruro de tetrametilamonio
DON	(±)-1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)-2-aminopropano
D	Coefficiente de difusión
HMDE	Electrodo de gota colgante de mercurio
DME	Electrodo goteante de mercurio

ECE	Reacción química intercalada entre dos reacciones electroquímicas
n_v	Número de electrones calculados voltamétricamente
n_c	Número de electrones calculados coulombimétricamente
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
S	Sensibilidad del método
S_b	Desviación estándar del blanco de reactivos
DMF	N,N-dimetilformamida

1. INTRODUCCION

El amplio arsenal de productos farmacéuticos y agro-industriales de los cuales se dispone para ser utilizados con fines terapéuticos o preventivos, ha despertado un gran interés para desarrollar métodos analíticos que permitan un adecuado control de calidad. Por otra parte, dado que estos compuestos son degradables biológicamente, se ha estimado indispensable desarrollar métodos que permitan su determinación en diferentes fluidos biológicos.

Paralelamente a las técnicas y métodos de análisis, la investigación científica se ha centrado en el estudio de la reactividad de los diferentes derivados metabólicos e intermediarios de estos compuestos. Todo esto ha llevado a disponer de una amplia información acerca del mecanismo de la actividad biológica y toxicológica que presentan estos diferentes tipos de compuestos.

Desde un punto de vista práctico, y específicamente en este campo, los métodos instrumentales más usados para las determinaciones analíticas son: los métodos cromatográficos, espectrofotométricos y electroquímicos los cuales deben ser complementarios más que competitivos.

Desde un punto estrictamente analítico, un método de elección debe cumplir con las siguientes características: aplicabilidad, sensibilidad, selectividad y rapidez. Los métodos electroanalíticos cumplen ampliamente con estos requisitos según se desprende de los trabajos más recientes de Bersier¹⁻³. Es así como, los métodos polarográficos ofrecen apreciables ventajas cuando son aplicados al análisis de formulaciones farmacéuticas: tabletas, pomadas, cremas, inyecciones, etc., debido a que los excipientes presentes en dichos preparados interfieren en menor medida que lo que ocurre con la mayoría de los otros métodos.

De acuerdo a estos antecedentes, en muchos problemas de tipo analítico los métodos voltamétricos debieran tener una amplia aceptación. Desgraciadamente, éstos son muy poco utilizados a nivel industrial. La principal causa es que la voltametría se considera esencialmente académica en el sentido de estar confinada, principalmente, a laboratorios o institutos especializados. Este enfoque, de acuerdo a Whittaker et al.⁴ "es probablemente, debido a la carencia de una sólida educación en técnicas electroanalíticas tales como: polarografía y voltametría, tanto en las universidades como en institutos, lo que trae como resultado la asociación de estas técnicas con complicadas celdas, complejas ecuaciones y experimentos engorrosos".

Al margen de los aspectos prácticos, la electroquímica, además de servir como método de análisis, permite sacar valiosa información de los procesos químicos y de las reacciones químicas de oxido-reducción que experimentan los diferentes analitos. De esta manera, la dilucidación de mecanismos de reacciones electroquímicas puede servir como complemento para el estudio sobre el mecanismo de acción de drogas "in vivo". Además, un análisis electroquímico involucra la determinación de parámetros fisicoquímicos, termodinámicos y cinéticos, los cuales son esenciales para el desarrollo de procesos industriales. Permite, por otra parte, la dilucidación de mecanismos de reacciones electrónicas relacionadas o en conexión con la electrosíntesis orgánica.

Estos antecedentes nos han motivado a investigar y desarrollar métodos voltamétricos directos para el análisis de compuestos orgánicos electroactivos y de importancia biológica. Dentro de la gran variedad de compuestos que presentan grupos funcionales electroactivos, esta tesis se ha centrado, particularmente, en aquellos que contienen el grupo nitro ($-\text{NO}_2$). Estos compuestos tienen una gran proyección en el campo biológico - farmacológico y están siendo utilizados ampliamente como: antibióticos, amebicidas, antiepilépticos, tranquilizantes, antidepresivos, ansiolíticos y en la agro-industria.

La conducta electroquímica de los nitro derivados

aromáticos se basa en la facilidad con que se reduce el grupo nitro en un electrodo a gotas de mercurio o en electrodos estacionarios sólidos. En la literatura⁵⁻¹⁸, se puede apreciar que la polarografía se ha utilizado para determinar drogas nitro derivadas en formas farmacéuticas y fluidos biológicos. Sin embargo, existen una serie de métodos polarográficos⁵⁻¹² donde la selectividad alcanzada es baja, dado que cualquier otro nitro compuesto presente en la muestra interfiere en la determinación. Además, el variado número de ondas de reducción descritas para cada compuesto dependiendo del electrolito soporte, sistema tampónico, pH y supresores de máximos utilizados, ilustran la complejidad del proceso electródico involucrado.

Es así como, independientemente de la facilidad y rapidez con que se pueda llevar a cabo la determinación de un compuesto dado, el desarrollo racional de un método voltamétrico requiere de un análisis detallado de todos los aspectos involucrados en el proceso electródico¹⁹. De esta forma, solo caracterizando el proceso electródico es posible determinar qué parámetros deben ser controlados, y en qué medida, como para optimizar la determinación analítica en cuanto a sensibilidad y selectividad.

Es conocido²⁰⁻²³, que el mecanismo de acción biológico de las drogas nitro derivadas es consecuencia de su habilidad por aceptar electrones, lo cual hace posible que el grupo nitro sea metabolizado "in vivo", a las

correspondientes aminas, vía los intermediarios nitroso, hidroxilamina o imina. En este contexto, la electroquímica permite investigar los mecanismos de reducción y establecer posibles similitudes con los mecanismos de degradación metabólica de estos compuestos, ya que las transferencias de electrones tanto en procesos electroquímicos como biológicos involucran esencialmente reacciones heterogeneas.

El objetivo de esta tesis es llevar a cabo un detallado estudio polarográfico y voltamétrico de diversos nitro derivados aromáticos de importancia biológica, tomando en consideración los siguientes factores para la dilucidación de los procesos electródicos que experimentan grupos de compuestos relacionados estructuralmente:

- Estructura molecular del analito
- Efecto de la capacidad amortiguadora del buffer utilizado
- Efecto del pH en el proceso de reducción
- Grado de reversibilidad del proceso electródico
- Detección de intermediarios y productos de reacción
- Número de electrones y protones involucrados tanto en el proceso global como en la etapa determinante de la reacción.
- Reacciones químicas acopladas al proceso electródico.
- Mecanismo de reducción electroquímico.

Se pretende através de este estudio establecer una relación entre el comportamiento electroquímico de cualquier nitro compuesto aromático y su estructura molecular, tomando en consideración tanto la naturaleza y posición de los

sustituyentes con respecto al grupo nitro, así como también la naturaleza del anillo aromático.

Por otra parte, teniendo un claro conocimiento de los procesos electródicos que experimenten los diferentes nitro derivados, se procederá a establecer las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo determinaciones aisladas y simultáneas de nitro compuestos. Las matrices que se analizarán serán: formulaciones farmacéuticas, tejidos vegetales, y fluidos biológicos.

1.1. Antecedentes Generales de los Nitro Derivados en Estudio

1.1.1. Cloranfenicol.

Cloranfenicol [D-treo-2-cloroacetamido-1-(4-nitrofenil) propanodiol-(1,3)] (fig. 1) es un conocido antibiótico de amplio espectro que presenta usualmente actividad bacteriostática²⁴, pero puede ser bactericida a altas concentraciones o frente a organismos altamente susceptibles.

Cloranfenicol inhibe la síntesis protéica, de microorganismos susceptibles, enlazándose a subunidades 50S ribosomales. El primer efecto es la inhibición de la formación de enlaces peptídicos. El sitio de acción parece ser el mismo que para eritromocina, clindamicina,

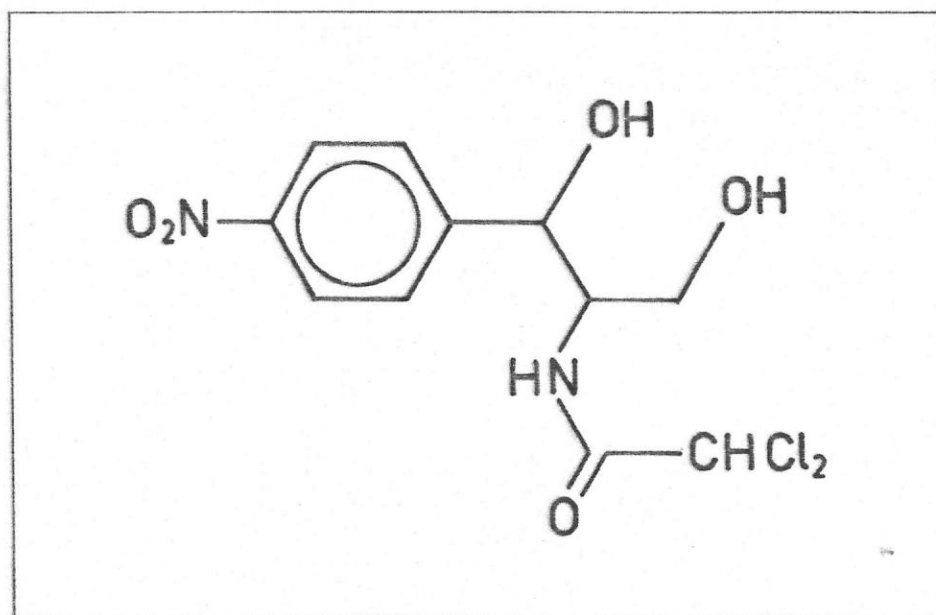


Figura 1 .- Estructura molecular de Cloranfenicol [D-Treo-2-cloroacetamido-1-(4-nitrofenil)-propanodiol-(1,3)].

lincomicina, oleandomicina, y troleandomicina.

Esta droga es activa in vitro contra una gran variedad de bacterias aeróbicas gram-positivas, incluyendo el *Streptococcus pneumoniae* y otros, así como también contra numerosas bacterias gram-negativas, tales como: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* y *Shigella*. Cloranfenicol también es activo, in vitro, contra muchas bacterias anaeróbicas, incluyendo *Bacteroides melaninogenicus*, *B. flagilis*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, y *Veillonella*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, y *Mycoplasma*.

1.1.2. Paratión

Paratión [O,O-dietil-O-(4-nitrofenil) fosforotioatol (fig.2) es un pesticida muy utilizado en la agricultura. En el año 1947 fue lanzado al mercado por la American Cyanamid Company y en 1948 la Bayer Lever-Kusen lo comenzó a producir bajo el nombre comercial de Folidol.

La alta toxicidad presentada por los pesticidas organofosforados, los cuales atacan irreversiblemente a la enzima colinesterasa, determina que estos compuestos tengan incidencia en intoxicaciones y muertes accidentales, por lo cual la mayor parte de las investigaciones realizadas se refieren a su determinación analítica²⁵⁻²⁸.

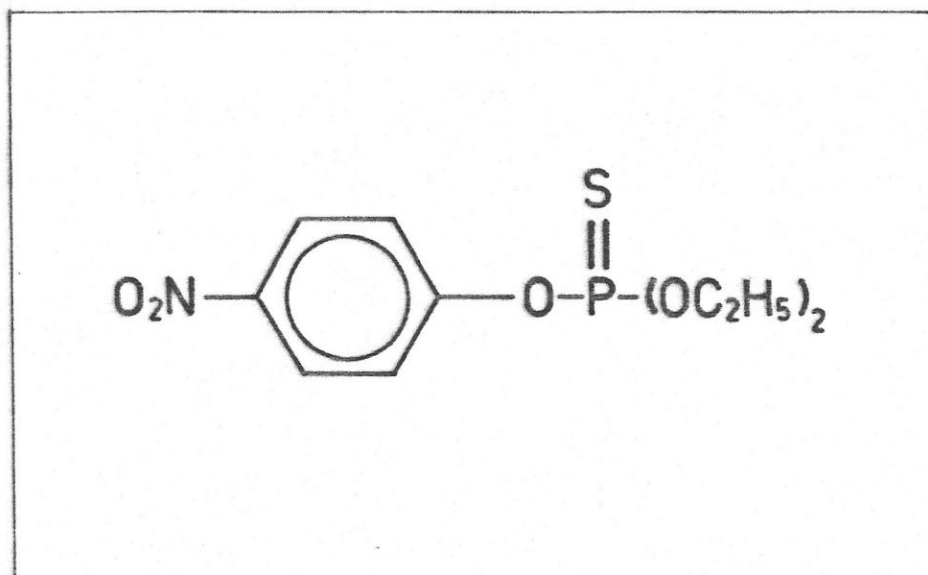


Figura 2.- Estructura molecular de Paratión [O,O-dietyl-O-(4-nitrofenol)-fosforotioato].

1.1.3. (±)-1-(2,5-Dimetoxi-4-nitrofenil)-2-aminopropano

Los derivados del 1-(2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano (fig. 3) han demostrado ser poderosos agentes halucinógenos. Sin embargo la introducción de un sustituyente hidrofóbico tal como Br, CH₃ o C₂H₅ en posición 4 de la molecula original aumenta la potencia halucinógena de estos compuestos²⁹.

Coutts y Malickly,³⁰ analizando el efecto sobre ratas, demostraron que el compuesto que presenta un grupo hidrofílico nitro en posición 4 (DON) (fig. 3) muestra una potencia similar que el derivado metilado (DOM). Recientemente estudios teóricos³¹ y experimentales³² confirmaron que DON es un potente halucinógeno comparable a DOM y el Bromo derivado DOB.

1.1.4. 7-Nitro-1,4-benzodiazepinas

En general, los compuestos derivados de la 1,4-benzodiazepina presentan propiedades anticonvulsivas, efectos ansiolíticos, tranquilizantes y relajantes musculares³³. Estos fármacos son ampliamente utilizados y prescritos con propósitos terapéuticos.

La introducción de un grupo nitro en la molécula original determina notables variaciones en sus efectos terapéuticos. Es así como las 7-nitro-1,4-benzodiazepinas

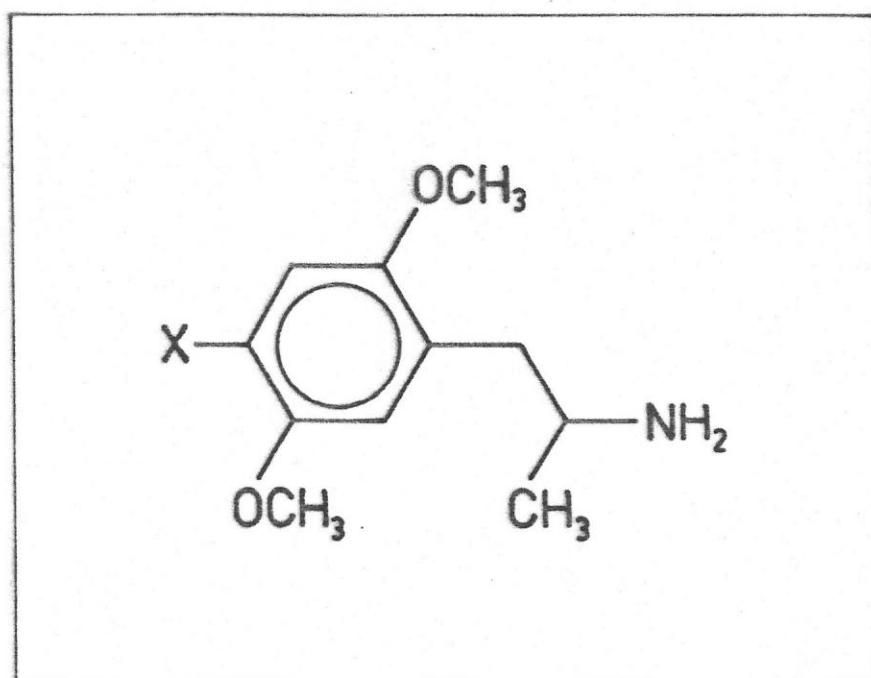


Figura 3.- Estructura molecular de los 4-derivados del 1-(2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano. X=Br, DOB; X=CH₃, DOM; X=C₂H₅, DOET y X=NO₂, DON.

(fig 4) (Nitrazepam, Clonazepam y Flunitrazepam) además de ser potentes anticonvulsivos actúan también como hipnóticos en variadas especies animales.³⁴

Se ha observado que,³⁵ nitrazepam y flunitrazepam presentan propiedades hipnóticas mucho más marcadas que en el caso de otras benzodiazepinas y reemplazan actualmente a otros hipnóticos del tipo barbitúricos. Además, flunitrazepam ha sido utilizado³⁶ como agente inductor de la anestesia.

Clonazepam es clínicamente efectivo en el control de leves ataques epilépticos³⁷ (petit mal) en dosis orales de 1-2 mg diarios.

El abuso de estas drogas sin prescripción médica ha llevado al hecho que algunas de ellas como, el flunitrazepam, sea comercializada ilegalmente y utilizada, mezclada con alcohol, en poblaciones perisféricas de Santiago, donde se conoce con el nombre de "chicota". Se ha demostrado que el consumo incontrolado, junto con alcohol, produce estados físicos y psíquicos incontrolables.

Estudios sobre la biotransformación de nitrazepam y clonazepam en el hombre han demostrado que la metabolización de estas drogas se produce mediante hidrólisis, reducción del grupo nitro a hidroxilamina y amina, la cual finalmente es acetilada a acetamida.^{38,39}

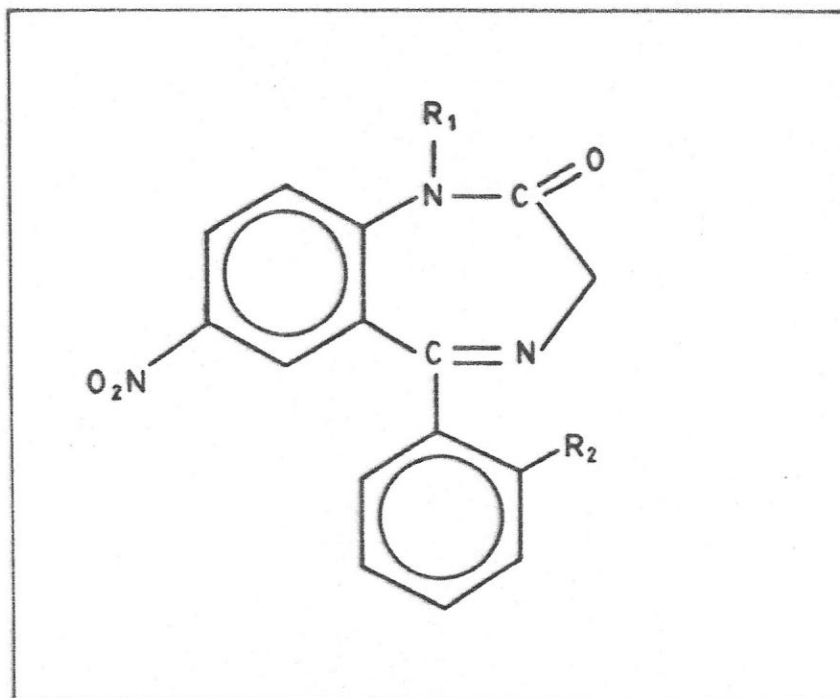


Figura 4.- Estructura molecular de derivados 7-nitro-1,4-benzodiazepinicos. $R_1=H$ y $R_2=H$, Nitrazepam; $R_1=CH_3$ y $R_2=F$, Flunitrazepam; $R_1=H$ y $R_2=Cl$, Clonazepam.

1.1.5. Derivados Nitrofuránicos

Los compuestos derivados del 2-nitrofurano tales como nitrofurantoina, nitrofurazona, furazolidona, y nifuroxima (fig.5) son compuestos sintéticos que presentan actividad bacteriostática y bactericida. La actividad bactericida es debida a la interferencia de estas drogas con variados sistemas enzimáticos incluyendo, posiblemente, la inhibición de la acetilación de la coenzima A. Las características y la actividad biológica de estas drogas estan ampliamente detalladas en la referencia 40.

Nitrofurantoina presenta actividad bacteriostática pero puede actuar como bactericida, dependiendo de la concentración de ella en el sitio de infección y de la susceptibilidad del microorganismo infectante. Nitrofurantoina actua contra diferentes bacterias gram-negativas y algunas gram-positivas incluyendo *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, y *Streptococcus faecalis*. En general, las bacterias más susceptibles son inhibidas in vitro por concentraciones de nitrofurantoina de 1-3 µg/ml.

La vida media de nitrofurantoina en el plasma es del orden de 20 min en adultos con función renal normal. Esta droga es parcialmente metabolizada en el hígado. Una pequeña fracción de la droga es reducida a aminofurantoina.

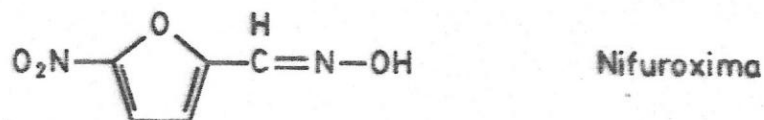
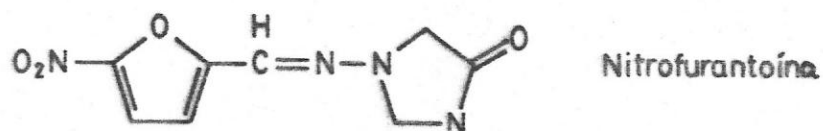
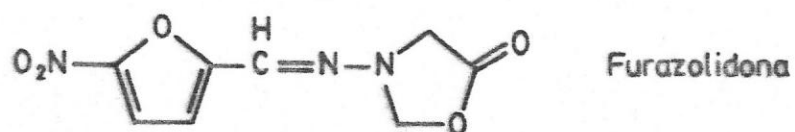
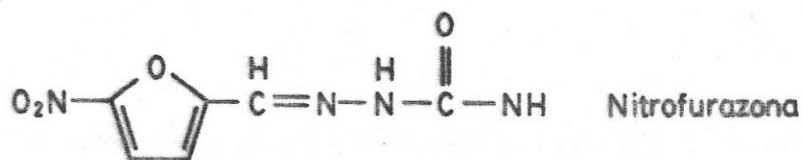


Figura 5.- Estructuras moleculares de derivados 5-Nitrofuránicos: Nitrofurazona, Furazolidona, Nitrofurantoína y Nifuroxima.



Dentro de 24 h, el 30-40% de una dosis oral es excretada intacta en la orina y sólo el 1% es excretada como aminofurantoína.

Nitrofurazona presenta un amplio espectro de actividad antibacterial contra numerosos microorganismos gram-positivos y gram-negativos.

Esta droga es usada tópicamente en el tratamiento de quemaduras de segundo y tercer grado cuando existe resistencia a otros agentes antiinfecciosos. Además es muy utilizada en variadas lesiones y enfermedades a la piel.

En el campo de la medicina veterinaria se suele agregar esta droga a los alimentos en el tratamiento de enfermedades tal como la enteritis necrótica en aves y cerdos.

La administración oral de esta droga, está bastante restringida porque se ha detectado que produce tumores mamarios en ratas hembras⁴⁰. Efectos indeseables no se han detectado, en cambio, en el tratamiento tópico en seres humanos. Además, se ha comprobado⁴¹ que ciertos productos de reducción de la nitrofurazona se enlazan irreversiblemente a proteínas pudiendo causar daño al DNA.

Furazolidona presenta un moderado grado de actividad sobre una variedad de microorganismos gram-positivos y gram-negativos, incluyendo *Vibrio cholerae*, y el protozoo *Giardia Lamblia* y las *Tricomonas*. Furazolidona ha sido usada para el tratamiento específico de diarrea y

enteritis causado por bacterias o protozoos. También se ha informado que es un inhibidor de la monoamino oxidasa (MAO).

En general, el mecanismo de acción biológico de estas drogas permanece desconocido. Sin embargo, es razonable suponer que la actividad biológica de este tipo de drogas, así como de cualquier otro tipo, depende de su estructura molecular y el espectro de actividad selectiva y toxicidad son explicados por el hecho de que los microorganismos poseen sistemas redox con los cuales la droga puede interactuar. Es también evidente que el factor preponderante de la actividad de cualquier droga depende de la naturaleza y posición de los sustituyentes relativo al grupo nitro. Por otra parte, la naturaleza y posición de los sustituyentes dentro de la molécula no es sólo decisivo con respecto a la actividad biológica o farmacológica, sino también en el comportamiento electroquímico de tales compuestos.

De esta forma, la dilucidación de procesos electroquímicos puede ser una útil herramienta para complementar estudios concernientes con el mecanismo de acción biológico de estas drogas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de pureza analítica.

- Depolarizadores

Nitrobenceno; Merck p.a.

Nitrofenoles (o-, m-, p-); Merck p.a.

Nitroanilinas (o-, p-); Merck p.a.

Cloranfenicol; Sigma Chemical Co. USA

Paratión; EPA Research, Triangle Park, NC, USA

(±)-1-(2,5-Dimetoxi-4-nitrofenil)-2-aminopropano;
Sintetizado⁴²

Clonazepam; La Roche, Switzerland

Flunitrazepam; La Roche, Switzerland

Nitrazepam; La Roche, Switzerland

2-Amino-5-nitrobenzofenona; Aldrich Cemical Co. USA

2-Metilamino-5-nitrofluorobenzofenona; Sintetizado⁴³

2-Amino-5-nitroclorobenzofenona; Sintetizado⁴³

Nitrofurantoina; Sigma Chemical Co. USA

Nitrofurazona; Sigma Chemical Co. USA

Furazolidona; Sigma Chemical Co. USA

Nifuroxima; Aldrich Chemical Co. USA

2-Nitrofurano; Aldrich Chemical Co. USA

2-Acido-5-nitrofuroico; Aldrich Chemical Co. USA

5-Nitro-2-furaldehído; Aldrich Chemical Co. USA

Metronidazol; Laboratorio Chile.

Tinidazol; Laboratorio Chile.

Soluciones estándares de los depolarizadores (10^{-2} - 10^{-3} M) fueron preparadas en dimetilformamida, etanol o agua dependiendo de la solubilidad de cada droga.

- Electrolitos soportes y sistemas tampónicos

Tampón Mc Ilvaine (pH 2,0 - 10,0)

Soluciones

HCl 0,2M, KCl 0,2M, HCl 0,1M, $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ 0,1M, NaOH 0,1M,
 KH_2PO_4 0,1M, H_3BO_4 0,1M.

Tampón Acético-Acetato (pH 3,6 - 5,6)

Soluciones

CH_3COOH 0,1M, CH_3COONa 0,1M

Tampón Britton Robinson (pH 2,0 - 12)

Soluciones

H_3BO_4 0,04M, H_3PO_4 0,04M, CH_3COOH 0,04M, NaOH 0,2M

Tampón Piridina-ácido fórmico (pH 2,5 - 6,1)

Soluciones

$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ 12M, HCOOH 99%, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ 0,1M, HCOOH 0,1M, $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ 0,1M

- Supresores de máximos polarográficos

Gelatina, solución acuosa 0,05%

2.2. Instrumentos

Los estudios polarográficos de los diferentes depolarizadores y las determinaciones cuantitativas a niveles sobre $1 \mu\text{g/ml}$ fueron realizadas utilizando un polarógrafo Polariter PO4 (Radiometer, Copenhagen) o alternativamente un Voltammograph CV-27 (Bioanalytical Systems, Lafayette, IN, USA) en modalidad d.c. Un sistema de tres electrodos se utilizó para todas las medidas. El electrodo de trabajo fue un electrodo de goteo de mercurio, como referencia calomelano saturado y un alambre de platino como electrodo auxiliar.

Para determinaciones analíticas a niveles inferiores que $1 \mu\text{g/ml}$ se utilizó un polarógrafo PAR 174A en la modalidad de pulso diferencial.

Los experimentos de voltametría cíclica se llevaron a cabo en un instrumento Voltammograph CV-27 utilizando como electrodos de trabajo, alternativamente, un electrodo de gota colgante de mercurio o uno de carbono vítreo; calomelano saturado como referencia y como electrodo auxiliar un alambre de platino.

Los experimentos de electrólisis a potencial controlado fueron realizados utilizando el mismo voltammograph CV-27 con un depósito de mercurio en el fondo de la celda como electrodo de trabajo.

Para las determinaciones de pH se utilizó un

instrumento Orion Research Ion-Analyzer con electrodos de vidrio y calomelano saturado.

2.3. Procedimiento General

Alicuotas de las soluciones estándares fueron diluidas en 15 ml de electrolito soporte , se agregó 1ml de solución supresora de máximos (si es necesario). Se burbujeó nitrógeno libre de oxígeno durante 5-10 min. y se registraron los polarogramas.

Los experimentos de voltametría y de electrólisis a potencial controlado fueron realizados bajo idénticas condiciones sin agregar supresor de máximos.

2.4. Calibración

Al valor de pH 4,5 establecido para propósitos analíticos se construyeron curvas de calibración para todos los compuestos estudiados. Se midieron alicuotas de las diferentes drogas disueltas, diluyéndolas en un volumen adecuado de electrolito soporte. Se llevaron a cabo adiciones sucesivas del respectivo depolarizador y los valores de corriente de difusión fueron graficados contra la concentración. Las rectas de regresión fueron calculadas de acuerdo al método de los mínimos cuadrados.

2.5. Determinaciones polarográficas en formulaciones farmacéuticas

Tabletas con un contenido nominal y masa total dependientes de cada fármaco, fueron analizadas por el método propuesto la aplicabilidad del método. En general, diez tabletas fueron pulverizadas y, de acuerdo al contenido nominal, se pesaron exactamente muestras que contienen entre 5-20 mg de la droga pura. Las muestras se disolvieron en DMF y fueron transferidas separadamente a matraces aforados de 10 ml. El volumen se completó con DMF. Los contenidos fueron agitados por 15-20 min y finalmente se dejaron sedimentar. Se midieron alicuotas de 0,1-0,5 ml de la solución sobrenadante, las cuales fueron diluídas en 10-25 ml de electrolito soporte y entonces se inscribieron los polarogramas. Las cantidades de droga en la muestra fueron calculadas por referencia a las curvas de calibración y alternativamente por el método de las adiciones estándares. Una metodología similar se siguió para la determinación de drogas contenidas en cápsulas, prescindiendo de la envoltura. Para formulaciones farmacéuticas líquidas como soluciones oftálmicas de nitrofurazona o en el caso de paratién comercial se midió una alicuota adecuada y se diluyó en el electrolito soporte.

Se llevaron a cabo determinaciones independientes de nitrofurantoina en muestras sintéticas que contiene excipientes comunes y 100 mg de droga.

2.6. Determinación Paratión en Vegetales

El método fué aplicado a la determinación de paratión en hojas de maíz previamente fumigadas.

Se pesaron hojas de maíz del orden de 0,6 g con una aproximación de $\pm 0,01$ mg. Las hojas de maíz habían sido sometidas a fumigación 20 días después de haber sido iniciado el cultivo. La fumigación se llevo a cabo de acuerdo al procedimiento recomendado por la Bayer (R) Alemania, a base de una emulsión acuosa de 1,2 ml/l de paratión (Folidol-M 54%).

Las muestras se maceraron en 6 ml de etanol durante 10 min. De la infusión resultante se midieron 2 ml y se siguió el procedimiento polarográfico general.

2.7. Determinación de nitro derivados en orina

Se llevaron a cabo determinaciones de nitrofurantoína, furazolidona, cloranfenicol, metronidazol y tinidazol.

Para llevar a cabo la determinación de nitro derivados en orina se construyeron curvas de calibración entre los límites de concentración a los cuales las drogas inalteradas se excretan. Cantidades crecientes de las diferentes drogas se agregaron a un volumen fijo de orina y alicuotas de estas soluciones fueron diluidas en el

electrolito soporte y polarografiadas. Las curvas de calibración fueron, en todos los casos una línea recta que pasa por el origen. Alternativamente se utilizó el método de las adiciones estándares el cual dió idénticos resultados.

Se realizó un estudio de la excreción de diferentes nitro derivados en orina. Las muestras de orina fueron obtenidas a diferentes intervalos de tiempo de pacientes sometidos a una dosis única de droga.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de la información bibliográfica que se dispone sobre el comportamiento polarográfico y voltamétrico de los nitro derivados y de acuerdo a nuestras propias experiencias se puede concluir que la composición y características de los electrolitos soportes es de primordial importancia. Es decir, existe una gran dependencia del medio sobre la reducción electroquímica de estos compuestos. En medios de baja capacidad amortiguadora tales como los tampones Britton-Robinson, acético-acetato, Mc Ilvaine, phtalatos, etc. se ha observado que⁵⁻¹⁸ la reducción se produce dando origen a dos o más ondas polarográficas. Además debe agregarse el hecho que, en algunos casos,⁵⁻¹² la selectividad de los métodos que utilizan dichos soportes es baja debido a que los rangos de potenciales son demasiado amplios para la reducción de un solo grupo nitro, haciendo imposible la determinación simultanea de dos o más especies.

Por otra parte, nos encontramos frente a un problema de solubilidad de estos compuestos en dichos medios lo que determina a veces la precipitación de ellos, haciendo imposible, desde un punto de vista de reproductibilidad, las determinaciones que se pretende realizar.

Ya en el año 1965, se había observado que⁴⁴ la reducción del ion piridinium en presencia de ácidos carboxílicos deja una amplia ventana de potenciales para el estudio de reacciones de óxido-reducción. De acuerdo a este antecedente, se inició un estudio sistemático de la conducta voltamétrica de nitro derivados, para lo cual ideamos un electrolito soporte a base de una solución de cloruro de tetrametilamonio (CTMA) y utilizando piridina y ácido fórmico como sistema tampónico. Experimentalmente encontramos que en este electrolito soporte la reducción de todos los nitro derivados, sin excepción, da origen a una onda única de reducción muy bien definida. El electrolito soporte originalmente propuesto⁴⁵ está formado por una solución de CTMA 0,1 M, piridina 12,3 M y ácido fórmico 98-100% en la proporción volumétrica de 12:2:1. La alta concentración de piridina y de ácido fórmico no sólo permite obtener un medio fuertemente tamponado, sino que además permite la solubilización de ciertas especies que son escasamente soluble en medios acuosos. En caso contrario, si los analitos no presentan mayores problemas de solubilidad, la concentración de piridina y ácido fórmico se puede bajar hasta una concentración de 0,1 M, manteniendo siempre la relación de estos dos componentes en la proporción 2:1⁴⁶. En ninguno de estos dos casos se observó alteración en el comportamiento voltamétrico de estos compuestos, lo que proporciona, por otra parte, una mayor reproductibilidad de

las determinaciones que se lleven a cabo.

Cabe dejar constancia que, si se varía la relación de piridina-ácido fórmico, el pH puede ser variado en un rango de 2,6-6,1. Para rangos de pH inferiores o superiores, se agregó al sistema HCl o NaOH respectivamente. La reducción de los nitro compuestos estudiados se produce en una onda única en el rango de pH 0 - 9, lo que permite en algunos casos realizar determinaciones simultaneas de compuestos.

Con el objeto de reunir información sobre la conducta electroquímica de los nitro derivados aromáticos, se realizaron una serie de ensayos preliminares con compuestos de estructura sencilla, tratando de establecer comparaciones entre la conducta voltamétrica de estos compuestos en los electrolitos soportes clásicos con respecto al propuesto por nosotros, así como con el fin de establecer una relación entre el comportamiento electroquímico y la estructura molecular de los compuestos.

En una primera etapa, se estudió el comportamiento voltamétrico de nitrobenzeno y de algunos derivados sustituidos con el propósito de examinar la incidencia que los sustituyentes pudieran tener en el comportamiento electroquímico de la molécula original. Estos estudios preliminares fueron de gran valor para ser considerados como modelos en el posterior estudio de otras moléculas, incluidas drogas, cuyas estructuras moleculares son mucho

más complejas y cuya determinación analítica no siempre es fácil de realizar sino se conocen previamente los parámetros que gobiernan el proceso electroódico global.

3.1. Estudio Electroquímico de Nitrobenceno

La molécula estructuralmente más simple dentro de la serie de compuestos aromáticos que contienen grupo nitro es el nitrobenceno.

Polarogramas de NB registrados en un tampón de piridina-ácido fórmico a pH=4,5 exhiben una onda polarográfica bien definida con un potencial de media onda $E_{1/2} = -0,40$ V vs ECS (fig. 6).

El efecto del tiempo de goteo del electrodo sobre la corriente límite se investigó inscribiendo polarogramas de diferentes concentraciones de NB a pH: 2,2 ; 4,5 ; 7,0 y 8,9, variando la altura de la columna de mercurio(h). En todos los casos el valor $i_{lim} \cdot h^{-1/2}$ resulto ser constante, indicando que la corriente límite está controlada por la difusión de la molécula hacia la superficie del electrodo. Un control difusional tambien se refleja en la constancia del valor i_d/C , donde i_d es la corriente de difusión y C corresponde a la concentración del depolarizador. En el rango de concentraciones 10^{-3} - 10^{-5} M se encontró que $i_d/C = 13,58 \pm 0,32$ $\mu A/mM$.

Estos valores confirman que la altura de la onda

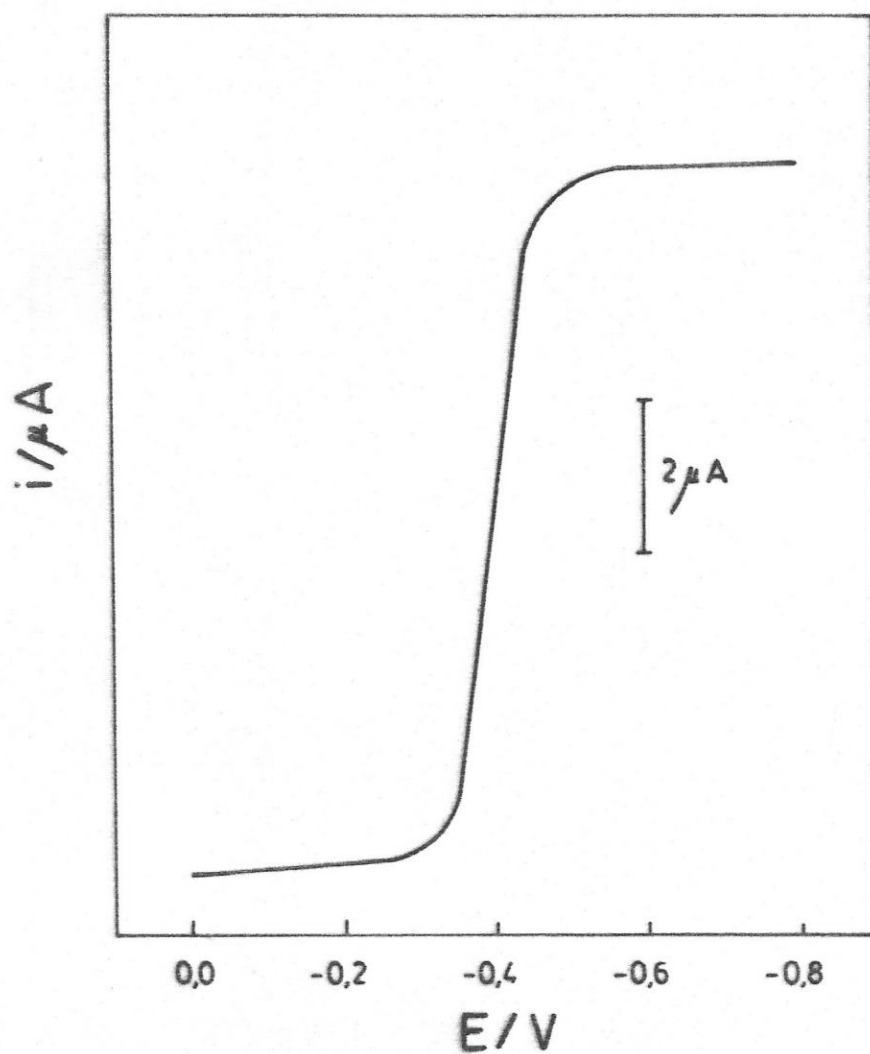


Figura 6.- Onda de reducción polarográfica de Nitrobenzeno 0,631 mM. Electrolito Soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. $E_{1/2}$ -0,40; i_d 8,70 μA .

polarográfica (i_d) está gobernada por la ecuación de Ilković:

$$i_d = 706nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C \quad (1)$$

donde, n es el número total de electrones transferidos en el proceso de reducción, m es la velocidad de flujo de mercurio desde el electrodo en mg/s, D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en cm^2/s , t es el tiempo de goteo de mercurio en segundos, y C es la concentración del depolarizador en mM.

El efecto del pH sobre el comportamiento polarográfico de NB fue investigado polarografiando soluciones 0,124 mM en el electrolito soporte propuesto. En la fig.7 se aprecia que los valores de $E_{1/2}$ se desplazan hacia potenciales catódicos lo cual indica que iones hidrógeno son consumidos en la reacción electródica. La pendiente del gráfico de $E_{1/2}$ vs pH (fig.7) es igual a -45 mV entre 0,0 < pH < 4,8 y es de -58 mV entre 4,8 < pH < 11,1 mientras que tiende prácticamente a cero a pH > 11,1. El primer quiebre en la gráfica puede ser una directa consecuencia del cambio producido en la interfase mercurio-solución producto del potencial aplicado, ya que este valor de potencial corresponde al punto de carga cero en la curva de electrocapilaridad. Este comportamiento fue concordante al observado en la reducción de NB en otros electrolitos soportes con variados sistemas tampónicos⁴⁷.

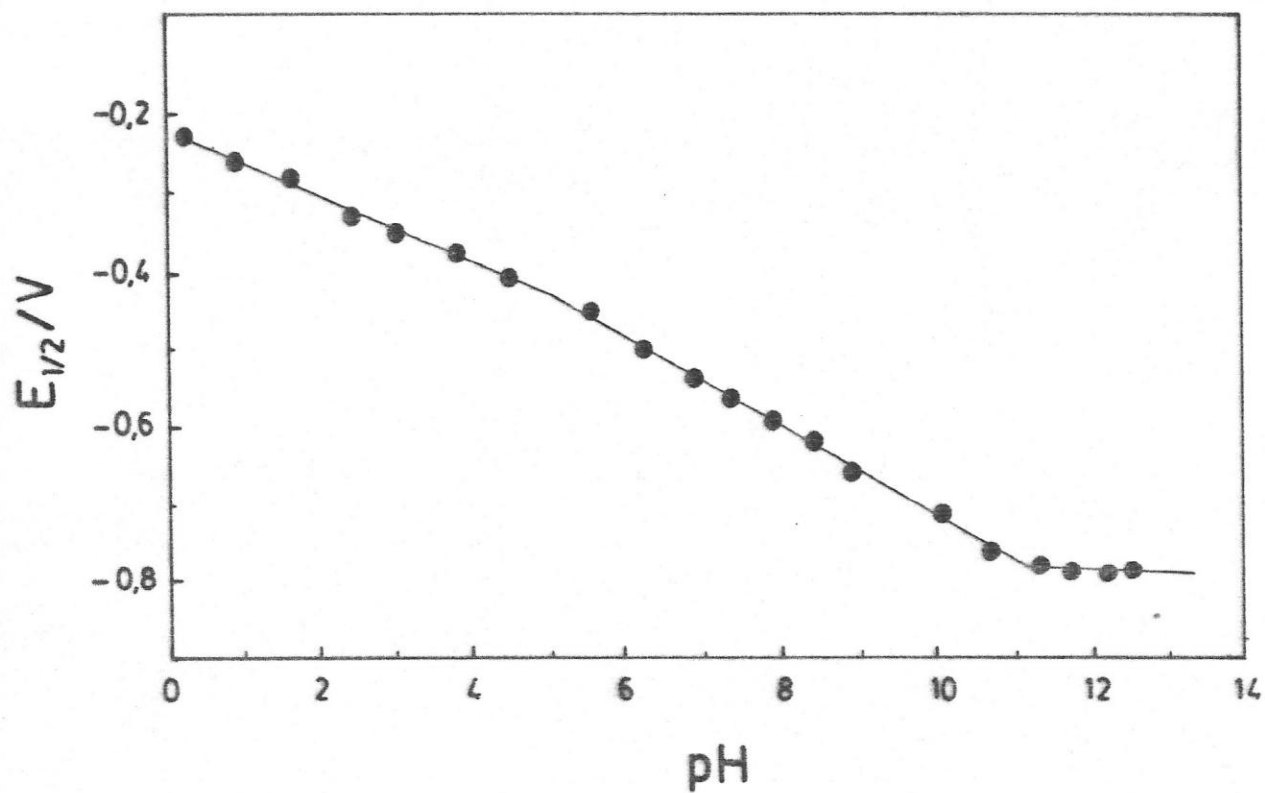
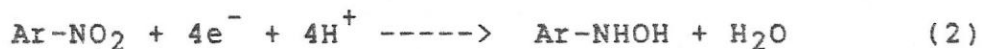


Figura 7.- Efecto del pH sobre los potenciales de media onda para la reducción de Nitrobenzeno a 0,210 mM.

El número de electrones involucrados en el proceso total de reducción fué determinado por electrólisis a potencial controlado. El potencial de la celda fue fijado a $-0,7$ V. Después de 60 min de electrólisis, 1,733 coulomb fueron consumidos en la reducción de $4,32 \cdot 10^{-6}$ moles de NB lo cual da un valor de $n=4,15 \pm 0,14$. Por lo tanto la reducción debe corresponder a la siguiente reacción en la cual el grupo nitro es reducido a fenilhidroxilamina:



El avance de la reacción fué seguido por polarografía e inscribiendo espectros U.V. en función del tiempo. La evolución del espectro U.V. durante el curso de la electrólisis muestra un notable cambio en la banda de absorción a 270 nm. Este cambio está directamente relacionado con la disminución en la altura de la onda polarográfica debida al grupo nitro del NB. La fig. 8 muestra el espectro U.V. de NB antes y después del proceso de electrólisis.

Por otra parte, se examinó la reversibilidad del proceso del electrodo mediante el análisis logarítmico de la onda, utilizando la ecuación de Heyrovsky-Ilković que define la forma de la onda polarográfica reversible:

$$E = E_{1/2} - 0,0592/n \log(i/i_d - i) \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (3)$$

Donde i es la corriente en μA , medida al potencial aplicado

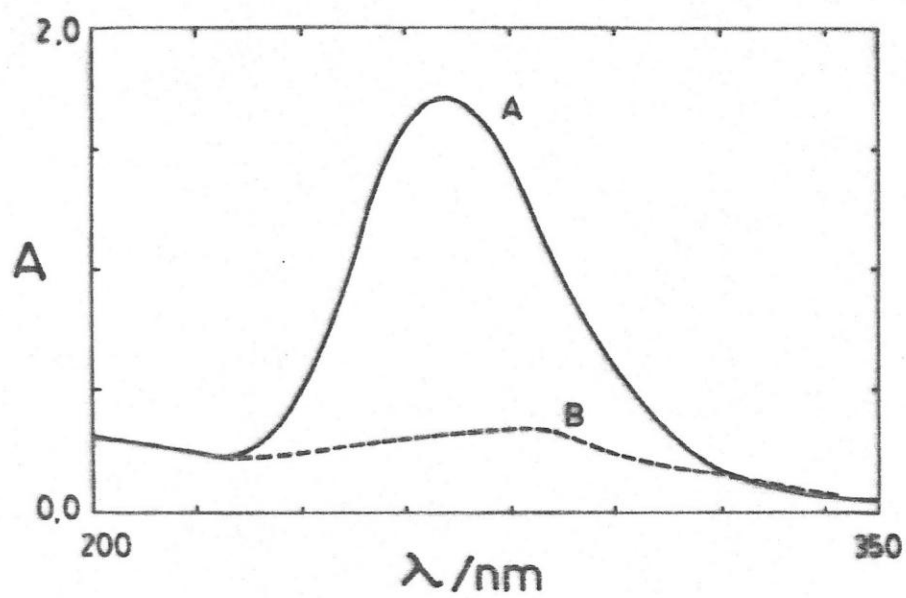


Figura 8.- Espectros U.V. de una solución 0,424 mM de NB, pH 4,5. (A) antes y (B) después de una electrólisis a potencial controlado a -0,7 V vs ECS

E en Volt. Todos los otros términos tienen el significado usual. La pendiente de la gráfica E vs $\log(i/i_d - i)$ obtenida (51 mV) excede apreciablemente el valor $59/n$ mV, y el valor numérico $E_{1/4} - E_{3/4}$ propuesto por Tomes⁴⁸ excede $54,6/n$ mV, lo que indica que el proceso de reducción es irreversible.

La forma de la onda polarográfica para un proceso irreversible está determinada por la siguiente ecuación:

$$E = E_{1/2} - 0,0592/\alpha n_a \log(i/i_d - i) \quad (3')$$

Dado que la reducción es irreversible se procedió a calcular los valores de αn_a , donde α es el coeficiente de transferencia y n_a es el número de electrones consumidos en la etapa determinante de la reacción. En el rango de pH 1-9, αn_a resultó ser de $1,08 \pm 0,07$. Si se supone que dos electrones toman parte en el paso determinante de la velocidad de reacción, α debe tener un valor de $0,54^{12,49}$, lo que confirma una vez más la irreversibilidad del proceso.

Si bien el número de protones consumidos en la reducción total es 4 según se desprende de la ecuación 2, se procedió a calcular el número de protones involucrados en la etapa determinante de la reacción a través de la siguiente ecuación:^{50,51}

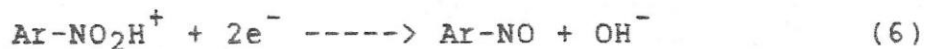
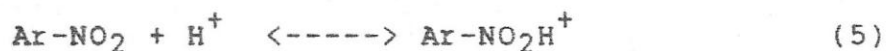
$$dE_{1/2}/dpH = -0,059 P/\alpha n_a \quad (4)$$

de donde el valor de P (número de protones consumidos en la etapa determinante) fué de 0,98 (promedio entre pH 0-11)

indicando que probablemente un ion hidrógeno es consumido en la etapa lenta de la reacción.

De acuerdo a Elving⁴⁹, se puede suponer que la participación de un protón en la etapa determinante, se debe a la preprotonación del grupo nitro para formar un intermediario que es más fácilmente reductible. Esta preprotonación se favorece cuando el centro electroactivo, en una molécula orgánica, contiene átomos electronegativos tales como: N, O, o P. Este efecto daría como resultado la formación de un enlace entre el oxígeno del grupo nitro y el protón, facilitando el proceso de reducción con la subsecuente ruptura del enlace N-OH.

Tomando en cuenta estos antecedentes, la reducción polarográfica de NB ocurriría de acuerdo al siguiente mecanismo:



Una base de sustentación del mecanismo propuesto lo ofrece un estudio de voltametría cíclica. El comportamiento voltamétrico de NB en electrodos sólidos es muy similar al obtenido en un electrodo de mercurio. Un típico voltamograma cíclico a pH=4,5 se muestra en la fig.9 utilizando carbono vitreo como electrodo de trabajo.

El pico A (-0.640 V) es asignado a la reducción del

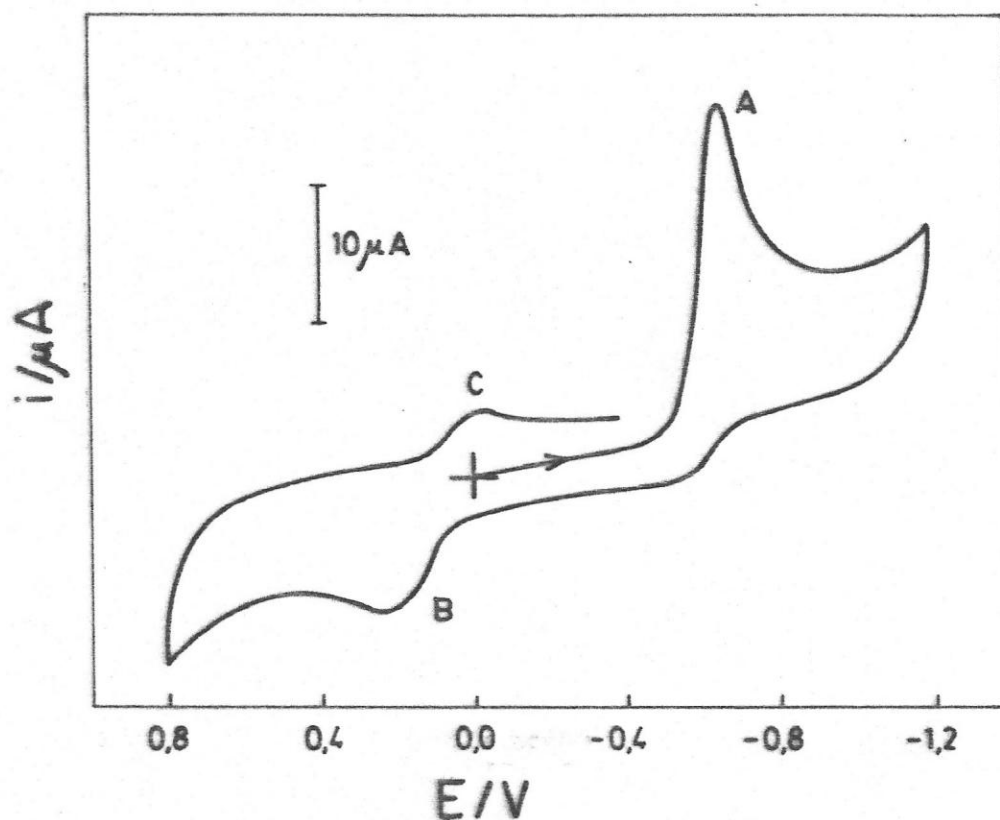


Figura 9.- Voltamograma cíclico de Nitrobenceno a 0,631 mM. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. Electrodo de Carbono vitreo; Velocidad de barrido 0,1 V/s; Pico A corresponde a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina; Picos B y C denotan la cupla redox nitroso-hidroxilamina.

grupo nitro a hidroxilamina en un proceso a $4e^-$, análogo al obtenido polarográficamente. A un potencial de +0,22 V aparece una cupla cuasireversible correspondiente a la oxidación de la fenilhidroxilamina, generada en A, al nitroso derivado en un proceso a $2e^-$, el cual es nuevamente reducido en C a hidroxilamina (ver Ec.7).

Al inscribir un voltamograma cíclico de una solución de NB, posterior a una electrólisis a potencial controlado (-0,7 V), se observa sólo la presencia de la cupla B,C confirmando nuevamente que la reacción de electrólisis es cuantitativa y que el producto de reducción del NB es la fenilhidroxilamina.

En el rango de velocidades de barrido (v) entre 0,02 y 0,6 V/s la función corriente $i_p/Cv^{1/2}$ correspondiente al pico A fue constante (tabla 1) e independiente de la velocidad de barrido, lo que implica que la reacción electródica es una transferencia irreversible de electrones la cual no está condicionada a reacciones químicas lentas acopladas al proceso global.

Como se observa en la figura 10 la corriente límite polarográfica también es función del pH. Existe una constancia entre pH 0-5,5 y luego comienza a decaer. Cerca de pH 11, la corriente límite polarográfica decae bruscamente y la onda se divide en dos; con una razón de alturas de 1:3. Dado que el proceso total de reducción del grupo nitro a hidroxilamina involucra $4e^-$, y que la primera

Tabla 1

Datos voltamétricos para la reducción de NB en CTMA-
piridina-ácido fórmico, pH = 4,5.

Concentración/ mM	Velocidad de Barrido/ V/s	$i_p/\mu A$	$i_p/Cv^{1/2}$
0,0196	0,0200	0,350	126
	0,0500	0,520	118
	0,100	0,780	126
	0,200	1,15	131
	0,300	1,32	123
	0,500	1,59	115
0,0476	0,0200	0,800	119
	0,0500	1,30	125
	0,100	1,80	118
	0,200	2,60	123
	0,300	3,10	120
	0,500	4,10	121
0,196	0,0200	3,40	123
	0,0500	5,60	128
	0,100	7,70	125
	0,200	11,2	128
	0,300	12,9	120
	0,500	16,4	118
0,476	0,0200	8,10	120
	0,0500	12,6	118
	0,100	18,0	120
	0,200	24,5	115
	0,300	31,5	121
	0,500	42,1	125

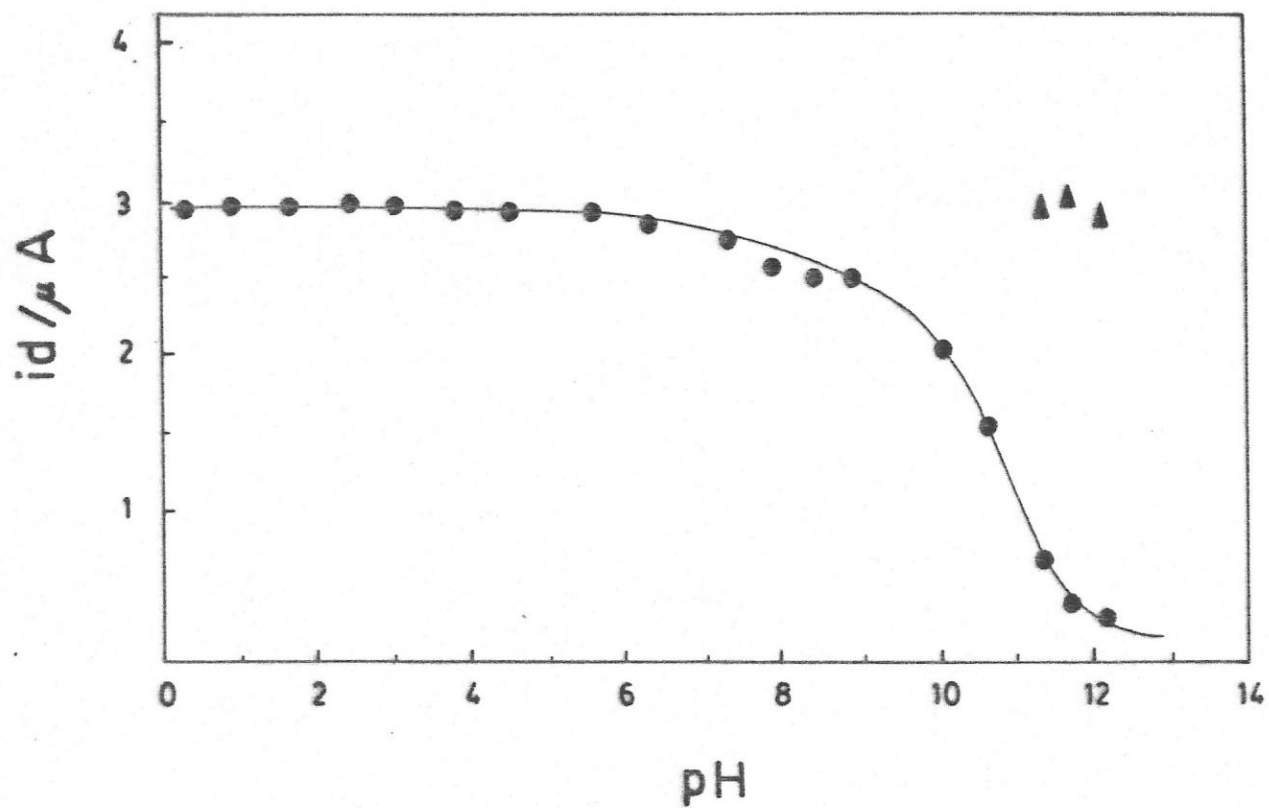


Figura 10.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión para la reducción de Nitrobenzeno a 0,210 mM. $\blacktriangle i_{d1} + i_{d2}$.

onda obtenida en medios básicos corresponde a 1/3 de la onda obtenida en medios ácidos, cabe suponer que se ha producido una reacción intercalada que consume un solo electrón. Este notable cambio va acompañado por una variación en la pendiente del gráfico $E_{1/2}$ vs pH (fig.7) indicando claramente que un proceso diferente ocurre a partir de pH 11. En vista de esto se inscribieron voltamogramas cíclicos en todo el rango de pH. Se observó que en el rango $0.0 < \text{pH} < 10,5$ no se altera la forma de los voltamogramas cíclicos (fig.9), salvo que los potenciales de pico se desplazan catódicamente al incrementar el pH. Este comportamiento, análogo al polarográfico, demostraría que en este rango el mecanismo de reducción es esencialmente el mismo. Sin embargo sobre pH 10,5 también se observa una notable alteración en los voltamogramas cíclicos (fig.11). En esta zona de pH una cupla reversible aparece precediendo al pico principal de reducción. El valor de ΔE_p para esta cupla es de 60 mV valor que indica que el NB es reducido reversiblemente al NB anión radical en un proceso monoelectrónico. Invirtiendo el barrido antes del pico A desaparecen los picos B y C, esto quiere decir que el pico E corresponde a la oxidación reversible del anión radical producido en D (fig.11). El hecho de que la transferencia electrónica NB-NB anión radical no requiere de iones hidrógeno y ocurre sólo a $\text{pH} > 10,5$ explica porqué la pendiente del gráfico polarográfico $E_{1/2}$ vs pH en este rango tiende prácticamente a cero, y

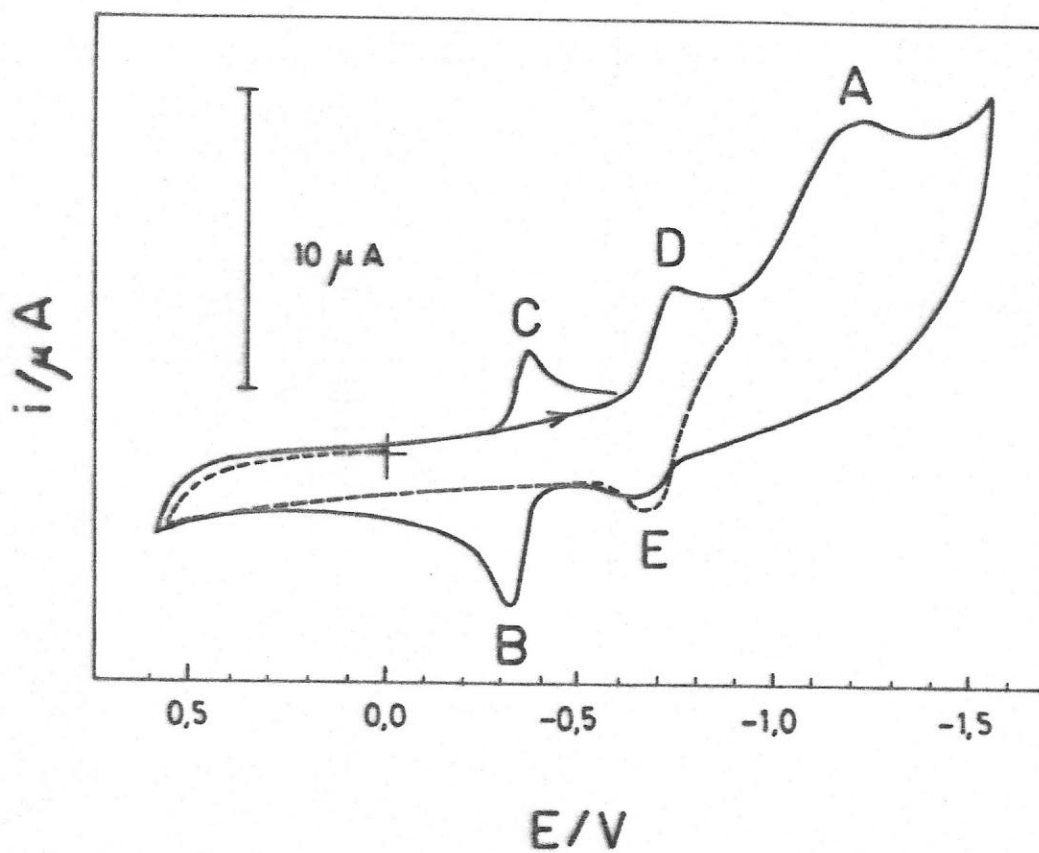


Figura 11.- Voltamograma cíclico de Nitrobenceno a 0,196 mM en medio alcalino; pH 11,8; Electrodo de Carbono vitreo; Velocidad de barrido 0,1 V/s; Picos A, B y C como en la fig. 9 pero desplazados catódicamente; Pico E denota la oxidación del nitro-anión radical formado en D. Línea segmentada se obtiene al invertir el barrido después del pico D.

explica también la división de la onda polarográfica.

Recientemente se ha informado la existencia del relativamente estable NB anión radical en la reducción de NB en NaOH 0,1 M utilizando diferentes electrodos sólidos^{52,53}. La relativa estabilidad de este radical puede explicarse, debido a la capacidad de deslocalización de los electrones en el anillo aromático producto de la baja actividad de protones en el seno de la solución.

A partir de los voltamogramas cíclicos obtenidos, los valores de αn_a fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:⁵⁴

$$(E_p)_2 - (E_p)_1 = (0,059/2\alpha n_a) \log(v_1/v_2) \quad (8)$$

donde $(E_p)_1$ y $(E_p)_2$ son los potenciales de pico para una dada reacción a las velocidades de barrido v_1 y v_2 respectivamente.

Los valores de αn_a para el pico A (pH=4,5) calculados en el rango de velocidades de barrido entre 0,0015-0,009 Vs^{-1} (escala de tiempo comparable a la polarográfica) fueron de $1,3 \pm 0,2$. Este valor es bastante cercano al determinado usando la onda polarográfica ($\alpha n_a=1,08$). Sin embargo a mayores velocidades de barrido los valores de αn_a decrecen sistemáticamente, lo cual confirma una vez más que una transferencia lenta de electrones está involucrada en la reducción total y que por lo tanto el sistema es electroquímicamente irreversible⁵⁵.

El comportamiento ciclo voltamétrico de NB indica claramente que, el nitroso derivado generado como intermediario en la etapa determinante de la reacción es rápidamente reducido a hidroxilamina al mismo potencial al cual es formado. Por esta razón, este intermediario no puede ser detectado mediante polarografía ya que su potencial de reducción es más positivo que el correspondiente al grupo nitro (fig.9).

La reducción de NB también ha sido objeto de variadas investigaciones en otros electrolitos soportes^{47,56-58}. En general, se produce una onda de reducción bien definida correspondiente a la formación de fenilhidroxilamina, análogo a lo ocurrido en el electrolito soporte propuesto. No obstante, sobre pH 5 aparece una onda de reducción muy mal definida correspondiente a la reducción del grupo hidroxilamino. Por otra parte⁵³, otros estudios sugieren que azoxibenceno podría formarse como intermediario en el proceso de reducción de NB.

3.2. Comportamiento Electroquímico de Nitrofenoles y Nitroanilinas

Estas experiencias fueron realizadas para probar el efecto de los sustituyentes en el proceso de reducción, ya que es difícil de esperar que el proceso electródico de un determinado grupo electroactivo, se lleve a cabo mediante un mismo mecanismo en todos los compuestos que lo contienen. No obstante, se conocen algunas excepciones^{59,60} a este principio general. Tal es el caso de todas las semicarbazonas en sus formas protonadas (derivados del acetaldehído, acetona, ciclohexanona, benzaldehído, acetofenona, benzofenona, o piridilaldehídos) las cuales, se reducen en un proceso a $4e^-$ que algunas veces se divide en dos pasos a $2e^-$.^{59,60}

Los compuestos nitro derivados presentan un comportamiento bastante diferente dependiendo de sus estructuras moleculares. En general, se pueden distinguir dos grandes grupos: aquellos en los cuales el grupo nitro está unido a un átomo de carbono saturado y los nitro derivados aromáticos. Existen notables diferencias dentro de cada uno de estos grupos. Por ejemplo, en la mayoría de las nitroparafinas el grupo nitro experimenta una reducción a $4e^-$ dando como producto final la respectiva hidroxilamina. Sin embargo, en nitro derivados terciarios se ha informado la eliminación de ion nitrito⁶¹.

Por otra parte, dentro de los nitro derivados aromáticos también existen diferencias en los mecanismos de reducción. Como se discutió anteriormente la reducción de NB se produce en un proceso a $4e^-$. La introducción de un sustituyente ya sea $-OH$ o $-NH_2$ en diferentes posiciones de la molécula original produce notables alteraciones en el comportamiento electroquímico.

En el electrolito soporte propuesto en este estudio, a base de CTMA, piridina y ácido fórmico, el m-nitrofenol (3-nitrofenol) exhibe un comportamiento polarográfico análogo al observado en NB. En efecto, la reducción del grupo nitro se produce en una sola onda polarográfica a $4e^-$ irreversible y controlada por difusión dando como producto final la m-hidroxifenilhidroxilamina. Soluciones equimolares de NB y m-nitrofenol muestran una razón de alturas de las ondas polarográficas de $1,02 \pm 0,05$ indicando que el proceso electródico es el mismo para ambos compuestos. Por otra parte la similitud observada en los voltamogramas cíclicos de ambos compuestos (en todo el rango de pH) reafirma que estos compuestos son indistinguibles voltamétricamente.

Contrariamente, cuando el grupo funcional $-OH$ está localizado en posición "para" con respecto al grupo nitro, se observan alteraciones en el mecanismo de reducción electroquímica para este compuesto.

En la fig.12 se muestra la onda polarográfica obtenida para el p-nitrofenol (PNF) en CTMA, piridina y

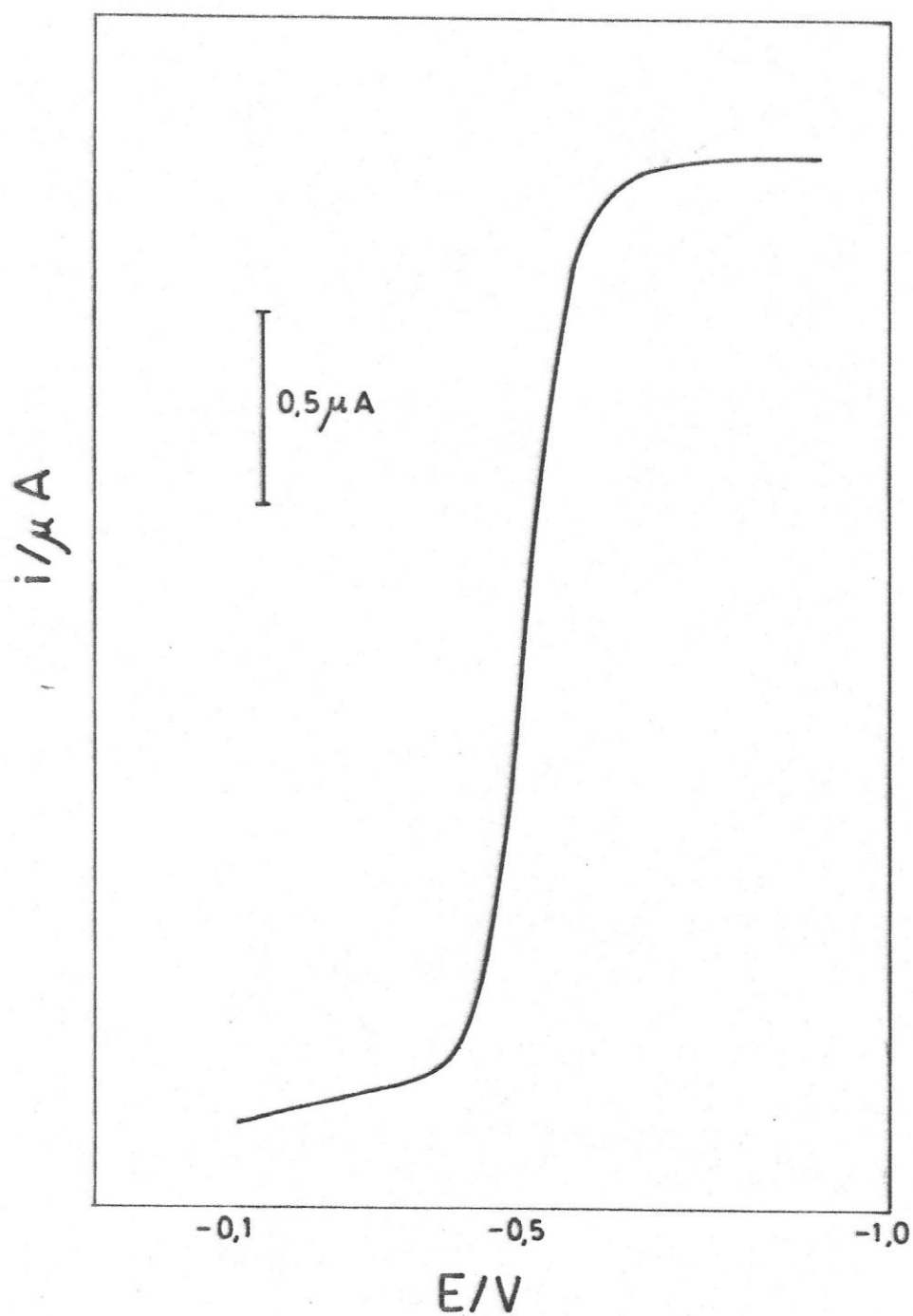


Figura 12.- Onda de reducción polarográfica de p-Nitrofenol a 0,124 mM; condiciones como en fig.6; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 2,40 μA .

ácido fórmico como electrolito soporte (pH 4,5). La reducción polarográfica de este compuesto es controlada por difusión e irreversible como se desprende de las ecuaciones 1 y 3', respectivamente.

En la tabla 2 aparece la relación i_d/C a diferentes concentraciones para los compuestos pNF y NB a pH 4,5. Se puede apreciar claramente que, a iguales concentraciones, esta relación para el caso de pNF es mayor que la correspondiente a NB en un factor aproximadamente de 1,5, indicando que a este valor de pH los productos de reducción son probablemente diferentes. Como NB se reduce polarográficamente en un proceso a 4 electrones produciendo fenilhidroxilamina, en principio se podría afirmar que pNF se reduce en un proceso a 6 electrones donde el producto final obtenido en este caso correspondería a p-hidroxianilina (p-aminofenol).

La influencia del pH en la conducta polarográfica de pNF en sistemas buffers tales como: Britton-Robinson, McIlvaine, citrato o acetato ha sido bien caracterizada^{62,63}. Un esquema del comportamiento polarográfico de pNF con el pH, en estos sistemas, se puede apreciar en la figura 13. La altura de la onda polarográfica corresponde a una reducción a 6 electrones en medios ácidos y básicos. En medios neutros se observa un decaimiento en la corriente de difusión lo que correspondería a un consumo total de sólo 4 electrones. Es decir, en medios neutros el

Tabla 2

Efecto de la concentración de NB y pNF sobre los valores de la corriente de difusión i_d .

Concentración/ 10^{-3} mM	Nitrobenceno		p-Nitrofenol	
	$i_d/\mu\text{A}$	i_d/C	$i_d/\mu\text{A}$	i_d/C
2,44	0,0329	13,5	0,0450	18,4
3,03	0,0409	13,5	0,0581	19,1
4,19	0,0560	13,4	0,0805	19,2
4,76	0,0620	13,0	0,0910	19,1
5,88	0,0800	13,6	0,115	19,6
12,4	0,170	13,7	0,229	18,5
24,4	0,339	13,9	0,472	19,3
30,3	0,420	13,9	0,590	19,5
58,8	0,800	13,6	1,15	19,6
124	1,73	13,9	2,38	19,2
244	3,31	13,6	4,61	18,9
303	4,09	13,5	5,74	18,9
476	6,48	13,6	9,04	19,0
588	7,85	13,3	11,2	19,0

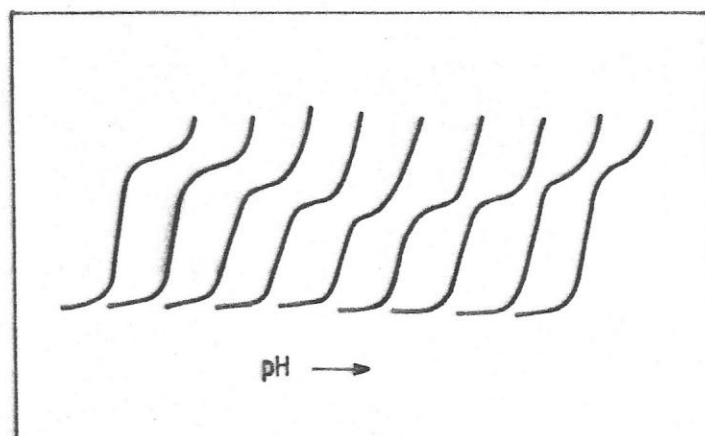
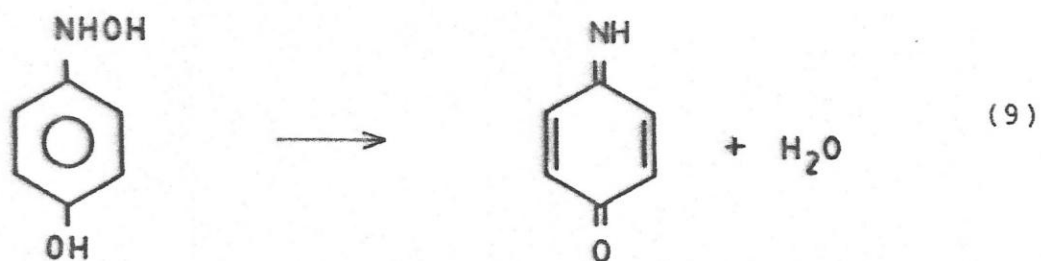


Figura 13.- Dependencia de la onda de reducción polarográfica de p-Nitrofenol con el pH. (Esquemáticamente) en tampones: Britton Robinson, Mc Ilvaine, Citrato y Acetato.

producto de reducción es la p-hidroxifenil-hidroxiilamina, y no p-hidroxianilina como sucede en medios ácidos y alcalinos.

De acuerdo a la hipótesis de Stočesová⁶², el incremento de i_d observado en ambos extremos de la escala de pH se debe a que el intermediario hidroxilamínico puede existir en la forma fácilmente reductible quinonoide de acuerdo a la siguiente reacción:

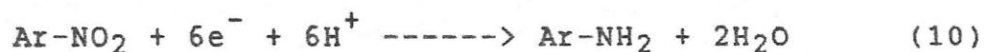


Esta reacción de deshidratación de la hidroxilamina es catalizada en medios ácidos y básicos y el intermediario quinonaimina generado se reduce instantáneamente a amina primaria al mismo potencial al cual es formado. De esta manera el proceso total de reducción se produce en una sola onda polarográfica a 6 electrones.

Un comportamiento similar fué observado en el electrolito soporte CTMA tamponado con piridina y ácido fórmico, salvo que sobre pH 9 se produce una división de la onda polarográfica en dos ondas de diferente tamaño (similar al caso de NB). La primera de ellas corresponde a una transferencia monoelectrónica seguida de una onda principal a 5 electrones. Este comportamiento, se puede atribuir a la

baja actividad de ion hidrógeno en la solución unido a las propiedades tensoactivas que presenta la piridina. Es decir, la formación de una película adsorbida de piridina ($\text{pH} > 9$) sobre el electrodo desplazaría los aniones radicales hacia la solución, evitando que ocurra su protonación en la interface mercurio solución.⁶⁴ Por otra parte, en ausencia de piridina el comportamiento de pNF es completamente análogo al observado en los electrolitos soportes y sistemas tampónicos mencionados anteriormente.

Con el fin de verificar el número total de electrones consumidos en el proceso de reducción de pNF se realizaron experimentos de electrólisis a potencial controlado a $\text{pH} 4,5$. Cuando el potencial fue controlado a $-0,8 \text{ V}$, se observó que después de 40 min de electrólisis; 0,0294 coulomb fueron consumidos en la reducción de $5 \cdot 10^{-8}$ moles de pNF lo cual da un valor de $n=6,09$. De acuerdo a estos resultados el proceso total de reducción debe corresponder a la siguiente reacción:



El cambio en el espectro U.V. durante el curso de la electrólisis confirma que el producto obtenido en la reducción de pNF es el p-aminofenol (fig. 13a)

Al examinar la influencia del pH en los valores de $E_{1/2}$, se obtuvo una gráfica ($E_{1/2}$ vs pH) que presenta tres porciones lineales con pendientes de 65 mV entre $0 < \text{pH} < 5,5$,

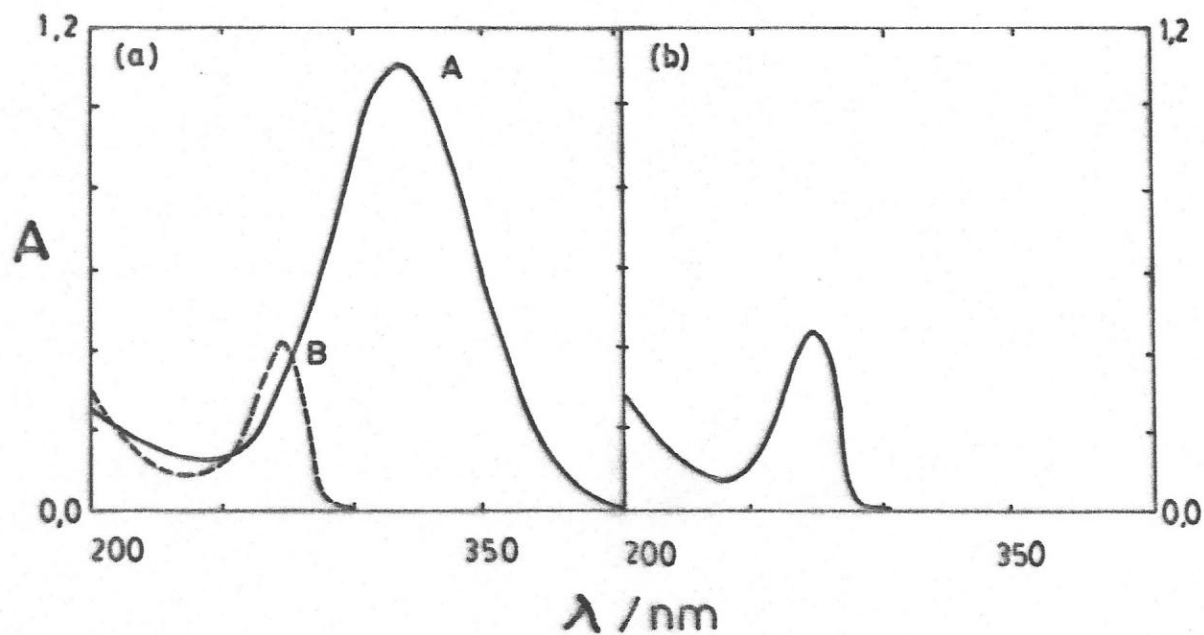


Figura 13a.- Espectros U.V. de una solución de (a) p-nitrofenol 0,424 mM, pH 4,5; (A) antes y (B) después de una electrólisis a potencial controlado -0,7 V vs ECS. (b) Espectro U.V. de una solución de p-aminofenol 0,424 mM, pH 4,5.

107 mV entre 5,5 < pH < 10, y cero para pH > 10.

El primer quiebre en la gráfica (pH 5,5) corresponde al pH al cual la protonación del grupo hidroxilamino es insuficientemente rápida lo que determina que a partir de este valor de pH, p-hidroxifenilhidroxilamina sea el producto mayoritariamente obtenido. Por otra parte, en el gráfico de i_{lim} vs pH (fig.14) se aprecia que a $pH \approx 5,5-6,0$ la onda polarográfica decae a un valor constante correspondiente a aproximadamente $2/3$ del valor obtenido en medio ácido, lo que confirma que el producto final entre pH 6-9 es el derivado hidroxilamina. Tal como se estableció anteriormente, sobre $pH \approx 9$ la onda decae bruscamente para dividirse en dos. Desde pH 10 en adelante estas ondas tienen una relación de alturas de aproximadamente 1:5, lo que sugiere que el producto final obtenido en medios alcalinos también corresponde a la amina primaria.

Dado que la reducción del grupo nitro en pNF resultó ser irreversible, se procedió a calcular los valores de αn_a utilizando la ecuación 3'. El promedio de estos valores fue $0.75 \pm 0,05$ entre $1 < pH < 8$.

Como se explicó anteriormente, si se supone que $n_a=2$, α en este caso debe tener un valor de $0,38^{12,49}$. Por lo tanto en el rango de pH señalado anteriormente la etapa determinante de la velocidad de reacción corresponde a la formación del nitroso derivado en un proceso a $2e^-$, tal como

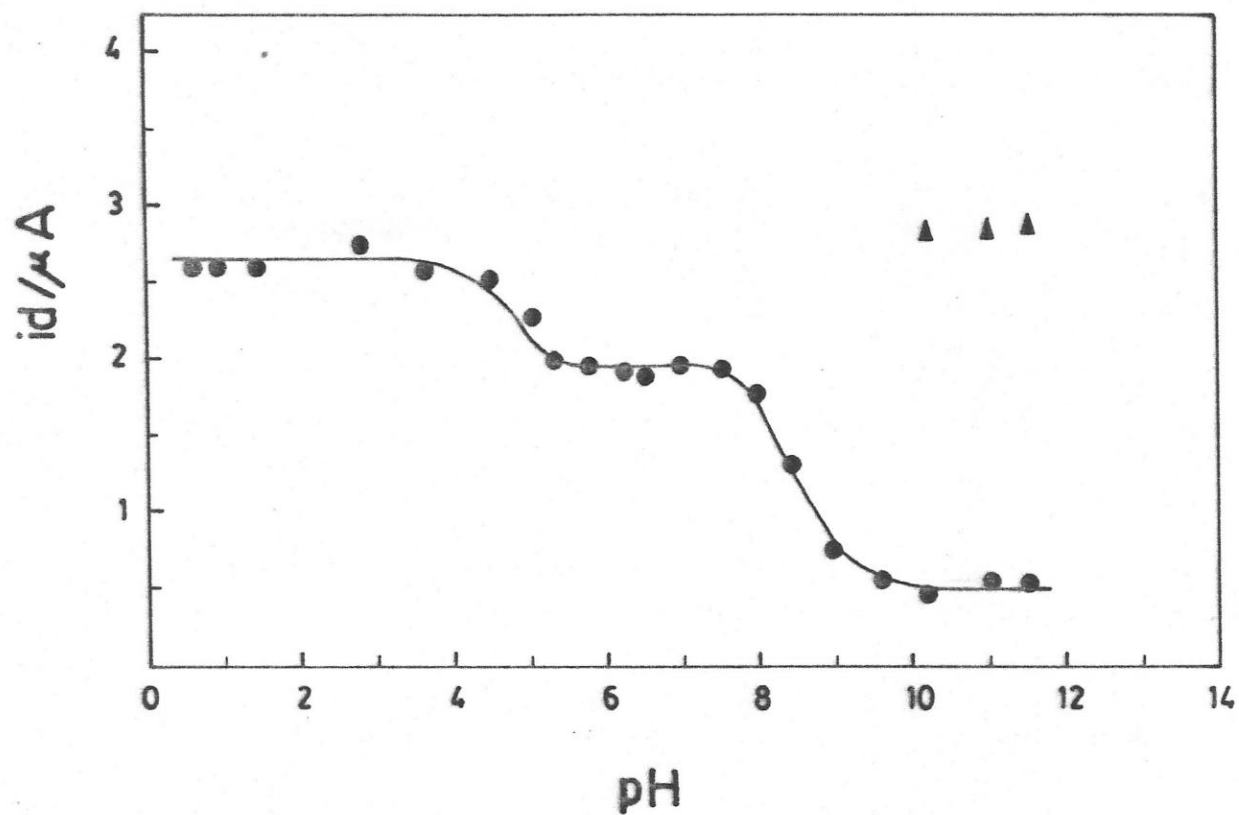


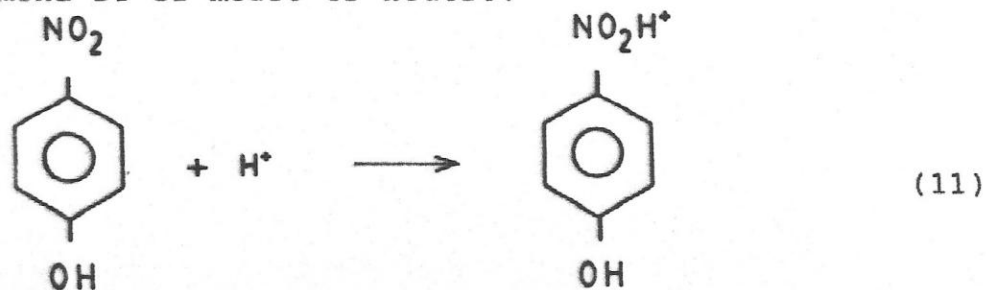
Figura 14.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión en la reducción de p-Nitrofenol a 0,124 mM. $\blacktriangle i_{d1} + i_{d2}$.

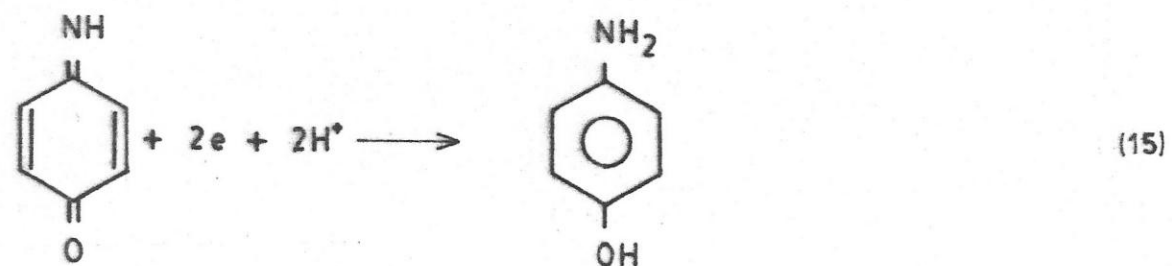
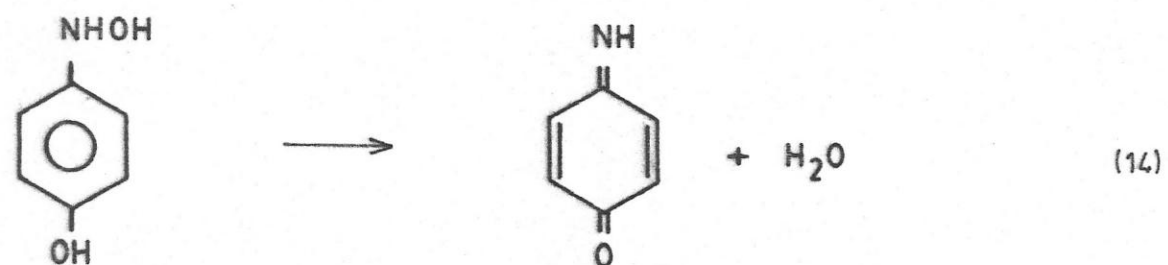
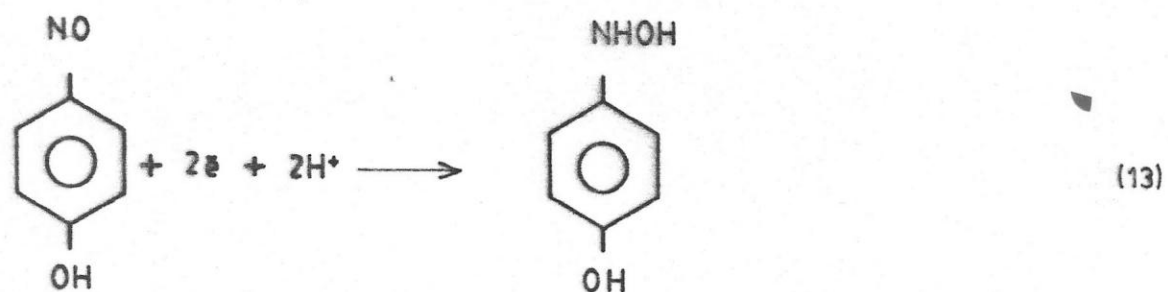
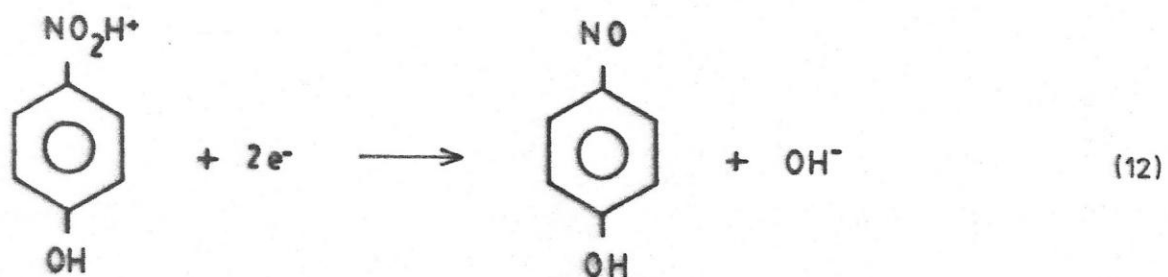
se observó en la reducción de NB. Sin embargo, de acuerdo con Meites⁶⁵, sólo un electrón puede ser transferido por etapa durante el curso de la reacción electrodoica, por lo tanto un valor de $n_a > 1$ indica que las sucesivas etapas de transferencia de electrones están muy próximas entre sí para ser distinguidas en la escala de tiempo implícita en la medida polarográfica.

El grupo nitroso generado como intermediario en la etapa determinante de la reacción, es rápidamente reducido a hidroxilamina, la cual experimenta una deshidratación catalizada tanto en medios ácidos como alcalinos dando origen al intermediario fácilmente reductible quinonaimina la cual, finalmente, se reduce reversiblemente a amina primaria en un proceso a dos electrones.

Tal como se indicó anteriormente, el intermediario nitroso no puede ser detectado directamente mediante polarografía debido a que su potencial de reducción es siempre más positivo que el correspondiente al grupo nitro, por lo tanto en cuanto se genera inmediatamente se reduce.

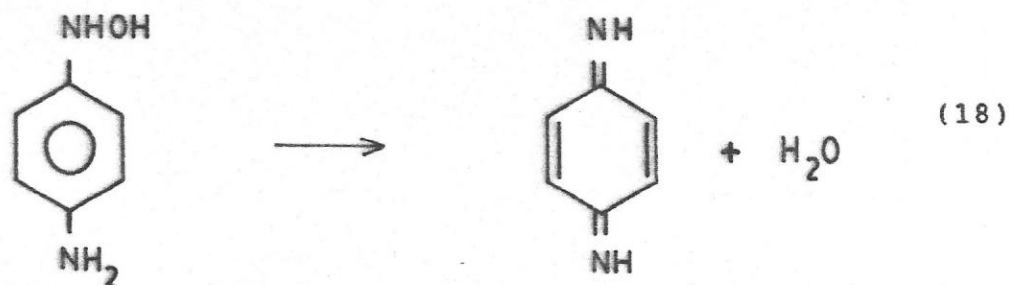
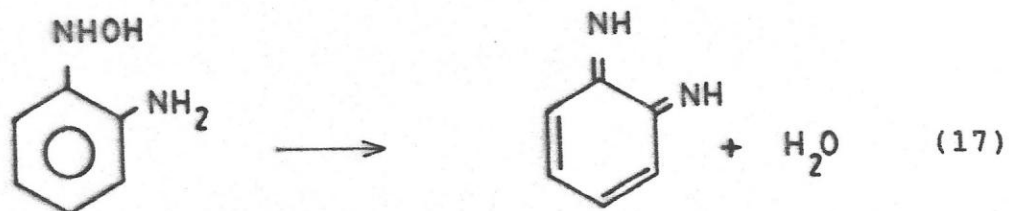
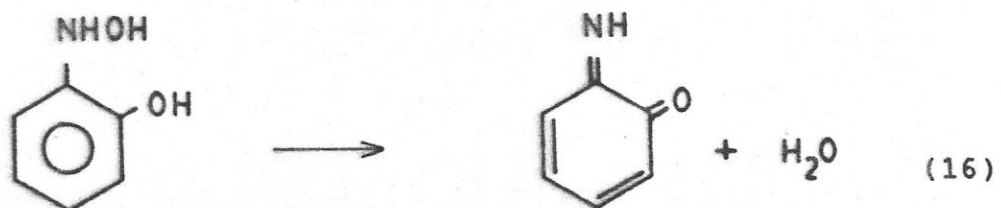
Con estos antecedentes, el siguiente mecanismo de reducción se propone para la reducción polarográfica de pNF obteniéndose amina primaria en medio ácido o básico, e hidroxilamina si el medio es neutro.





De acuerdo a nuestras experiencias podemos concluir que la reducción o-nitrofenol y la reducción de o- y p-nitroanilina siguen el mismo esquema que el propuesto para la reducción de pNF. Todos estos compuestos dan como

producto final las respectivas aminas primarias en un proceso total a 6 electrones. Interpretamos este comportamiento como una consecuencia de una estructura molecular muy similar, ya que todos ellos poseen un sustituyente de fuerte naturaleza π dadora. Estos sustituyentes son capaces de conjugarse con el grupo nitro, generando una interacción π la cual favorece la rápida deshidratación del intermediario hidroxilamina en medios ácidos y alcalinos:



Este mecanismo de reducción, denominado proceso ECE, que implica una reacción química intercalada entre dos procesos de transferencia electrónica,⁶⁶ ha sido observado

para los compuestos o-, p-nitrofenol, o- y p-nitroanilina. Dado que este mecanismo ECE no se produce en la reducción de NB y m-nitrofenol, el producto final que se obtiene en estos dos casos es siempre hidroxilamina, la cual se estabiliza por una inhibición del proceso de deshidratación.

Una evidencia más que apoya la hipótesis antes sustentada es que la reducción de p-nitrosfenol, que es el intermediario generado en la reducción del grupo nitro (ec.12), conduce a la formación de p-hidroxianilina a través de las ecuaciones 13-15^{67,68}.

Con los antecedentes obtenidos a través de los estudios precedentes se procedió a estudiar el comportamiento electroquímico de algunos nitro derivados que tienen importancia biológica y que son prescritos con fines terapéuticos o preventivos.

3.3. Estudio Electroquímico de Nitro Derivados de Importancia Biológica

3.3.1. Estudio Electroquímico de Cloranfenicol.

En el año 1950, Hess⁹ reportó que en un electrolito soporte de biftalato de potasio 0,2M, de pH 4, conjuntamente con una alta concentración de timol como supresor de máximos polarográficos, la droga se reduce polarográficamente en dos ondas, siendo sólo la primera bien definida. Sin embargo, los polarogramas aparecen parcialmente deformados por este surfactante recomendándose, posteriormente por otros investigadores, el uso de gelatina⁷⁰ y azul de metileno⁷¹ con el objeto de mejorar la técnica analítica. Cuando se usa azul de metileno la altura de la onda polarográfica es proporcional a la concentración de cloranfenicol en el rango de 40-500 µg/ml.

Posteriormente, estudios de polarografía, voltametría cíclica, y electrólisis a potencial controlado, utilizando electrodos de mercurio⁵⁵, sugieren que la droga experimenta una reducción lenta ($2e^{-}, 2H^{+}$) al nitroso derivado seguida de una rápida reducción ($2e^{-}, 2H^{+}$) a hidroxilamina. A potenciales más negativos aparece una segunda onda que algunos autores atribuyen a la reducción de la hidroxilamina a la respectiva arilamina en un proceso a dos electrones⁷². Estos últimos estudios fueron realizados

en tampón acético-acetato pH 4,7 como electrolito soporte y en presencia de decilamina al 0,003% como supresor de máximos polarográficos.

En el electrolito soporte de CTMA-piridina-ácido fórmico pH 4,5, cloranfenicol es reducido, irreversiblemente, en una única onda polarográfica controlada por difusión, correspondiente a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina. A pH 4,5 el potencial de media onda es de $E_{1/2} = -0,41$ y la relación i_d/C resultó ser de 13,06 en un rango de concentración de $4,39 \cdot 10^{-6}$ y $2,30 \cdot 10^{-4}$ M. Dado que esta onda es única y bien definida puede ser utilizada para fines analíticos en los rangos de concentraciones antes señalados. Desde el punto de vista de su reducción electroquímica este compuesto se comporta en forma similar al NB y al m-nitrofenol.

3.3.2. Estudio Electroquímico de Paratión

Otro compuesto que también se estudió fué el Paratión [O,O-dietil-O-(4-nitrofenil) fosforotioato].

Smyth y Osteryoung⁷³ encontraron que paratión, en presencia de un tampón Britton-Robinson a pH <4,7, presenta una onda polarográfica de reducción a 6 e⁻ y dos ondas a pH >4,7, atribuibles a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina y subsecuentemente a amina en un proceso a dos electrones.

Dada la alta toxicidad que presenta paratió, existen, en la literatura, una serie de trabajos referentes a su determinación analítica²⁵⁻²⁸.

En el electrolito soporte propuesto por nosotros se observó que paratió es reducido también en una sola onda de reducción a $4e^-$ con un potencial de media onda de $-0,32$ V, siendo la relación $i_d/C = 13,1$.

3.3.3. Estudio Electroquímico de (+)-1-(2,5-Dimetoxi-4-nitrofenil)-2-aminopropano (DON)

Experimentalmente se observó, que DON también presenta una conducta electroquímica análoga a los compuestos anteriores, en los cuales el grupo nitro es reducido al derivado hidroxilamina en un proceso a cuatro electrones.

En el electrolito soporte de CTMA y piridina y ácido fórmico (pH 4,5) DON es reducido irreversiblemente en una única onda polarográfica (pH \sim 1,0 - 10) controlada por difusión, correspondiente a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina. A pH 4,5 el potencial de media onda es de $E_{1/2} = -0,39$ V y la relación i_d/C resultó ser de 11,7.

Debemos insistir una vez más que estos tres compuestos (cloranfenicol, paratió y DON) presentan un comportamiento electroquímico muy similar y comparable a NB y m-nitrofenol, por lo cual los consideraremos en conjunto

para un estudio más detallado. Aun más, dada esta similitud no es posible hacer una determinación simultánea de ellos, pero si es posible establecer comparaciones con compuestos que se reducen a seis electrones.

La figura 15 muestra polarogramas de concentraciones equimolares de cloranfenicol, paratió y DON, donde se observa una relación de alturas de ondas de $1,00 \pm 0,07$. Esto indica claramente que el proceso de reducción es similar en estas tres especies. Cuando se compara las ondas de reducción polarográfica de pNF con la de los tres depolarizadores anteriormente citados, se aprecia que la razón de alturas de ondas equivale a $3/2$, de donde se deduce que el proceso total de reducción de paratió cloranfenicol y DON procede a $4e^-$, análogamente a la reducción de NB.

Utilizando la ecuación de Ilkovic (Ec. 1), y tomando como patrón el coeficiente de reducción de pNF ($5,39 \cdot 10^{-6}$ cm²/s) obtenido en las mismas condiciones experimentales²¹, se procedió a calcular el número de electrones involucrados en el proceso de reducción, dando un valor de n igual a 4,36; 4,24 y 4,01 para cloranfenicol, paratió y DON respectivamente. Asignando a n un valor de 4 en todos los casos, el coeficiente de difusión encontrado para cada uno de los compuestos fué de $6,01 \cdot 10^{-6}$, $6,05 \cdot 10^{-6}$ y $5,05 \cdot 10^{-6}$ cm²/s, respectivamente.

De particular importancia resultó la comparación

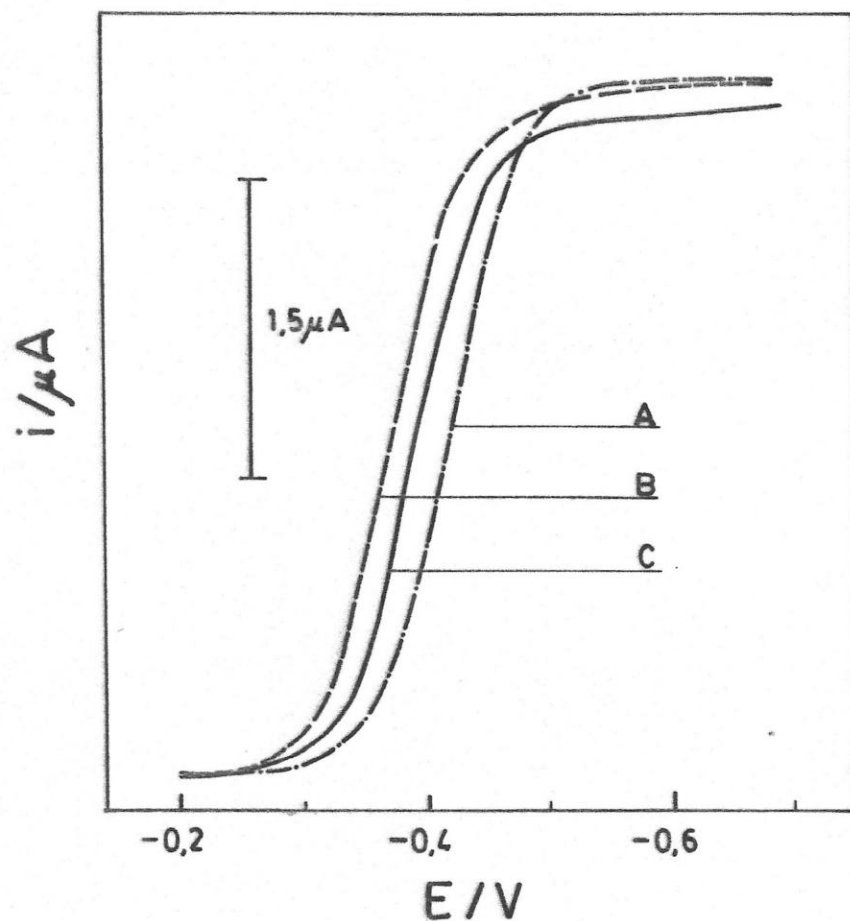
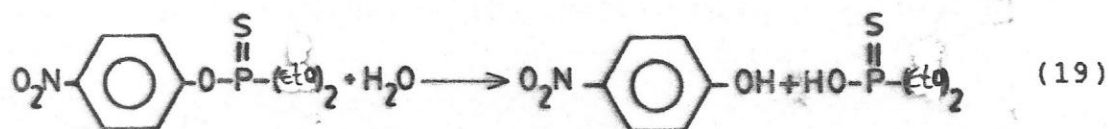


Figura 15.- Ondas de reducci6n polarogr6ficas de Cloranfenicol, Parati6n y DON a la misma concentraci6n de 0,289 mM. Otras condiciones como en Fig. 6.

(A) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,420V; i_d 3,60 μ A. (B) Parati6n; $E_{1/2}$ -0,320 V; i_d 3,50 μ A. (C) DON; $E_{1/2}$ -0,390 V; i_d 3,38 μ A.

entre las ondas polarográficas del paratión y de pNF, por cuanto uno de los productos de hidrólisis metabólica de paratión es el pNF de acuerdo a la siguiente reacción:



La diferencia de potencial de 180 mV entre los $E_{1/2}$ de paratión (-0,320 V) y de pNF (-0,500 V), permite la determinación simultánea de ambas especies sin necesidad de consumo de tiempo en separaciones previas (fig 16). Esta apreciable diferencia en los potenciales de reducción de ambos compuestos indica que la voltametría ha sido^{25-28,73,74} utilizada como un óptimo método analítico en estudios de hidrólisis de paratión, y podría utilizarse en la determinación de pNF en orina como producto metabólico en caso de intoxicación por paratión.

Desde un punto de vista mecanístico cabe destacar, como fué discutido previamente, que el sustituyente -OH localizado en posición "para" relativo al grupo nitro en la molécula de pNF, promueve la reducción a $6e^-$ hasta amina primaria (proceso ECE, Ecs. 11-15). Por otra parte, paratión sólo es reducido en un proceso total a $4e^-$ hasta la hidroxilamina, ya que es imposible la formación del intermediario quinonaimina debido a que el grupo P=S inhibe

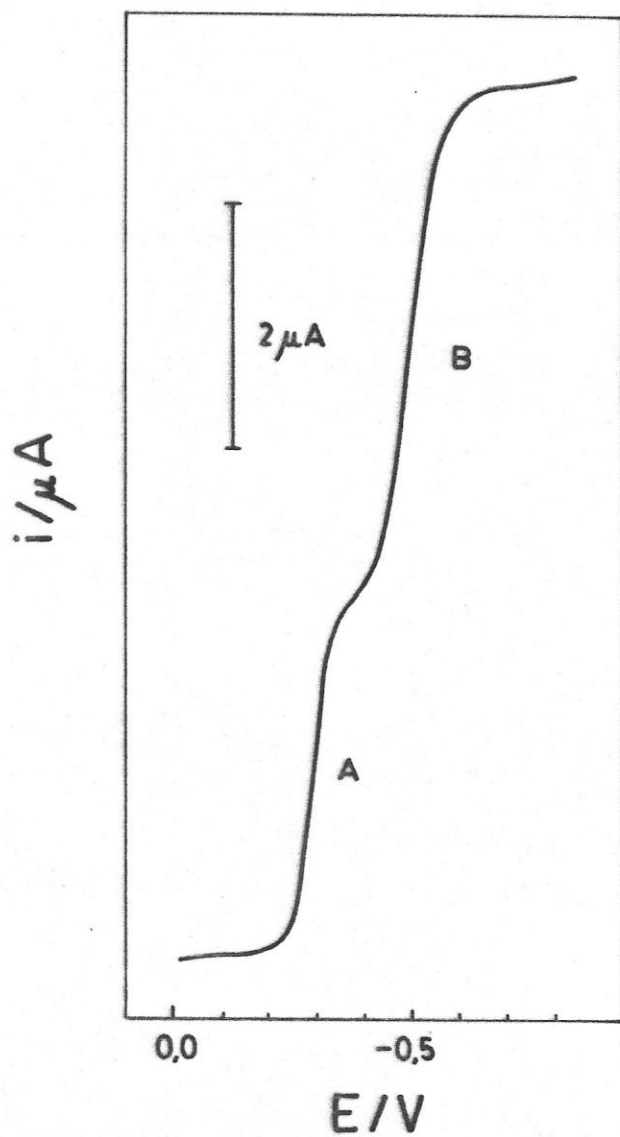


Figura 16.- Ondas de reducción polarográficas de Paratión y de p-Nitrofenol a la misma concentración de 0,226 mM. Otras condiciones como en Fig. 6. (A) Paratión; $E_{1/2}$ -0,320 V; i_d 2,87 μA . (B) p-Nitrofenol; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 4,00 μA .

las propiedades dadoras, del oxígeno adyacente, hacia el grupo hidroxilamina. De igual forma, en la reducción de cloranfenicol y DON, la hidroxilamina se estabiliza como producto final debido a que la estructura molecular de estos compuestos no presenta fuertes dadores π sustituidos en posiciones adecuadas dentro de la molécula, por lo cual la reacción de deshidratación de la hidroxilamina se ve inhibida.

Al igual que en los casos anteriores la reducción del grupo nitro resultó ser irreversible, por lo cual se procedió a calcular los valores de αn_a y P para los tres compuestos (Tabla 3). Estos valores indican que la etapa determinante de la velocidad de reacción corresponde a la formación del derivado nitroso en un proceso a dos electrones análogo a los nitro derivados analizados anteriormente (NB y pNF)

Experimentos de electrólisis a potencial controlado (tabla 4) confirman que en todos los casos se obtiene hidroxilamina como producto final en un proceso a $4 e^-$.

Los voltamogramas cíclicos de estos compuestos, que se muestran en las figuras 17-19, sustentan estas afirmaciones sobre el mecanismo de reducción. Fossdal y Jacobsen⁵⁵ realizaron estudios de voltametría cíclica utilizando un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo. Sin embargo, bajo estas condiciones no se obtiene mayor información de la ofrecida

Tabla 3

Datos polarográficos para la reducción de Cloranfenicol, Parati6n y DON, a una concentraci6n de 0,124 mM. Electrolito soporte, CTMA-piridina-6cido f6rmico.

Compuesto	pH 4,5			pH 0 - 8	
	$E_{1/2}/V$	i_d/C	$10^{-6} D/cm^2/s$	αn_a	P
Cloranfenicol	-0,43	13,1	6,39	0,89	0,82
Parati6n	-0,32	13,1	6,05	0,99	1,1
DON	-0,39	11,7	5,65	0,95	0,85

Tabla 4

Datos Coulombim6tricos para la reducci6n de Cloranfenicol, Parati6n y DON. Electrolito soporte, CTMA-piridina-6cido F6rmico, pH 4,5.

Compuesto	Moles/ 10^{-8}	Coulombs	# de electrones
Cloranfenicol	5,0	0,0199	4,1
Parati6n	5,0	0,0183	3,8
DON	5,0	0,0217	4,5

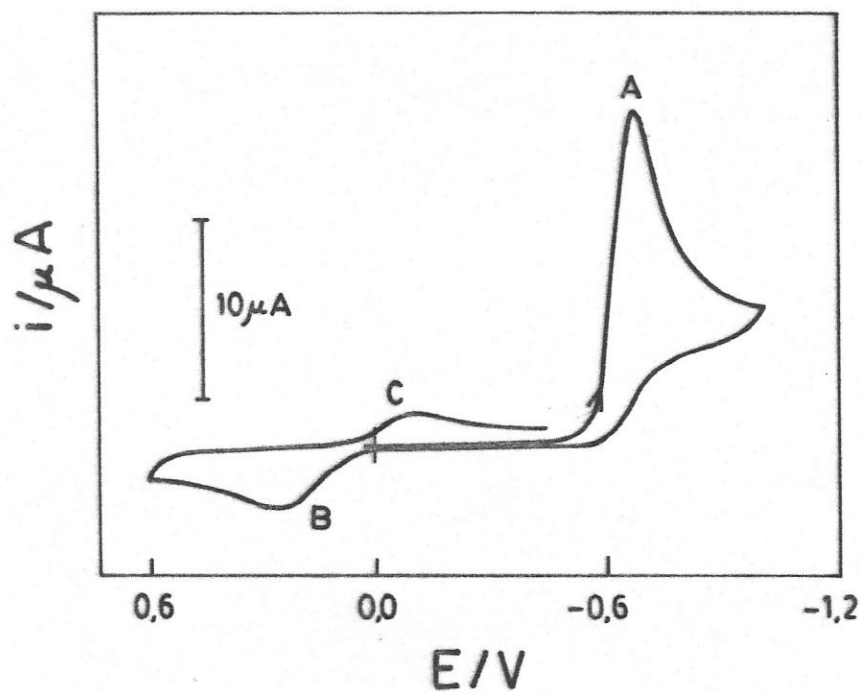


Figura 17.- Voltamograma cíclico de Cloranfenicol a 0,476 mM. Otras condiciones como en Fig. 9.

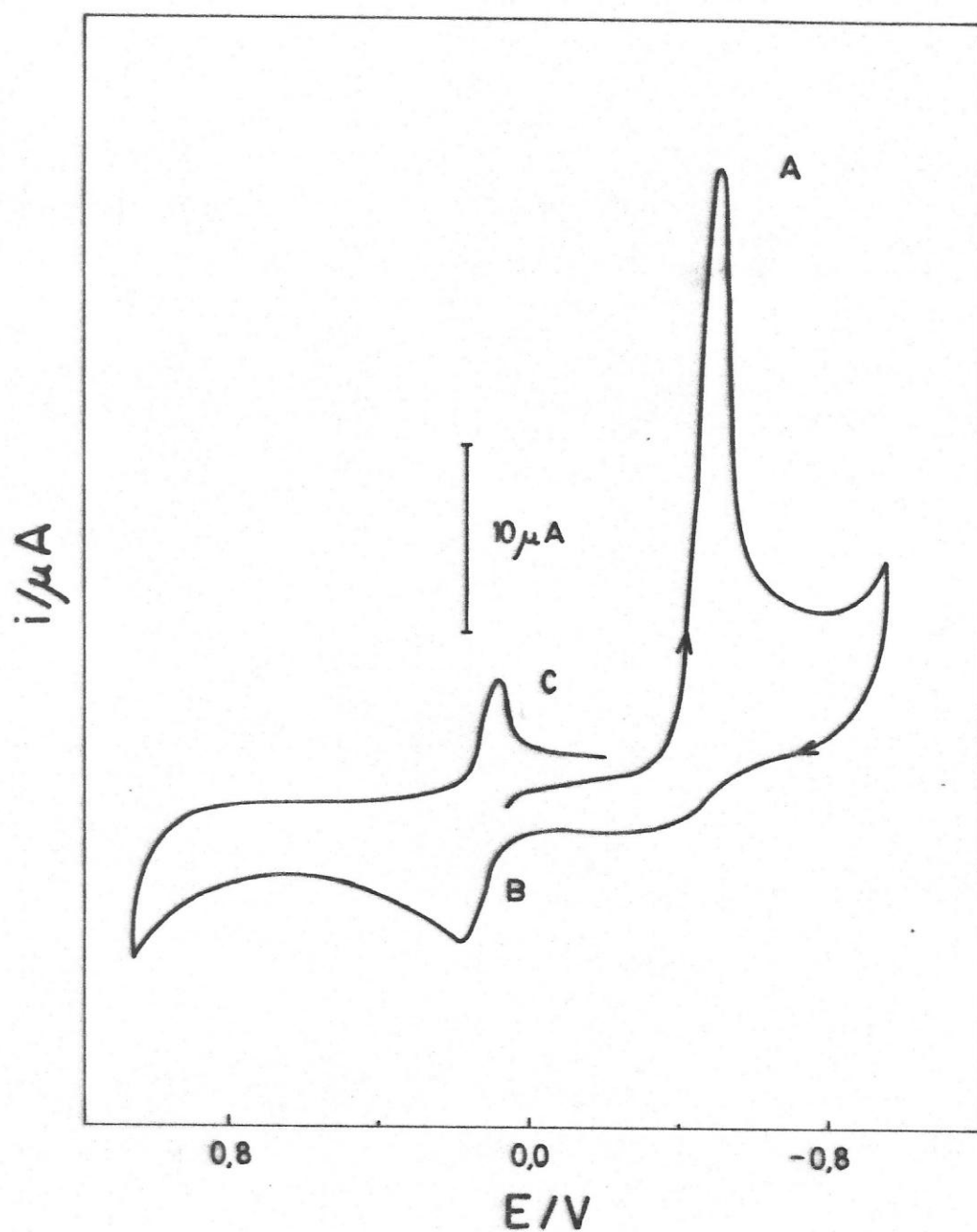


Figura 18.- Voltamograma cíclico de Paratión a 0,124 mM. Otras condiciones como en Fig. 9.

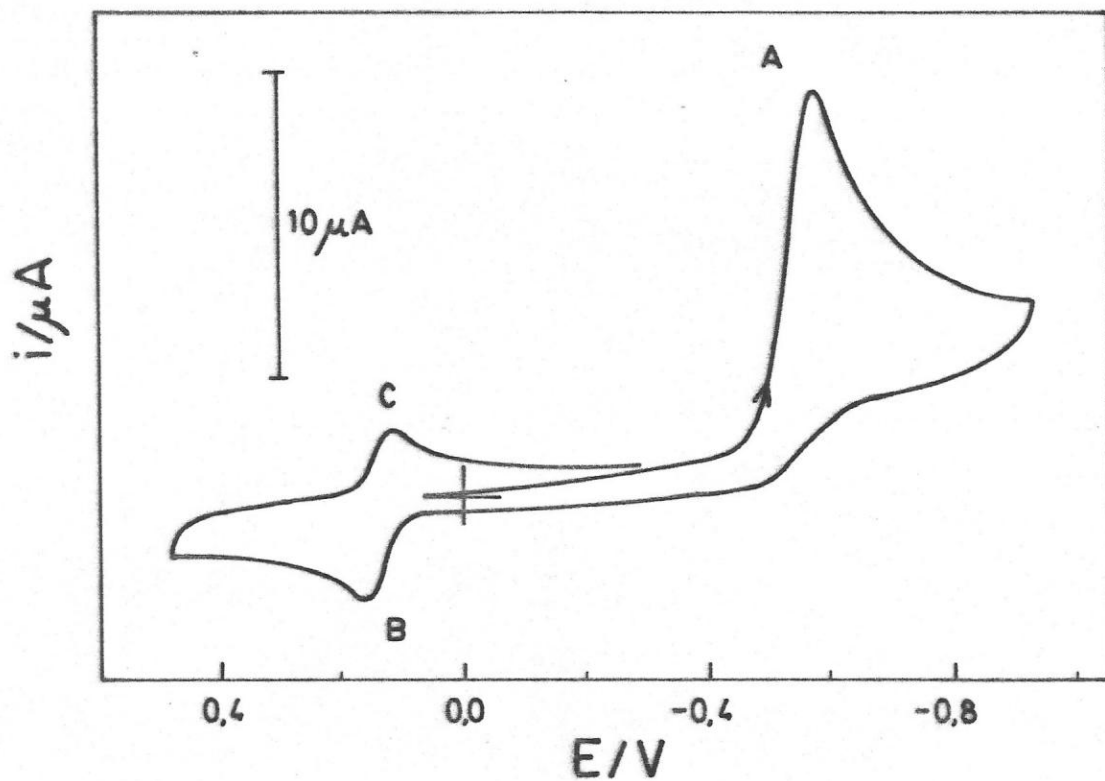


Figura 19.- Voltamograma cíclico de DON a 0,219 mM, pH 3.
Otras condiciones como en Fig. 9.

por polarografía debido a que este electrodo no permite observar lo que ocurre en la zona de potenciales más positivos de la disolución anódica de mercurio.

En cambio, los voltamogramas cíclicos obtenidos utilizando un electrodo de carbono vitrio (figs. 17-19), confirman claramente que la total irreversibilidad observada en la reducción del grupo nitro a hidroxilamina (peak A) se debe a la lenta transferencia de electrones ocurrida en el paso $-\text{NO}_2 \rightarrow -\text{NO}$, por cuanto en el segundo ciclo a potenciales cercanos a 0,0 V aparece la cupla redox $-\text{NO} \rightarrow -\text{NHOH}$ en un proceso bastante más reversible (cupla B,C).

Mayores informaciones sobre la reducción de estos compuestos en el electrolito soporte propuesto pueden obtenerse en las referencias 45, 74 y 75.

A continuación se procedió a estudiar otra serie de compuestos de gran importancia biológica que siendo también nitro derivados, sus esqueletos moleculares difieren substancialmente de los compuestos anteriormente examinados.

3.3.4. Estudio electroquímico de 7-Nitro-1,4-benzodiazepinas y de sus productos de hidrólisis ácida; 2-amino-5-nitrobenzofenonas

La actividad electroquímica intrínseca que presentan las 1,4-benzodiazepinas, producto del doble enlace

4,5-azometino, ha sido objeto de variados estudios polarográficos.⁷⁶⁻⁸⁴ Senkowski et al.⁷⁶ fueron los primeros en estudiar esta clase de compuestos mediante polarografía y demostraron que las 1,4-benzodiazepinas son reducidas en una onda a dos electrones correspondientes al electróforo 4,5 azometino en un electrolito soporte de HCl 0,1M conteniendo 20% de metanol.

Diferentes investigadores han estudiado la conducta polarográfica de los nitro derivados de las benzodiazepinas. En el rango ácido de tampones Britton-Robinson se observan dos ondas polarográficas.^{81,85,86} La primera ha sido atribuida a la reducción del grupo 7-nitro a hidroxilamina y la segunda, a una reducción simultanea de la hidroxilamina y del grupo azometino.

Por otra parte Halvorsen y Jacobsen¹¹ presentan una interpretación que es totalmente diferente a la anterior usando un buffer de fosfato de pH 6,9. Reportaron que la reducción también ocurre en dos ondas, siendo la segunda atribuida sólo a la reducción del grupo 4,5-azometino.

De acuerdo a nuestros estudios, los polarogramas de nitrazepam, clonazepam y flunitrazepam registrados en el electrolito soporte de CTMA-piridina-ácido fórmico pH 4,5 exhiben dos ondas bien definidas y controladas por difusión. La figura 20 muestra un polarograma de nitrazepam como compuesto representativo. La onda más positiva ($E_{1/2} = -0,34$ V) corresponde a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina y

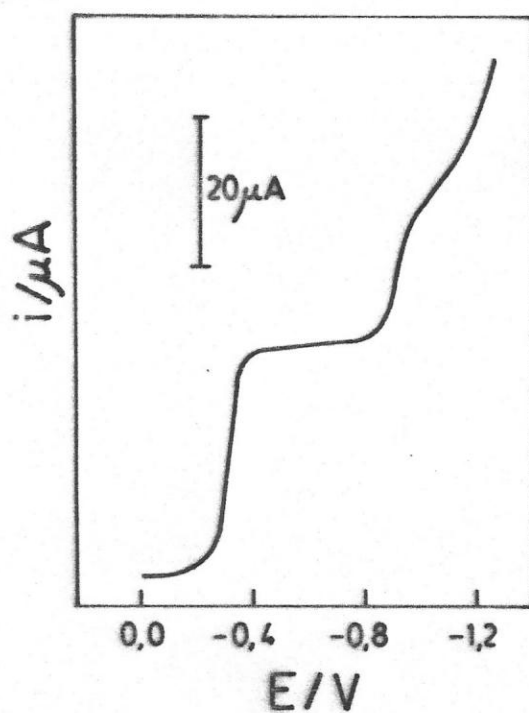


Figura 20.- Ondas de reducción polarográficas de Nitrazepam a 0,184 mM. Otras condiciones como en Fig. 6.

la segunda ($E_{1/2} = -0,98$ V), cuya altura es la mitad de la primera corresponde a la reducción del grupo azometino y se produce en un proceso a $2e^-$ y $2H^+$ de acuerdo a la siguiente reacción:



Siendo la primera onda igual al doble de la segunda se supone que el grupo nitro, en este caso, se reduce en un proceso a $4e^-$. Se podría pensar que la segunda onda pudiera corresponder a la reducción de la hidroxilamina hasta amina primaria de acuerdo a la siguiente reacción:



Pero si se realiza una electrólisis a potencial controlado a un potencial entre ambas ondas polarográficas ($-0,5V$), al comenzar el compuesto inicial a transformarse en hidroxilamina la segunda onda debiera incrementarse. Dado que esto no sucede se puede concluir que la segunda onda no corresponde a la reducción señalada en la ecuación 21 sino que, a la reducción de otro grupo electroactivo, en este caso, el grupo azometino.

El número de electrones totales calculados por electrólisis a potencial controlado a un potencial de $-0,5V$ resulto ser igual a 4. En cambio cuando la electrólisis se

realizó a un potencial de $-1,1V$, en que los dos grupos son reducidos, se encontró un valor de n correspondiente a $6e^-$ para cada uno de los tres compuestos. Por otra parte los valores de i_d/C para la primera onda resultaron ser de 13,06; 12,5; y 12,74 para nitrazepam, flunitrazepam y clonazepam respectivamente, los cuales son muy cercanos al valor observado para la reducción de NB (13,58) a fenilhidroxilamina.

Ambas ondas de reducción resultaron ser irreversibles. Para la primera, en todos los casos, el valor de la pendiente calculada mediante la ec 3' fué de 60 mV y para la segunda 58 mV.

Los valores de αn_a y P calculados (ecs. 3' y 4) entre pH 1-7, para la primera onda de nitrazepam, fueron de 0,86 y 0,94 respectivamente. Al igual que en los compuestos anteriores, estos valores indicarían que la etapa determinante de la reacción corresponde a la formación del nitroso derivado en un proceso a $2e^-$.

Con el objeto de confirmar los mecanismos de reducción anteriormente propuestos, se procedió a estudiar la reducción de 7-nitrobenzodiazepinas por voltametría cíclica. La fig 21 muestra un voltamograma cíclico de nitrazepam a pH 4,5 el cual es completamente análogo a los obtenidos para clonazepam y flunitrazepam. En el pico A se produce la respectiva arilhidroxilamina en un proceso a $4e^-$, la cual es oxidada en C formando un nitroso compuesto, el

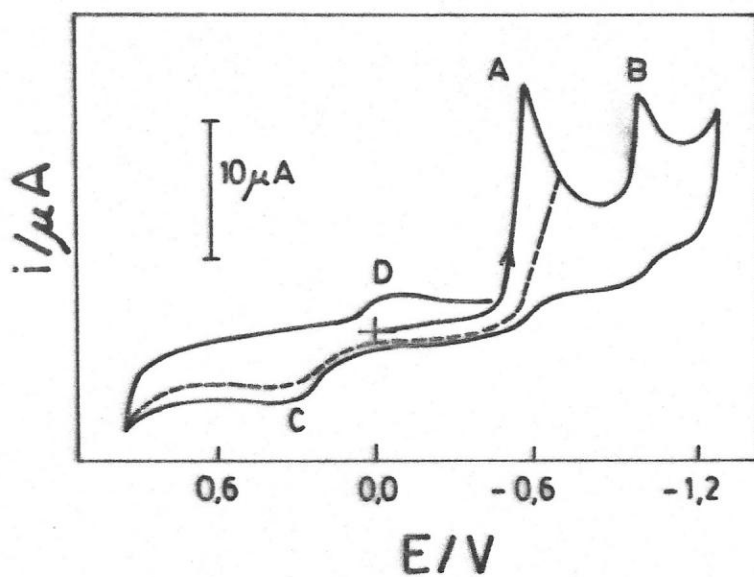
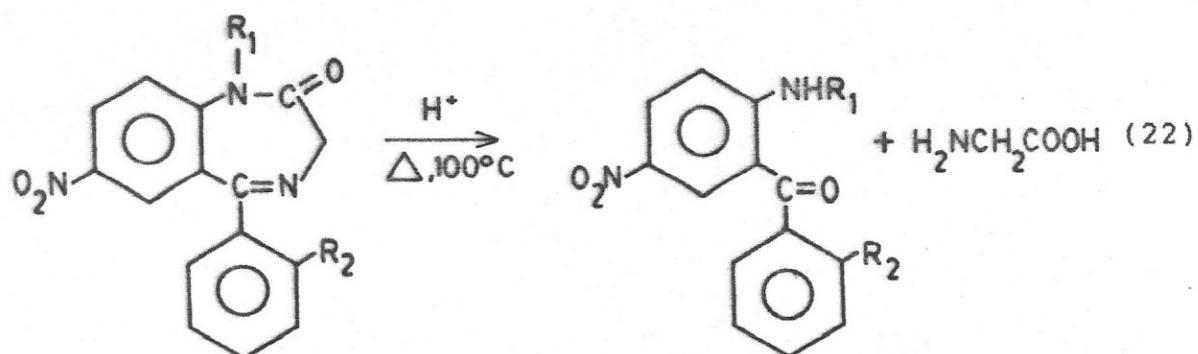


Figura 21.- Voltamograma cíclico de Nitrazepam a 0,196 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. Pico B denota la reducción del grupo 4,5 azometino. Línea segmentada se obtiene cuando el barrido se invierte antes del pico B.

que en un segundo ciclo es reducido en el pico D. Al invertir el barrido de potenciales antes del pico B no ocurre ninguna alteración en los otros picos (comparar líneas continuas y segmentadas en fig 21). Esto sugiere que el pico B corresponde sólo a la reducción de la funcionalidad azometino en un proceso a $2e^-$ y $2H^+$.

Los nitro derivados de las benzodiazepinas presentan un esqueleto molecular común (fig 4), por lo cual muestran un comportamiento electroquímico muy similar, y llegan a ser indistinguibles debido a la proximidad de sus potenciales de media onda.

Con el fin de confirmar la relación existente entre estructura electromolecular y conducta electroquímica, se procedió a hidrolizar cuantitativamente, en medio ácido, estas drogas a las correspondientes benzofenonas, siguiendo el método propuesto por Sternbach et al.⁴³ El proceso de hidrólisis ocurre de acuerdo a la siguiente reacción:



Mientras el proceso de reducción del grupo nitro en las drogas intactas ha sido suficientemente establecido,

ninguna información disponible existe concerniente a la reducción del grupo nitro en sus productos de hidrólisis. De acuerdo a nuestros postulados la reducción del grupo nitro en los productos de hidrólisis deberá proceder de acuerdo a otros mecanismos dada la presencia del grupo amino en posición "para".

Los estudios polarográficos de los productos de hidrólisis muestran una primera onda correspondiente a la reducción del grupo nitro a amina primaria en un proceso a $6e^-$, y una segunda onda correspondiente a la reducción del grupo carbonilo al respectivo alcohol. En la fig 22 se muestra un polarograma a pH 4,5 de la 2-amino-5-nitrobenzofenona como compuesto representativo.

Cuando soluciones equimolares de nitrazepam y de su producto de hidrólisis son polarografiadas las alturas de las ondas principales están en una relación de 2:3 respectivamente, indicando que el proceso de reducción es esencialmente diferente en ambos tipos de compuestos (comparar figs 20 y 22). Además los potenciales de media onda de estas dos clases de compuestos difieren suficientemente como para que la voltametría sea utilizada como método analítico que permita diferenciar y determinar ambos tipos de compuestos.

Los datos experimentales obtenidos son los únicos que permiten interpretar la diferencia en los mecanismos de reducción de ambos tipos de compuestos, ya que una simple

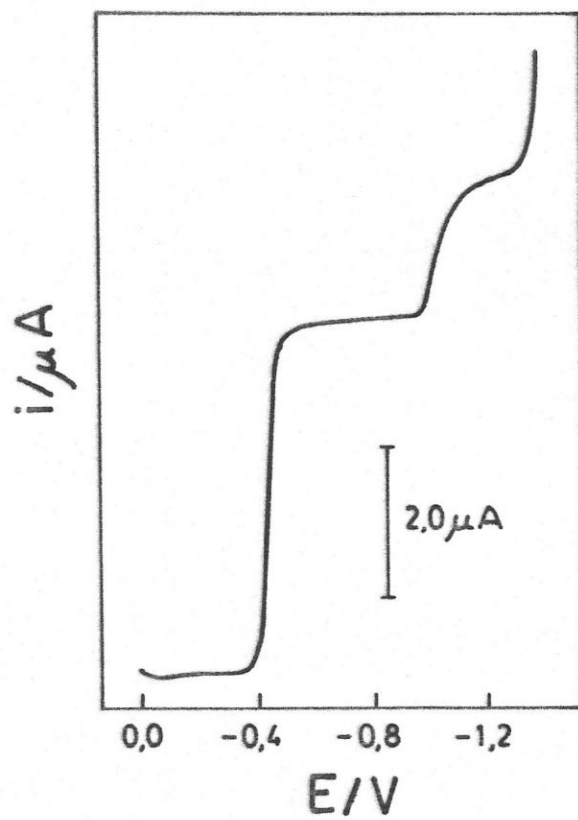


Figura 22.- Ondas de reducción polarográficas de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,184 mM. Otras condiciones como en la Fig. 6.

inspección de las estructuras moleculares indican que aun cuando el átomo de nitrógeno localizado en posición 1 en las drogas intactas posee electrones π disponibles, la presencia de un grupo carbonilo aceptor adyacente en posición 2 es suficiente para evitar la transformación, mediante deshidratación, de la hidroxilamina en el intermediario imina y la subsecuente reducción de este último a amina primaria. De esta forma, estos compuestos sólo son reducidos hasta hidroxilamina en un proceso a $4e^-$.

Por otra parte, la reducción de los productos de hidrólisis en un proceso a $6e^-$ en una sola onda polarográfica puede explicarse por las propiedades dadoras π del grupo amino ($-NHR$) localizado en posición "para" relativo al grupo nitro. La interacción π producida hace posible la transformación química de la hidroxilamina en imina la cual entonces puede ser fácilmente reducida a amina primaria (mecanismo ECE).

El mecanismo involucrado en la reducción del grupo nitro en los productos de hidrólisis fue confirmado mediante estudios comparativos del efecto del pH (fig. 23), usando piridina-ácido fórmico y acético-acetato como sistemas tampónicos. Se observó que los resultados obtenidos corresponden a los del mecanismo ECE establecido para la reducción de p-nitrofenol y p-nitroanilina, donde en ambos casos se genera la imina como intermediario en la reducción total a seis electrones que experimenta el grupo nitro.

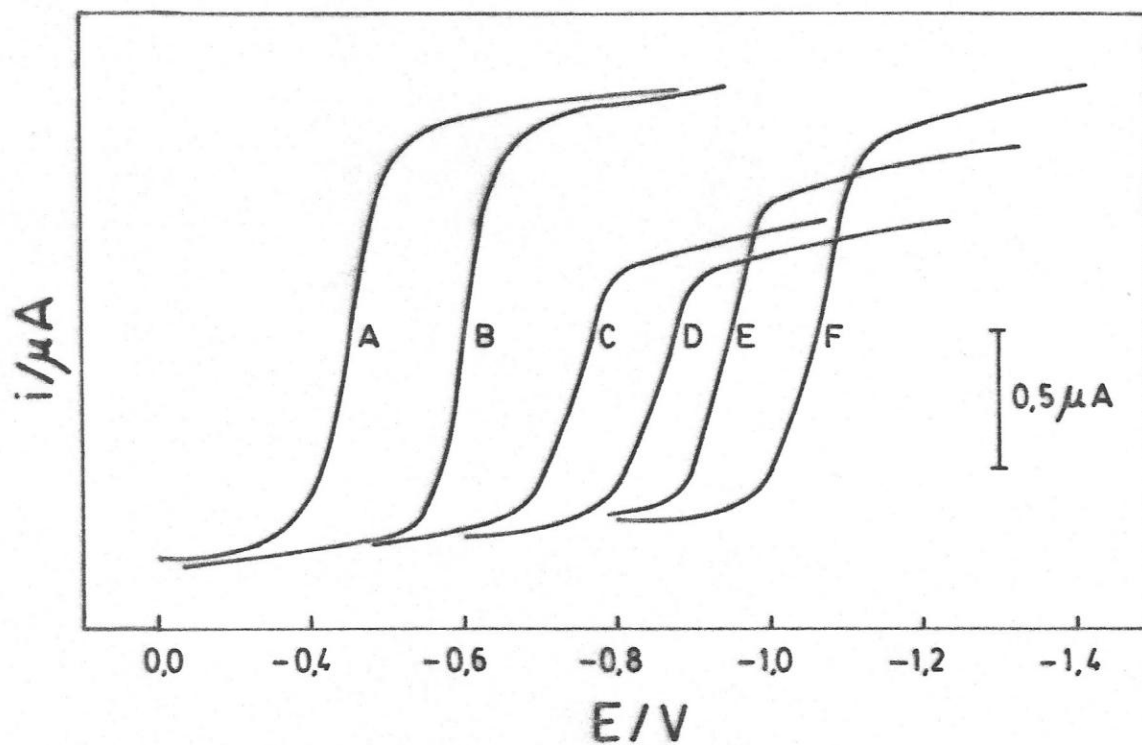
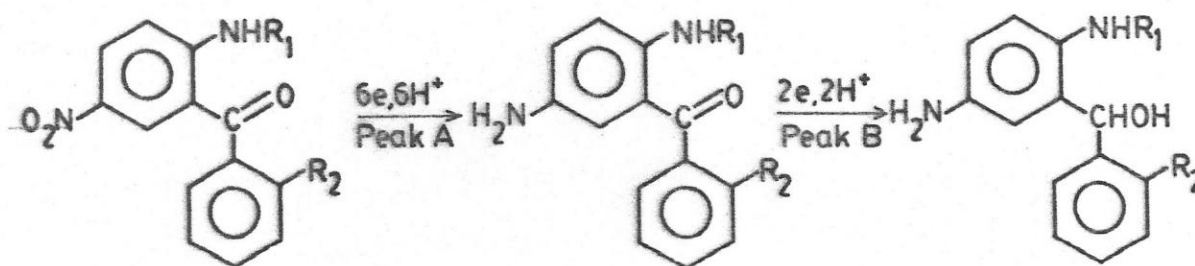


Figura 23.- Polarogramas de 2-amino-5-nitrobenzofenona 0,062 mM en tampón acético-acetato. (A) pH 1,9 (B) pH 4,5 (C) pH 6,8 (D) pH 8,0 (E) pH 9,0 (F) pH 12,5.

La fig 24 muestra un voltamograma cíclico de la 2-amino-5-nitrobenzofenona en el electrolito soporte propuesto de pH 4,5. Como se puede apreciar aparecen dos picos catódicos (A y B) y dos picos anódicos (C y D). Si el barrido de potenciales se invierte antes del pico A ambos picos C y D desaparecen y se mantienen inalterados si el barrido se invierte después del pico A. Este efecto, claramente indica que ambos peaks de oxidación provienen del producto de reducción generado en A.

Este comportamiento voltamétrico es consistente con una reducción a $6e^-$ del grupo nitro en A a la respectiva arilamina formando un derivado p-fenilendiamina, mientras que el peak B debe corresponder a la reducción del carbonilo a alcohol.



El derivado p-fenilendiamina producido, es oxidado en C produciendo una diimina la cual reacciona en la superficie del electrodo con la piridina presente en el seno de la solución de acuerdo a la siguiente reacción:

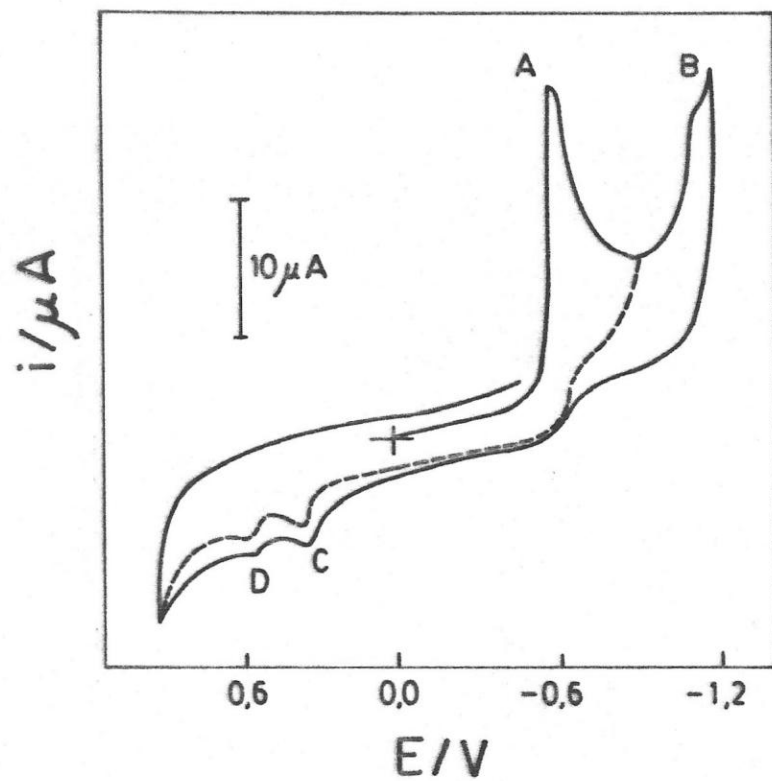
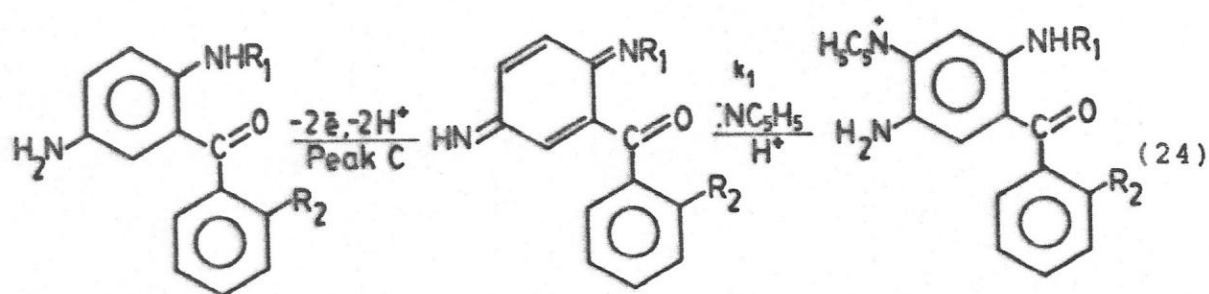
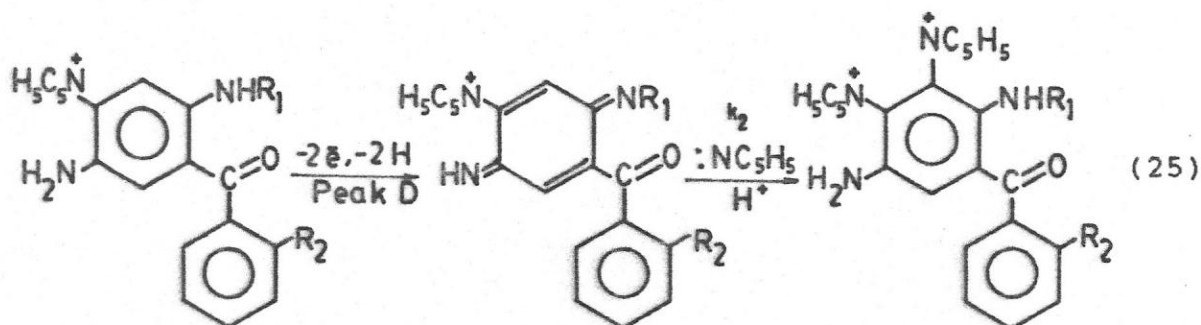


Figura 24.- Voltamograma cíclico de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,196 mM. Otras condiciones como en Fig. 9. Para detalles ver el texto.



Esta especie intermediaria creada es subsecuentemente oxidada en D en un proceso similar al anterior:

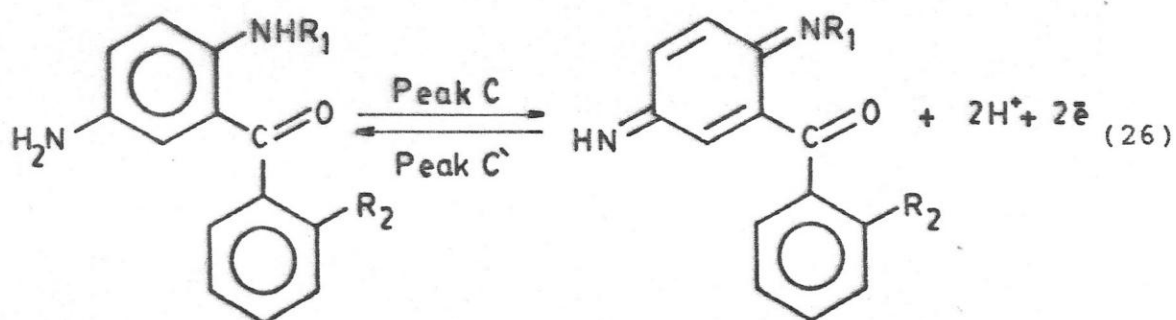


Esta interpretación, está avalada por trabajos previos⁸⁷ en los cuales se describen reacciones nucleofílicas de piridina con compuestos de estructura quinonoide para dar sales cuaternarias. Este tipo de reacciones son catalizadas tanto por ácidos orgánicos y minerales.

Estas dos reacciones químicas acopladas al proceso electródico de oxidación evitan que la respectiva cupla del pico C aparezca, a menos que se utilicen velocidades de

barrido de potenciales superiores a 500 mV/s. Bajo estas condiciones, se estima que el ataque nucleofílico de la piridina es demasiado lento para afectar la reducción del derivado diiminico formado en C. En otras palabras si la velocidad de barrido es muy alta relativa a k_1 la diimina no alcanzará a reaccionar con la piridina y será reducida reversiblemente en un segundo ciclo del barrido.

Un efecto similar al obtenido con un barrido rápido de potenciales, se observó cuando una solución de NaOH fué utilizada en vez de piridina. En este caso, estamos operando en un tampón ácido fórmico-formiato. Manteniendo el pH al mismo valor exhibido por el electrolito soporte original (pH 4,5), ocurre una gran diferencia en la forma del voltamograma cíclico y en la fig 25 se puede apreciar que aparece la cupla diamina-diimina, debido a la ausencia de piridina.



Por otra parte, la figura 25 muestra claramente que el potencial de reducción de la diimina (pico C') es más

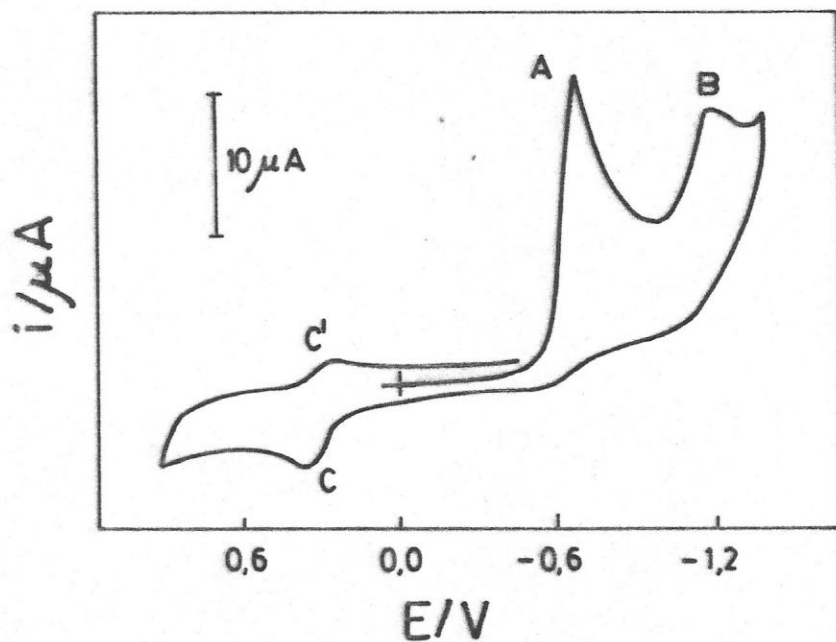


Figura 25.- Voltamograma cíclico de 2-amino-5-nitrobenzofenona a 0,196 mM. Otras condiciones como en la Fig. 9, excepto que el tampón pH 4,5 corresponde a ácido fórmico-formiato. Para mayores detalles ver el texto.

positivo que el correspondiente al grupo nitro (pico A), por lo cual, cuando se genera como intermediario en A, inmediatamente se reduce apareciendo la reacción como un proceso total a seis electrones.

Alternativamente, para probar el rol de la piridina como agente nucleofílico, se realizaron experimentos de voltametría cíclica en un sistema tampónico ácido acético-acetato de pH 4,5. En este electrolito soporta la forma del voltamograma cíclico fué esencialmente la misma que la observada en la fig 25 donde se aprecia, en forma muy clara, la cupla reversible C,C'. Es decir, el intermediario diimina no sufre ninguna reacción química que impida su posterior reducción en C'. Experimentalmente se agregaron cantidades crecientes del tampón piridina-ácido fórmico (pH 4,5) a esta solución, observándose que la forma del voltamograma se aproxima gradualmente al de la figura 24, lo cual indica fehacientemente, que la piridina actúa como un agente nucleofílico.

Para probar el diagnóstico de los respectivos picos se inscribieron voltamogramas cíclicos utilizando una solución estándar de p-fenilendiamina no sustituida, (fig 26) cuya estructura corresponde esencialmente al producto de reducción generado en A (figs. 24 y 25). La similitud observada en los picos C, C' y D (comparar fig 26 con figs 24 y 25) confirma la formación electroquímica del derivado p-fenilendiamina en un proceso de reducción del grupo nitro

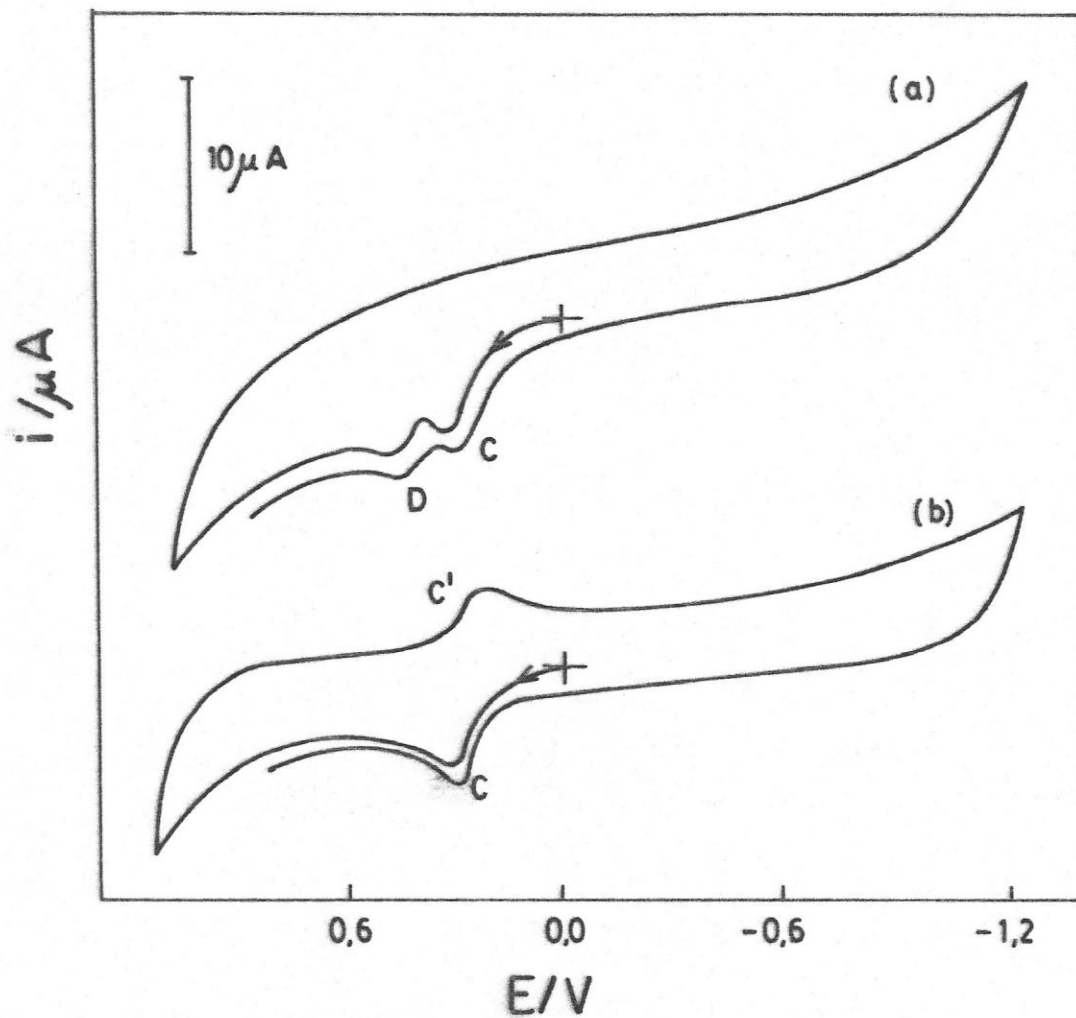


Figura 26.- Voltamograma cíclico de p-fenilendiamina a 0,196 mM en (a) Tampón piridina-ácido fórmico; pH 4,5. (b) Tampón acético-acetato; pH 4,5. Otras condiciones como en Fig. 9.

a seis electrones.

Prosiguiendo con la línea de investigación que pretende relacionar la conducta electroquímica de los nitro derivados con la estructura molecular, se procedió a estudiar el comportamiento del grupo nitro en otro tipo de anillo aromático, para lo cual se escogió como un grupo representativo una serie de compuestos derivados del 2-nitrofurano, los cuales también presentan una notable actividad biológica.

3.3.5. Comportamiento Electroquímico de Nitrofuranos

Estudios polarográficos previos⁸ informan que en tampones Britton-Robinson (pH 2-5), nitrofurantoina da origen a cuatro ondas polarográficas d.c. poco resueltas, las cuales quedan bastante mejor definidas al utilizar polarografía de pulso diferencial. La primera onda se atribuye a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina en un proceso a $4e^-$ y subsecuentemente a amina primaria en una onda a $2e^-$. Se propone, además, que el grupo $-C=N-N<$ es reducido mediante un mecanismo que involucra una fisión reductiva del enlace N-N. El número de ondas y la forma de los polarogramas obtenidos, hace difícil la interpretación de los procesos que ocurren en el electrodo y además este medio no resulta el más adecuado para determinar nitrofuranos en orina.

Por otra parte, nitrofurazona muestra en diferentes electrolitos soportes una reducción en dos ondas polarográficas⁷. La primera se atribuye a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina, mientras que la segunda a una reducción simultánea de la hidroxilamina y el doble enlace imínico.

Vignoli y cols.^{5,6} estudiaron la reducción polarográfica de estos compuestos y observaron dos ondas para la reducción del grupo nitro y tres ondas a $pH < 3$ cuando los compuestos tienen un grupo imino sustituido.

También se ha estudiado la actividad polarográfica de derivados del 2-nitrofurano en varios electrolitos soportes¹⁰, incluyendo BR (pH 1,8-11,2), encontrándose resultados similares a los obtenidos en los trabajos citados anteriormente.

Por otra parte, se han descrito métodos polarograficos, para la determinación de furazolidona⁸⁸ y mezclas⁸⁹ de furazolidona y nitrofurazona en alimentos.

Como se discutió anteriormente, bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, los nitrocompuestos aromáticos son siempre reducidos en una sola onda polarográfica a $4e^-$ o $6e^-$ dando como producto hidroxilamina o amina respectivamente. Como ya se ha demostrado en los compuestos anteriormente estudiados el comportamiento voltamétrico depende esencialmente de la naturaleza y posición de los sustituyentes localizados en el anillo bencénico. Al utilizar un sistema solvente-amortiguador (pH 4,5) de piridina-ácido fórmico conjuntamente con CTMA como electrolito soporte se observó que, estos compuestos nitro sustituidos que contienen un anillo furánico se comportan polarográficamente de manera análoga al p-nitrofenol y son reducidos en una sola onda controlada por difusión a la correspondiente amina primaria en un proceso a $6e^-$ Fig 27. En efecto, al inscribir polarogramas de soluciones equimolares de estos nitrofuranos y de pNF la razón de alturas de las ondas fué en todos los casos $1,05 \pm 0.08$, indicando que en estos casos

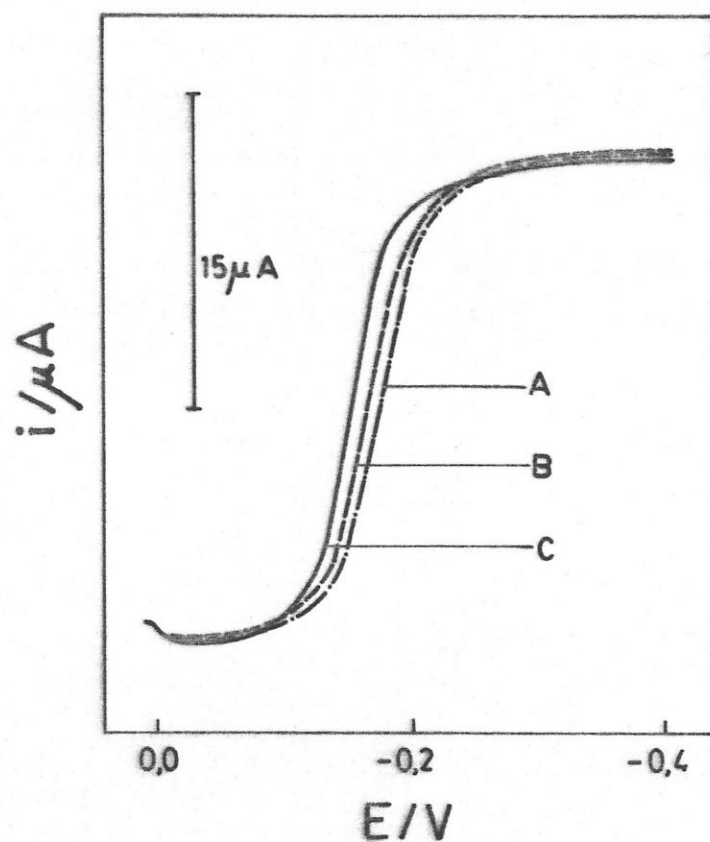


Figura 27.- Ondas de reducción polarográficas de Nitrofurazona, Furazolidona y nitrofurantoína a la misma concentración de 0,124 mM. Otras condiciones como en Fig.6 . (A) Nitrofurazona; $E_{1/2}$ -0,180 V; i_d 2,30 μA . (B) Furazolidona; $E_{1/2}$ -0,170 V; i_d 2,29 μA . (C) Nitrofurantoína; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 2,27 μA .

la reducción es análoga al proceso ECE observado en la reducción de pNF. Las figs. 28 y 29 permiten comparar los polarogramas de soluciones equimolares de nitrofurantoina con pNF y de nitrofurantoina con cloranfenicol. De estos polarogramas se desprende la similitud en el proceso de reducción de nitrofurantoina con respecto a pNF y la diferencia observada en la reducción de nitrofurantoina con respecto a cloranfenicol.

Por otra parte, a partir de las figuras 28 y 29 se hace evidente que la diferencia en los valores de $E_{1/2}$, permite en este electrolito soporte, la posibilidad de efectuar determinaciones simultaneas de nitrofurantoina con cloranfenicol, lo que reviste especial importancia para el caso de que ambas drogas se administren simultaneamente. Además, como se determinó que cloranfenicol se reduce en un proceso a $4e^-$ y pNF a $6e^-$, se puede concluir que tanto nitrofurantoina como los otros derivados nitrofuránicos mencionados se reducen polarográficamente en un proceso a $6e^-$. Los experimentos de electrólisis a potencial controlado realizados, apoyan esta afirmación y sus resultados se resumen en la tabla 5 conjuntamente con los coeficientes de difusión calculados através de la ec de Ilković.

Hemos postulado que, una reducción a seis electrones ocurre sólo si los sustituyentes poseen electrones π disponibles y conjugables con el grupo nitro lo que hace posible, mediante deshidratación, la transformación

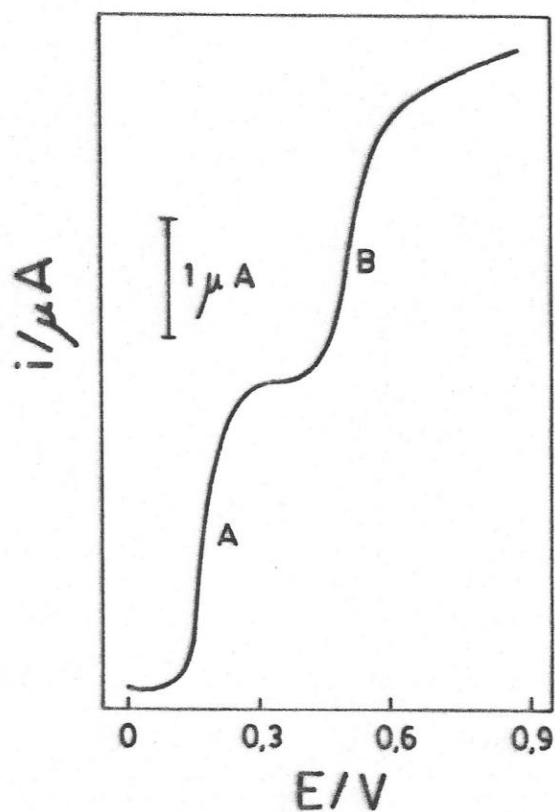


Figura 28.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoina y p-nitrofenol a la misma concentración de 0,124 mM. Otras condiciones como en Fig.6 . (A) Nitrofurantoina; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 2,40 μA . (B) p-Nitrofenol; $E_{1/2}$ -0,500 V; i_d 2,38 μA .

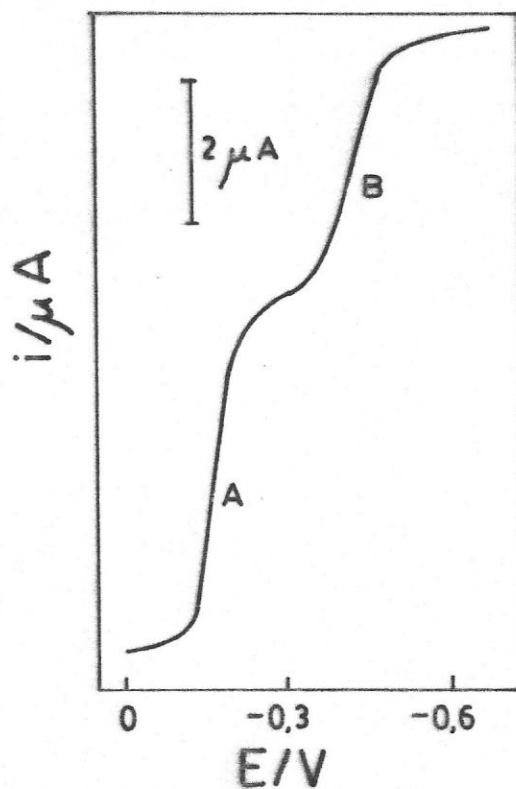


Figura 29.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoina y cloranfenicol a la misma concentración de 0,250 mM. Otras condiciones como en Fig.6 . (A) Nitrofurantoina; $E_{1/2}$ -0,160 V; i_d 4,70 μA . (B) Cloranfenicol $E_{1/2}$ -0,430 V; i_d 3,20 μA .

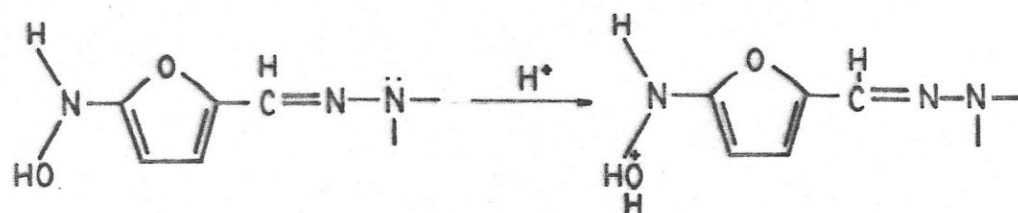
Tabla 5

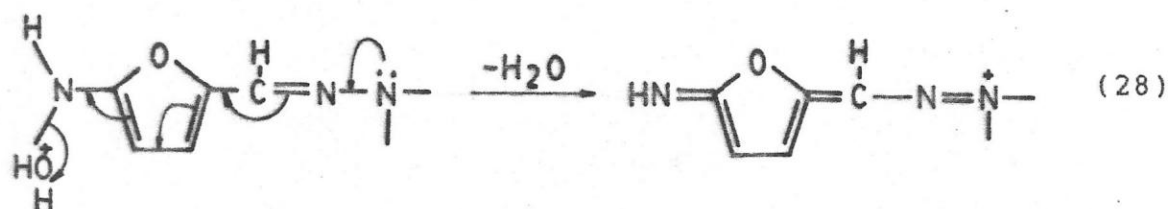
Coefficientes de difusión y datos coulombimétricos para la reducción electroquímica de Nitrofurantoína, Nitrofurazona, Furazolidona y Nifuroxima. Electrolito soporte, CTMA-Piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Compuesto	$D / 10^{-6}$ cm ² /s	Moles/ 10 ⁸	Coulombs	ne
Nitrofurantoína	5,15	5,0	0,0288	6,0
Nitrofurazona	5,28	5,0	0,0294	6,1
Furazolidona	5,24	5,0	0,0281	5,8
Nifuroxima	5,41	5,0	0,0270	5,6

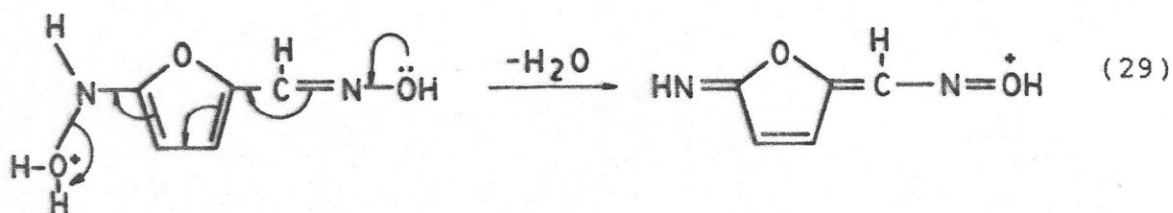
del intermediario hidroxilamina en imina. Este grupo donador sustituido debe estar localizado en una posición "orto" o "para" con relación al grupo nitro en el caso de anillos bencénicos. Análogamente, para anillos furánicos, si el grupo nitro está en posición 5 el sustituyente dador debe estar localizado en posición 2 o 4, de tal forma de que pueda ocurrir la reacción química de deshidratación que permita la formación del intermediario imina el cual es reducido al mismo potencial donde se forma.

De esta manera, la reducción voltamétrica de estos compuestos nitrofuranos en un proceso a $6e^-$ puede explicarse, debido a las reacciones químicas de protonación y pérdida de agua del intermediario hidroxilamina debido a la presencia del grupo dador $>C=N-N<$. El siguiente esquema de reacciones representa el mecanismo de formación de la correspondiente imina a partir de la hidroxilamina:





Para el caso del compuesto nifuroxima que tiene el sustituyente $>C=N-OH$, la ec 28 quedaría:



Para probar el efecto de estos sustituyentes donores en la reducción a $6e^-$ del grupo nitro, se trabajó bajo las mismas condiciones con el compuesto 2-nitrofurano no sustituido, y con los compuestos 2-ácido-5-nitrofuroico, y el 5-nitro-2-furaldehído los cuales contienen un sustituyente totalmente aceptor en posición 2. Como era de esperar se observó que, en estos tres compuestos el grupo nitro es reducido en una única onda polarográfica controlada por difusión en un proceso a $4e^-$ (tabla 6).

Como se puede apreciar en la tabla 6, el valor de i_d/C correspondiente a la reducción de los compuestos que no

Tabla 6

Datos polarográficos y coulombimétricos para la reducción de compuestos derivados del 2-Nitrofurano. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico. Concentración, 0,124 mM, pH 4,5.

Compuesto	$E_{1/2}/V$	$i_d/\mu A$	i_d/C	ne*
2-Nitrofurano	-0,37	1,72	13,9	4,2
2-Acido-5-nitrofuroico	-0,26	1,60	12,9	3,8
5-Nitro-2-furaldehido	-0,12	1,55	12,5	3,9

(*) Número de electrones calculados para la reducción de $5 \cdot 10^{-8}$ moles de cada compuesto.

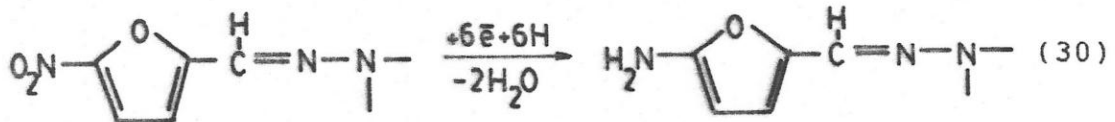
contienen el grupo $>C=N-N<$ o $>C=N-OH$, es del orden de $2/3$ del correspondiente al de aquellos que si lo contienen. Esto indica que este grupo funcional es fundamental para producir una reducción a $6e^-$, y que los compuestos 2-nitrofurano, 2-ácido-5-nitrofuroico, y 5-nitro-2-furaldehído sólo son reducidos a $4e^-$ hasta la respectiva hidroxilamina. En la misma tabla 6 se muestran los valores de n calculados por electrólisis a potencial controlado, los cuales confirman la afirmación anterior.

En opinión de Stradins et al.⁹⁰ la introducción de estos grupos funcionales donores facilita la reducción del grupo hidroxilamino en tal alto grado que este proceso ocurre a un potencial menos negativo que la reducción del grupo nitro. Esto produce como efecto final la aparición de una única onda difusional total a $6e^-$.

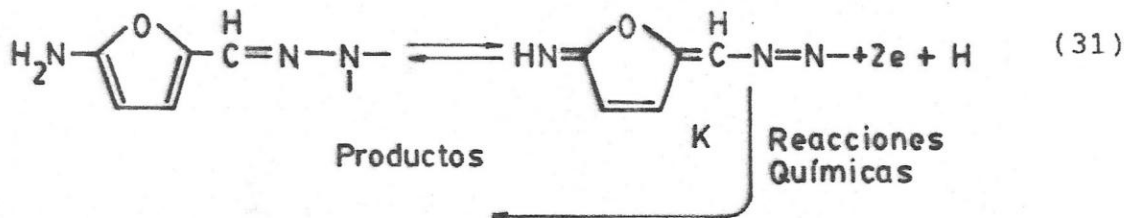
Esta hipótesis es concordante en gran medida a la postulada en el presente trabajo acerca de la función del grupo $>C=N-N<$ en la reducción del grupo nitro. Sin embargo, dada la similitud observada entre la reducción de estos compuestos y la de pNF, es lícito suponer que la hidroxilamina no se reduce directamente, sino que previamente experimenta una reacción química de deshidratación para dar origen al intermediario imina. Existen, por otra parte, evidencias que este intermediario presenta un potencial de reducción más positivo que el del grupo nitro.

Para obtener una mayor información, se registraron voltamogramas cíclicos de nitrofurantoína, nitrofurazona y furazolidona (Fig 30) bajo idénticas condiciones para determinar especies intermediarias.

El pico A corresponde a la reducción del grupo nitro a $6e^-$ dando como producto la amina primaria de acuerdo a la siguiente reacción:



La amina producida es subsecuentemente oxidada en el pico B a la imina, la cual puede ser hidrolizada o reaccionar químicamente con algún componente de la solución produciendo un derivado que no se reduce ni se oxida a los potenciales de trabajo.



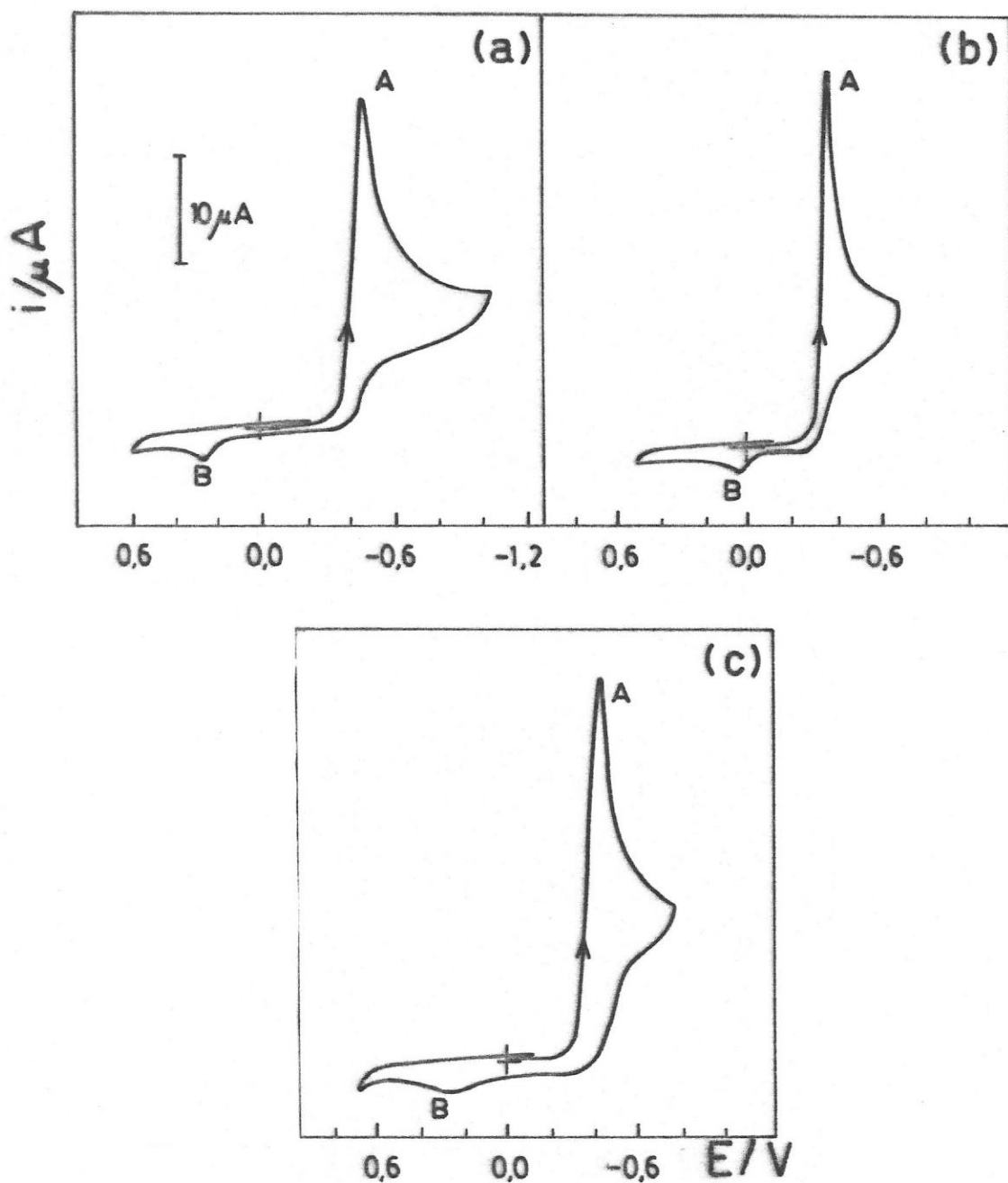


Figura 30.- Voltamogramas cíclicos de: (a) Nitrofurazona; (b) Furazolidona; (c) Nitrofurantoina a la misma concentración de 0,476 mM. Otras condiciones como en Fig.9 . Pico A denota la reducción del grupo nitro a la amina primaria y B corresponde a la oxidación de la amina a la correspondiente imina.

Cabe destacar que, los productos de reducción de nitrofuranos, contrariamente a los de nitrobenzenos que son fácilmente obtenibles, aquellos son altamente inestables y sufren reacciones de isomerización, descomponiéndose con subsecuente ruptura del anillo^{91,92}.

Cuando las velocidades de barrido de potencial son superiores a 0,3 V/s un segundo pico catódico comienza a aparecer, correspondiente a la reducción reversible del derivado imínico. De esto se deduce que, sobre estas velocidades de barrido las reacciones químicas que sufre el derivado imina son muy lentas como para evitar su reducción, que bajo estas condiciones aparece reversible (fig. 31). Contrariamente, si el barrido es lento relativo a k (ec 30), la reacción química tendrá lugar antes de alcanzar los potenciales de reducción de la imina, y de esta forma el proceso aparecerá totalmente irreversible.

Como se aprecia en la fig. 31 el potencial de reducción del derivado imina (pico C) es bastante más positivo que el potencial de reducción del grupo nitro (pico A), consecuentemente esta onda no se observa en polarografía.

Por otra parte, cualquiera sea la reacción química que sufra la imina, ésta no debe ser lo suficientemente rápida como para afectar la onda de reducción polarográfica del grupo nitro.

En adición a estos aspectos, los constituyentes del

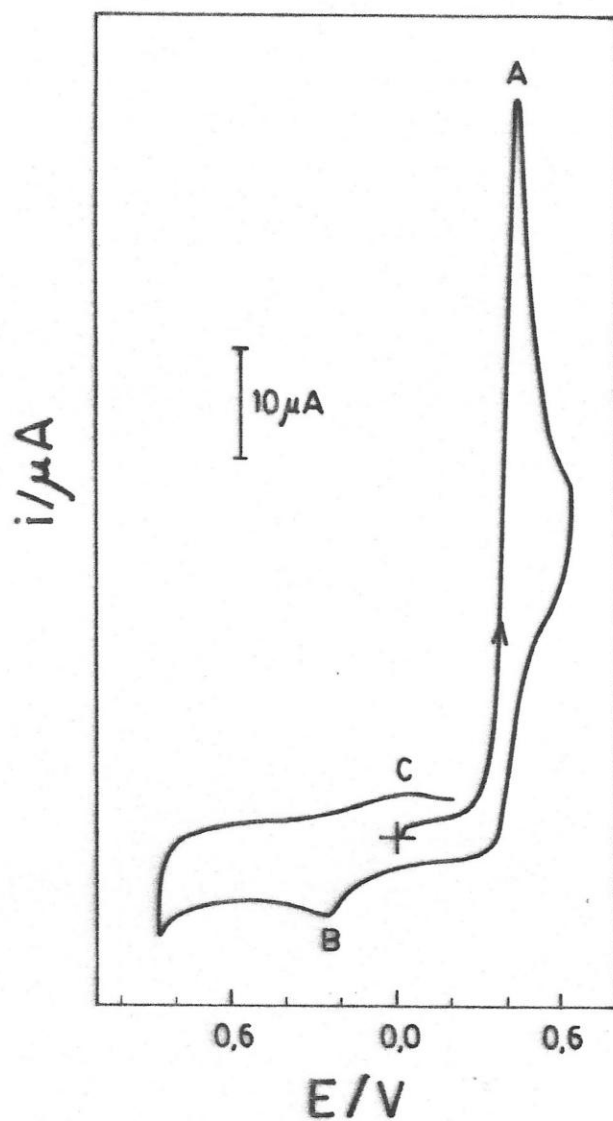


Figura 31.- Voltamograma cíclico de nitrofurazona en las mismas condiciones de la Fig. 30, excepto que la velocidad de barrido de potencial es de 0,3 V/s. Picos B,C denotan la cupla redox amina-imina.

amortiguador del electrolito soporte, parecen tener un efecto significativo en la forma y número de ondas de reducción reportadas. Hemos observado que, en medios fuertemente tamponados tal como el constituido por piridina y ácido fórmico, en el rango ácido, siempre se obtiene una sola onda para la reducción de todos los nitro derivados estudiados. Sin embargo, en medios débilmente tamponados, o en tampones BR, los compuestos nitrofuranos son reducidos a hidroxilamina y subsecuentemente a amina en una segunda onda polarográfica⁶⁻⁸. Similarmente, como fué señalado anteriormente, cloranfenicol también es reducido en dos ondas al usar buffers de phtalato⁹ o acetato⁵⁵ (pH 4-5).

Si estas consideraciones mecanísticas expuestas por estos autores fueran válidas, cloranfenicol, nitrofurantoina y otros nitro derivados, experimentarían un proceso electródico casi idéntico, llegando a ser electroquímicamente indistinguibles. No obstante en un medio constituido por piridina-ácido fórmico y CTMA, se notan diferencias marcadas entre series de compuestos estructuralmente relacionados, como se ha discutido a lo largo de esta tesis.

Para nitrofurantoina, nitrofurazona y furazolidona los valores de $E_{1/2}$ son dependientes del pH, desplazándose hacia valores negativos con el incremento del pH. Las gráficas de $E_{1/2}$ vs pH muestran tres porciones lineales (fig 32) cuyas ecuaciones se muestran en la tabla 7.

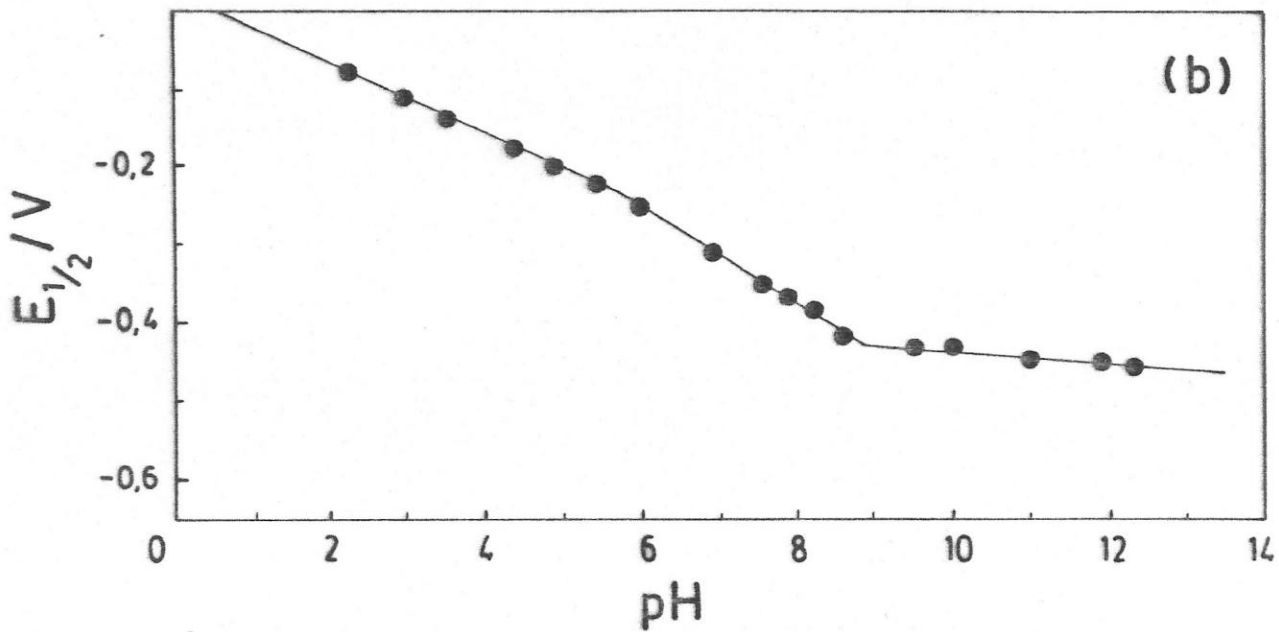
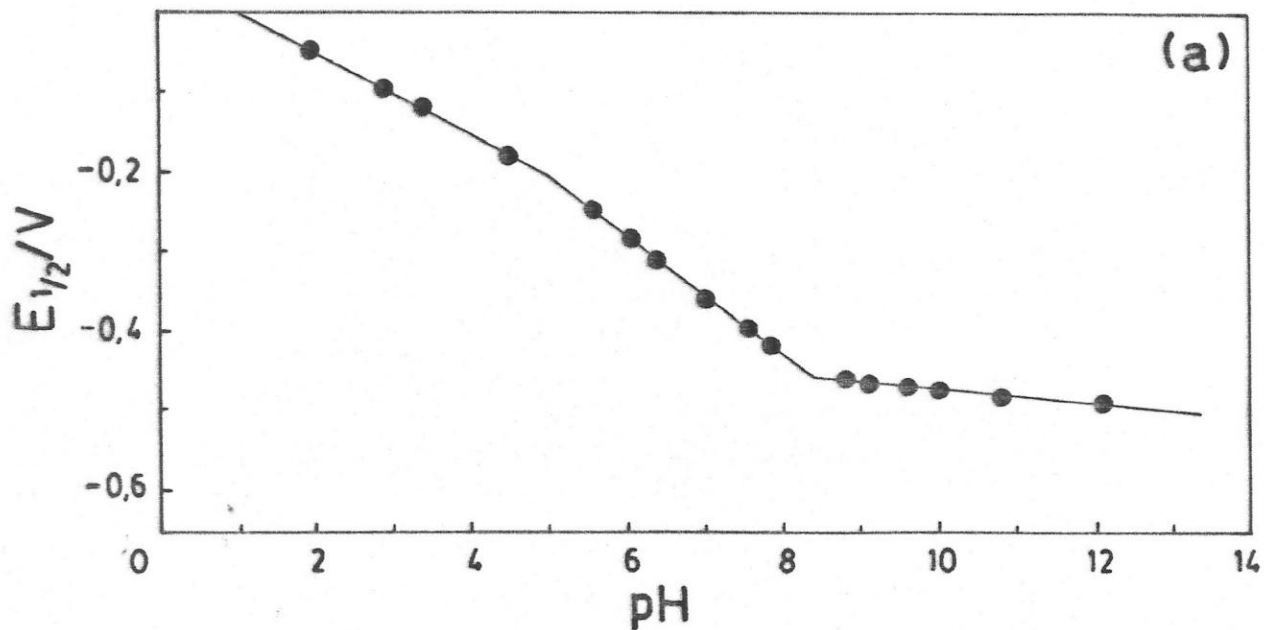


Figura 32.- Efecto del pH sobre los potenciales de media onda para la reducción de (a) Nitrofurazona y (b) Furazolidona a una concentración de 0,124 mM.

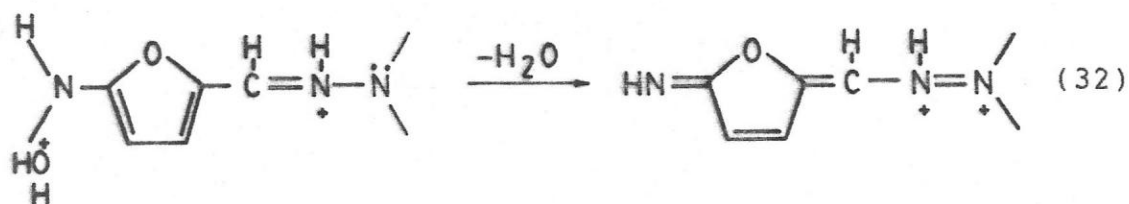
Tabla 7

Ecuaciones que describen el comportamiento del potencial de media onda polarográfico con el pH, para Nitrofurantoína, Nitrofurazona y Furazolidona.

Nitrofurantoína	
Rango de pH	Ecuación
0,00 - 5,07	$E_{1/2} = -0,049 \text{ pH} + 0,031 \text{ V}$
5,07 - 8,26	$E_{1/2} = -0,101 \text{ pH} + 0,029 \text{ V}$
8,26 - 14	$E_{1/2} = -0,0034\text{pH} - 0,514 \text{ V}$
Furazolidona	
Rango de pH	Ecuación
0,00 - 5,50	$E_{1/2} = -0,045 \text{ pH} + 0,031 \text{ V}$
5,50 - 8,79	$E_{1/2} = -0,061 \text{ pH} + 0,290 \text{ V}$
8,79 - 14	$E_{1/2} = -0,0034\text{pH} - 0,514 \text{ V}$
Nitrofurazona	
Rango de pH	Ecuación
0,00 - 5,12	$E_{1/2} = -0,051 \text{ pH} + 0,050 \text{ V}$
5,12 - 8,43	$E_{1/2} = -0,075 \text{ pH} + 0,173 \text{ V}$
8,43 - 14	$E_{1/2} = -0,0089\text{pH} - 0,384 \text{ V}$

La corriente límite para estos compuestos también es función del pH (fig 33). El leve decaimiento en la corriente observado a $\text{pH} < 3$ está probablemente asociado a un equilibrio ácido-base que involucra al nitrógeno en posición α (ver estructura). Este equilibrio ácido-base ha sido estudiado mediante espectrofotometría⁸.

La protonación del nitrógeno α , desestabilizaría el intermediario imino generado a partir de la hidroxilamina, debido a una repulsión electrostática entre los dos átomos de nitrógeno vecinos, los cuales quedarían cargados positivamente.



Este efecto, observado a $\text{pH} < 3$, probablemente evitaría la formación cuantitativa de la amina primaria, lo que determinaría una disminución del tamaño de la onda polarográfica a estos valores de pH.

Este decaimiento en la altura de la onda a $\text{pH} < 3$, puede ser debido también a una interacción ion-dipolo entre las formas protonadas de los nitrofuranos. Bodini et al.⁹³ ha

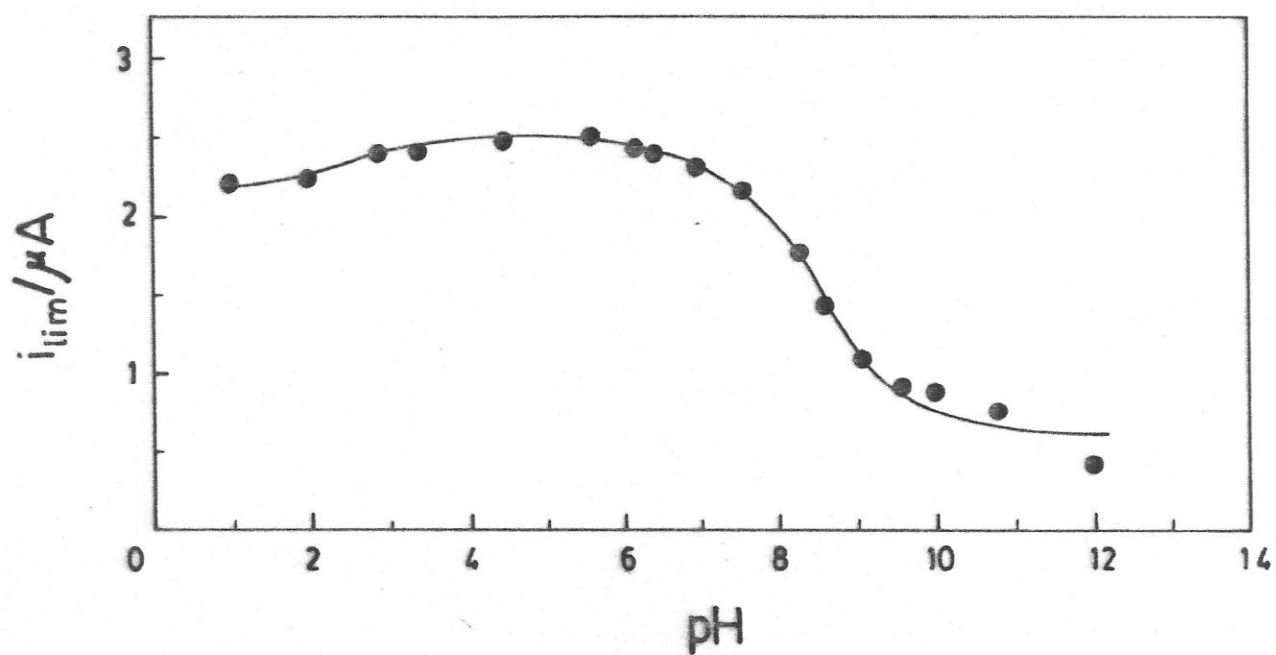


Figura 33.- Efecto del pH sobre la corriente de difusión en la reducción de nitrofurazona a 0,124 mM.

postulado esta posibilidad al estudiar la reducción del nitro derivado metronidazol. Esta interacción cambia el coeficiente de difusión de estas especies, haciendo disminuir la corriente límite. De cualquier forma, el gráfico de $\log(i/i_d - i)$ vs E , en esta zona de pH, muestra dos porciones lineales (fig 34), indicando que dos especies están siendo reducidas en el electrodo.

Entre pH 3,0-5,5 existe un valor máximo y constante para la corriente límite. Sobre pH 5,5 la onda comienza lentamente a decaer y a estos valores de pH se observa el primer quiebre en los gráficos de $E_{1/2}$ vs pH (fig 32), lo cual representa al pH al cual el intermediario hidroxilamina no se protona lo suficiente desfavoreciendo la reacción de deshidratación y la subsecuente reducción de la imina. Entre pH 8-9 la altura de la onda decae bruscamente, dividiéndose en dos ondas las cuales sobre pH 11 están en una relación aproximada de 1:5 (fig 35). La primera onda, como en los estudios anteriores, corresponde a la reducción del grupo nitro al nitro anión radical. Este brusco decaimiento en la onda está acompañado por un segundo quiebre en la gráfica de $E_{1/2}$ vs pH, indicando que un proceso diferente ocurre a partir de esos valores de pH. La suma de las dos ondas en medio básico corresponde a la altura de la onda en medio ácido, lo que indica que una amina primaria es el producto obtenido en zonas alcalinas, tal como fué discutido en la reducción de pNF.

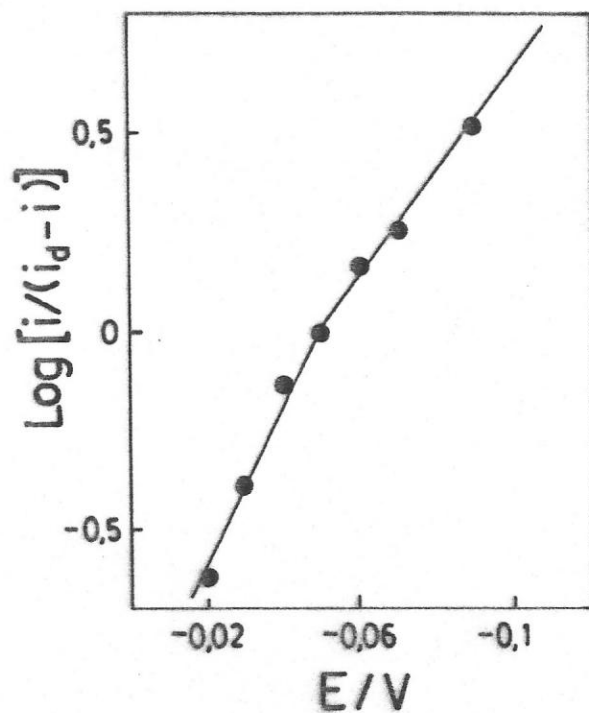


Figura 34.- Análisis logarítmico de la onda de reducción polarográfica de nitrofurantoina a pH 2,6. Pendientes 50 y 77 mV.

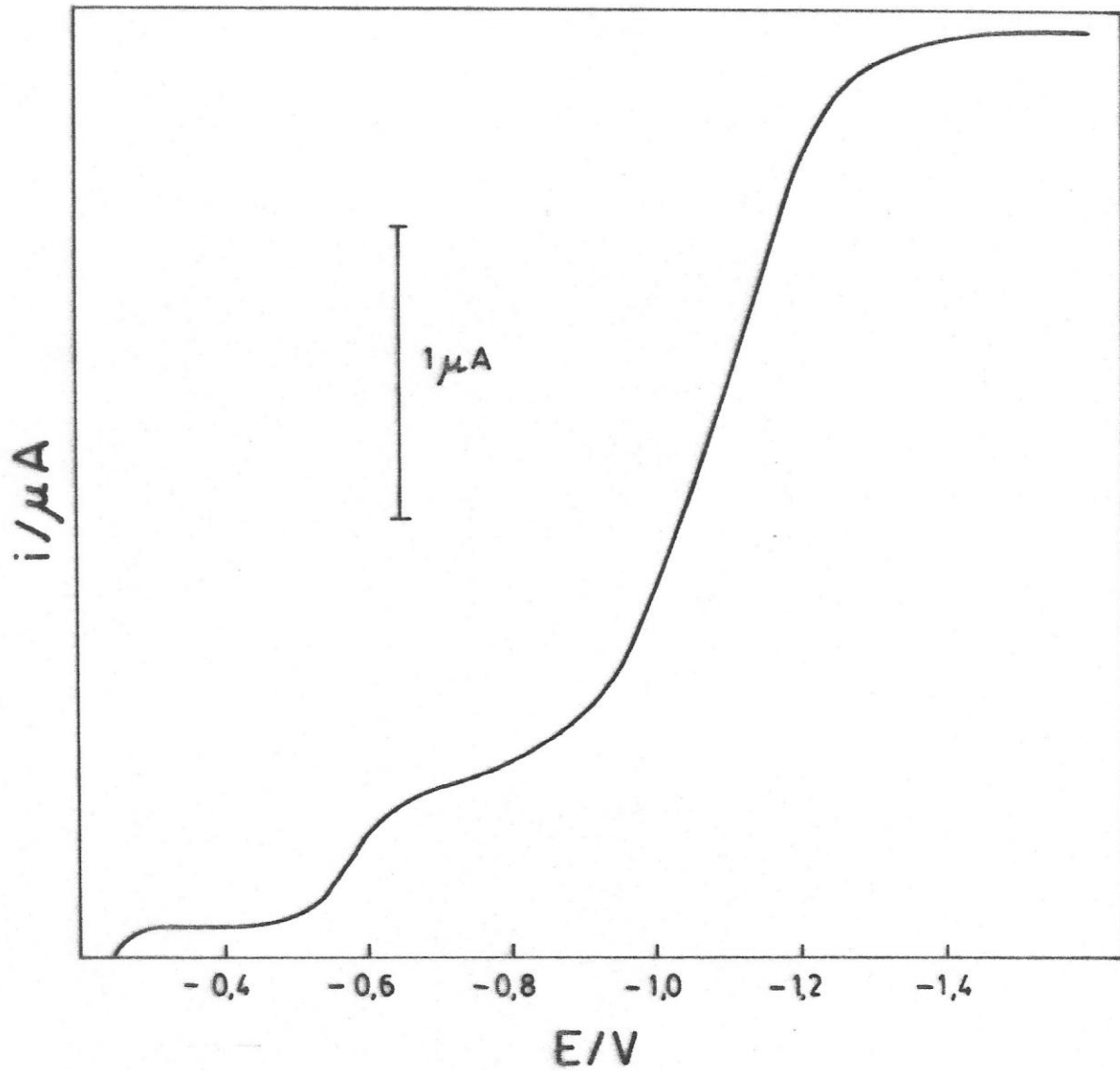


Figura 35.- Ondas de reducción polarográficas de nitrofurantoina a 0,124 mM y a pH 11,1. Este valor de pH se logró agregando NaOH 6 M al electrolito soporte propuesto.

La presencia del nitro anión radical en la reducción de 5-nitrofuranos, como en la reducción de todos los nitro derivados estudiados, se puede deber a la baja actividad de protones en la solución y a las propiedades tensoactivas de la piridina, como se discutió anteriormente.

Stradins y Reichman^{94,95} observaron que, en solución acuosa o en mezclas alcohol-agua y en presencia de sustancias surfactantes, se produce una división de la onda polarográfica de los nitrofuranos siendo la primera atribuida a una reducción monoelectrónica para formar el nitro anión radical.

Voltamogramas cíclicos de estos compuestos a pH básico (fig. 36) muestran que, el pico monoelectrónico de reducción es reversible. Este pico precede al principal pico de reducción el cual, se desplaza a valores más negativos. Invirtiendo el barrido entre los picos C y A se observa que el peak B desaparece indicando que el peak D corresponde a la oxidación reversible del anión radical formado en C.

Basandose en el comportamiento polarográfico y ciclo voltamétrico de estos compuestos se puede proponer un mecanismo de reducción aplicable a estos nitro furanos de importancia biológica.

La naturaleza de las ondas y los peaks de reducción son controlados por difusión, así lo muestran las relaciones $i_{lim} h^{-1/2}$ e $i_p/Cv^{1/2}$ (tabla 8).

La irreversibilidad del proceso electródico que se

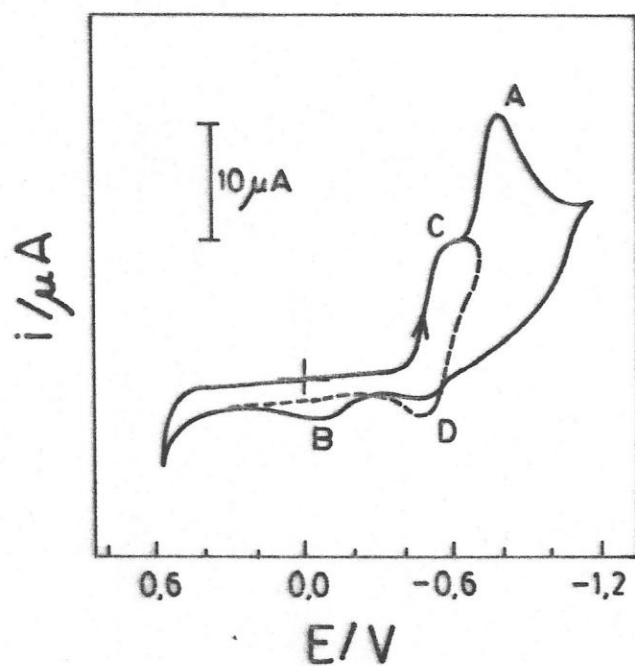


Figura 36.- Voltamograma cíclico de Nitrofurazona a 0,476 mM en medio alcalino; pH 10. Electrodo de carbono vitreo; velocidad de barrido 0,1 V/s; picos A y B como en la fig. 30 pero desplazados catódicamente; Pico D denota la oxidación del nitro anión radical formado en C. La línea segmentada se obtiene al invertir el barrido después del pico C.

Tabla 8

Datos voltamétricos para la reducción de Nitrofurazona y Furazolidona. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico pH 4,5.

Nitrofurazona			
Concentración/ mM	Velocidad de Barrido/ V/s	$i_p/\mu\text{A}$	$i_p/Cv^{1/2}$
0,196	0,0200	5,60	202
	0,0500	9,20	210
	0,100	13,2	213
	0,200	17,6	201
	0,300	20,8	194
	0,400	23,6	191
0,476	0,0200	14,4	214
	0,0500	22,4	211
	0,100	33,2	220
	0,200	43,2	203
	0,300	51,6	198
	0,400	59,2	197
Furazolidona			
Concentración/ mM	Velocidad de Barrido/ V/s	$i_p/\mu\text{A}$	$i_p/Cv^{1/2}$
0,196	0,0200	5,80	209
	0,0500	9,20	210
	0,100	12,8	207
	0,200	18,0	205
	0,300	21,6	201
	0,400	24,2	195
0,476	0,0200	14,4	214
	0,0500	22,4	211
	0,100	32,0	213
	0,200	44,2	212
	0,300	55,2	212
	0,400	60,4	201

aprecia claramente en los voltamogramas cíclicos, fué verificada mediante el análisis logarítmico de la onda (ec 3). La pendiente del gráfico logarítmico excede apreciablemente el valor $59/n$ mV y el valor numérico de $E_{1/4}-E_{3/4}$ excede $54,6/n$ mV.

El número total de electrones involucrados en el proceso de reducción fué calculado voltamétricamente^{19,96} para cada compuesto. Este método, basado en la ecuación de Ilković (ec 1) consiste en comparar directamente las alturas de las ondas i_d , en soluciones equimolares del compuesto en estudio, con otros en los cuales el valor de n es conocido. Lógicamente los compuestos que se comparan deben tener el mismo grupo electroactivo y ser reducidos con un control difusional. Al realizar esta comparación se puede establecer que el valor del número de electrones calculados por este método, n_v corresponde a $6e^-$. (ver tabla 9)

El número de electrones calculados por electrólisis a potencial controlado también resultó ser seis.

Los valores de αn_a y P fueron calculados a diferentes valores de pH. A pH 4,5 los valores de αn_a para los 5-nitrofuranos (tabla 9) están entre 1,12 y 1,23, indicando que, en todos los casos, dos electrones toman parte en la etapa determinante de la reacción. Mediante la ec 4 se determinaron los valores de P , los cuales se encuentran entre 0,88 y 0,98 (tabla 9), lo que implica que en todos los casos hay un protón involucrado en la etapa

Tabla 9

Resumen de datos voltamétricos para todos los nitro derivados estudiados. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico. pH=4,5

Compuesto	$E_{1/2}/V$	$D/10^{-6} \text{ cm}^2/s$	n_v	n_c	i_d/C	αn_a^*	P^*	i_{pH}/CV
Nitrobenzeno	-0,40	6,50	4	4	13,6	1,1	0,98	125
m-Nitrofenol	-0,38	6,61	4	4	13,7	1,2	1,1	132
p-Nitrofenol	-0,52	5,39	6	6	19,1	0,75	0,83	231
o-Nitrofenol	-0,45	5,62	6	6	19,5	0,95	1,0	215
Cloranfenicol	-0,43	6,01	4	4	13,1	0,89	0,95	115
Paratión	-0,32	6,05	4	4	13,1	0,99	1,1	168
DON	-0,39	5,05	4	4	11,7	0,95	0,85	139
Nitrazepam	-0,34	6,01	4	4	13,1	0,86	0,94	128
Clonazepam	-0,28	5,72	4	4	12,7	0,95	0,98	140
Flunitrazepam	-0,28	5,51	4	4	12,5	0,99	0,88	121
5-Nitro-2-AB	-0,48	5,28	6	6	18,9	1,1	0,91	250
Nitrofurant.	-0,16	5,15	6	6	18,7	1,1	0,98	225
Nitrofuraz.	-0,18	5,28	6	6	18,9	1,2	0,93	210
Furazolidona	-0,17	5,24	6	6	18,8	1,1	0,88	205
Nifuroxima	-0,23	5,41	6	6	19,1	1,1	0,91	219
2-Nitrofurano	-0,37	6,21	4	4	13,9	0,88	0,92	115
2-A-5-NitroF.	-0,26	5,86	4	4	12,9	----	----	---
5-Nitro-2-Fu.	-0,12	5,51	4	4	12,5	----	----	---

n_v , Número de electrones calculados voltaméricamente; aproximado al entero más cercano.

n_c , Número de electrones calculados coulombiméricamente; aproximado al entero más cercano.

5-Nitro-2AB, 5-nitro-2-aminobenzofenona

Nitrofurant., nitrofurantoina

Nitrofuraz., nitrofurazona

2-A-5-NitroF., 2-ácido-5-nitrofuroico

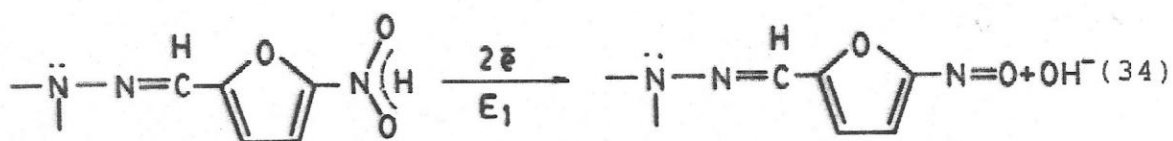
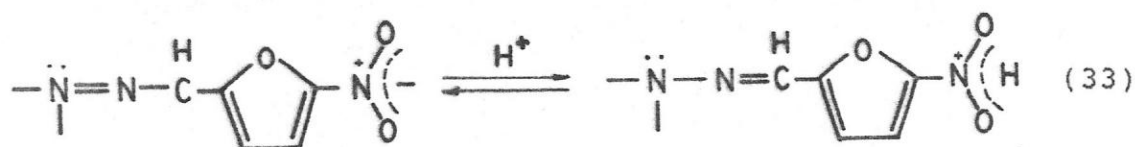
5-Nitro-2-Fu., 5-nitro-2-furaldehido

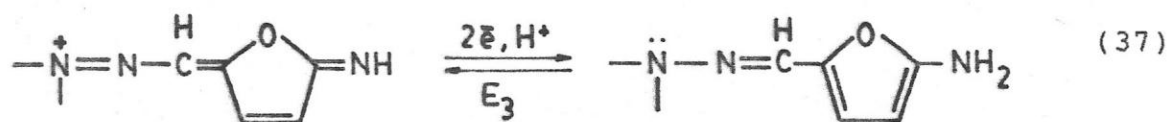
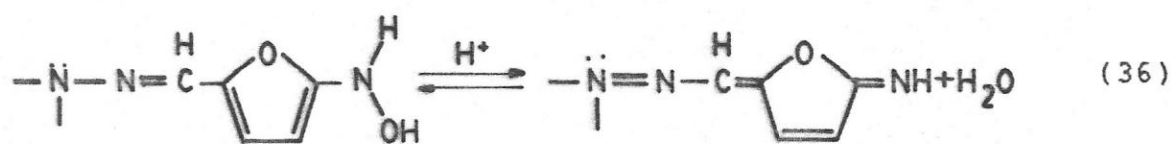
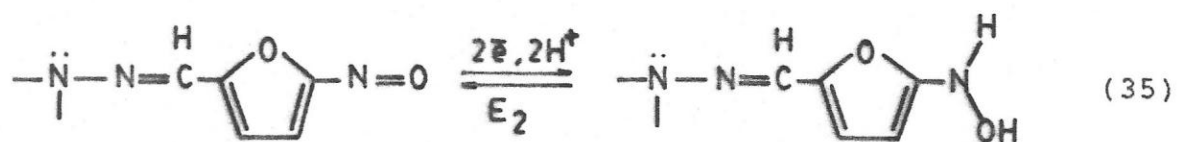
(*) Valores promedio entre pH 1-8

determinante de la reducción (pH 1 - 8).

La etapa determinante de la reacción corresponde entonces a la formación del nitroso derivado. Una similar estequiometría para esta etapa se ha establecido para la reducción de todos los nitro derivados en estudio.

El grupo nitroso es rápidamente reducido a hidroxilamina, la cual se estabiliza en este estado si no es posible su deshidratación. En caso de ser posible la hidroxilamina experimenta una rápida protonación y pérdida de agua dando origen a un intermediario imina que es altamente reducible. Este intermediario es entonces reducido reversiblemente a amina primaria (fig 31). Esta cupla reversible fué observada en voltametría cíclica a velocidades de barrido > 300 mV/s. A menores velocidades, la reacción aparece irreversible debido a que la imina reacciona químicamente para dar productos inertes como se indicó más arriba. El mecanismo de reducción propuesto para los compuestos nitrofuránicos se observa a continuación:





3.4. Determinación polarográfica de nitro derivados de importancia biológica.

Una revisión bibliográfica previa indica que los compuestos nitro derivados de importancia biológica han sido determinados en diferentes matrices utilizando técnicas tales como la espectrofotometría,⁹⁷ cromatografía gaseosa⁹⁸ y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).^{99,100} Estos métodos, particularmente los de HPLC, son de gran aplicabilidad. Sin embargo, los instrumentos utilizados son de un costo bastante más elevado a los requeridos en técnicas electroquímicas. Por otra parte, las aplicaciones de métodos cromatográficos y espectrofotométricos en el análisis de drogas tanto en formulaciones farmacéuticas como en fluidos biológicos, consumen una gran cantidad de tiempo en separaciones. Es decir, involucran, en general, engorrosos procedimientos de extracción del analito desde la matriz, aumentando el tiempo de análisis así como también el costo al utilizar reactivos auxiliares. Es bastante conocido que el número de pasos en un procedimiento analítico dado debe ser reducido al mínimo de manera de eliminar fuentes de error.

En este sentido la electroquímica, particularmente la polarografía, ha sobresalido por ser una técnica

relativamente rápida, de bajo costo, sensible y aplicable a la determinación de drogas en diferentes matrices. Actualmente las técnicas electro-analíticas están siendo ampliamente utilizadas,^{1-3,101,102} como un método de elección en el análisis farmacéutico. La principal ventaja de estas técnicas, en este tipo de análisis, es que los componentes de la matriz no interfieren como ocurre generalmente en otros métodos.

Es importante señalar que, toda la información obtenida de los experimentos realizados en esta tesis, ha servido para establecer los parámetros analíticos óptimos, cuyo conocimiento es indispensable antes de abordar una determinada técnica analítica. Estos experimentos muestran que en medios bien tamponados (piridina-ácido fórmico) la reducción de los compuestos nitro aromáticos se produce en una sola onda polarográfica bien definida y controlada por difusión. Desde un punto de vista analítico, esto es muy importante, ya que la selectividad del método es tal, que permite realizar determinaciones simultáneas de algunos nitro derivados. Por otra parte, el proceso global de reducción es irreversible y depende esencialmente de la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo aromático.

3.4.1. Rango de pH para las Determinaciones Analíticas

El efecto del pH en el rango 1-12 sobre la corriente límite polarográfica, fué establecido para los diferentes depolarizadores analizados. De estos datos polarográficos se escogió el rango de pH óptimo para llevar a cabo las determinaciones analíticas (tabla 10). En la tabla se puede apreciar que el valor de pH del electrolito soporte original de piridina-ácido fórmico-CTMA (pH 4,5) cae siempre dentro de los máximos constantes de la corriente límite. Por lo cual este valor de pH se escogió para llevar a cabo todas las determinaciones analíticas. En estas condiciones todos los compuestos son reducidos con un control difusional, con lo cual se tiene la certeza que la corriente de difusión varía linealmente con la concentración de la sustancia estudiada.

Al valor de pH 4,5, establecido para propósitos analíticos, se construyeron curvas de calibración para todos los compuestos estudiados.

Las rectas de regresión que describen el comportamiento de la corriente de difusión con la concentración fueron calculadas de acuerdo al método de los mínimos cuadrados. Las ecuaciones de calibración se muestran en la tabla 11 para los diferentes compuestos estudiados.

Alternativamente se utilizó el método de las adiciones estándares, con el propósito de probar si los

Tabla 10

Rango de pH óptimo para la determinación polarográfica de diferentes compuestos nitro derivados. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico.

Compuesto	Rango de pH
Nitrobenceno	1,0 - 5,5
p-Nitrofenol	0,0 - 5,0
Cloranfenicol	0,0 - 5,0
Paratión	3,0 - 6,0
DON	0,0 - 6,0
Nitrazepam	0,0 - 5,0
Flunitrazepam	0,0 - 5,0
Clonazepam	0,0 - 5,5
5-Nitro-2-amino- benzofenona	0,0 - 5,5
Nitrofurantoína	3,0 - 6,0
Nitrofurazona	3,5 - 6,0
Furazolidona	3,5 - 6,0
Nifuroxima	3,0 - 5,5

Tabla 11

Ecuaciones de regresión que describen el comportamiento de la corriente de difusión $i_d/\mu\text{A}$ con la concentración/mM de compuestos nitro derivados.

Compuesto	Ecuación*	r**
Nitrobenceno	$i_d = 13,58 C + 0,03$	0,999
p-Nitrofenol	$i_d = 19,09 C + 0,02$	0,999
Cloranfenicol	$i_d = 13,06 C - 0,01$	0,998
Paratión	$i_d = 13,10 C + 0,01$	0,998
DON	$i_d = 11,70 C + 0,02$	0,999
Nitrazepam	$i_d = 13,06 C + 0,02$	0,998
Clonazepam	$i_d = 12,74 C + 0,02$	0,999
Flunitrazepam	$i_d = 12,50 C + 0,03$	0,998
5-Nitro-2-amino-benzofenona	$i_d = 18,90 C + 0,04$	0,999
Nitrofurantoina	$i_d = 18,66 C + 0,01$	0,999
Nitrofurazona	$i_d = 18,90 C + 0,03$	0,999
Furazolidona	$i_d = 18,82 C - 0,01$	0,998
Nifuroxima	$i_d = 19,12 C + 0,03$	0,999

* : n=10

** : Coeficiente de correlación lineal.

constituyentes de la matriz alteran o interfieren la cuantificación de los respectivos analitos en formulaciones farmaceuticas y en orina.

3.4.2. Limites de Detección y de Cuantificación

El límite de detección (LD) de cualquier método analítico está determinado por la concentración mínima de analito que puede ser detectada con un razonable grado de certeza. Por otra parte, la sensibilidad de un método analítico se define como la razón entre la variación en la respuesta instrumental y la concentración de analito, lo cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración (S). De esta forma, los conceptos de LD y S son esencialmente diferentes y usualmente son confundidos.

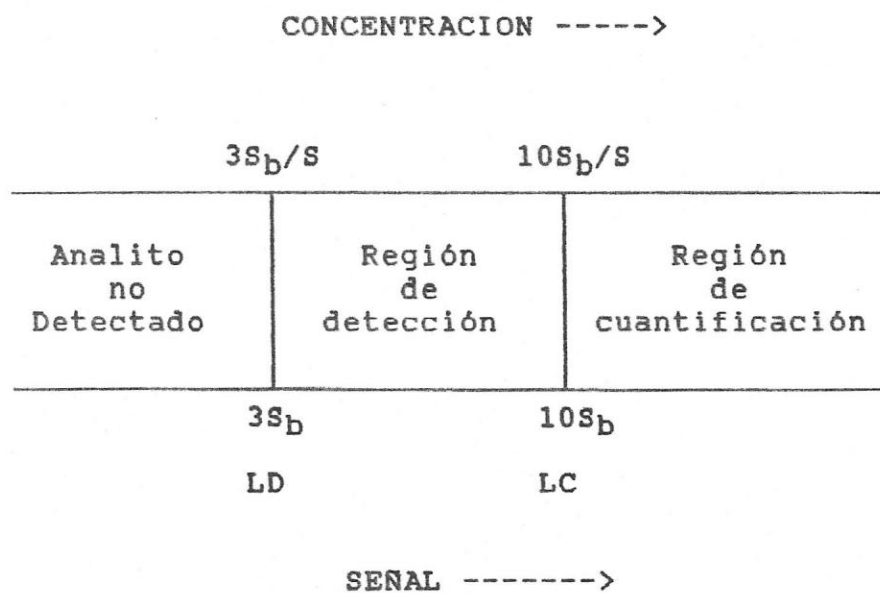
La IUPAC¹⁰³ ha recomendado que el límite de detección, definido en términos de concentración, sea dado por la siguiente expresión:

$$LD = k S_b / S \quad (38)$$

donde k es una constante numérica, S_b es la desviación estándar del blanco de reactivos y S es la sensibilidad del método. Mientras la IUPAC recomienda un valor de $k=3$, otros estudios¹⁰⁴ recomiendan valores más altos, ya que $k=3$ implica

riesgos definidos de un 7% para tomar decisiones falsas positivas (concluir que el analito está presente cuando está ausente) o decisiones falsas negativas (en el caso contrario). Una mayor información con respecto a los niveles de riesgo relacionado a diferentes valores de k pueden obtenerse en los trabajos de Kaiser¹⁰⁵ y Currie.¹⁰⁶

De lo anterior se desprende que como un criterio mínimo, la región de cuantificación de cualquier método analítico debe estar claramente sobre el límite de detección. La American Chemical Society¹⁰⁴, recomienda asignar un valor de $k=10$ para definir el límite de cuantificación (LC). De acuerdo a estas recomendaciones el siguiente esquema ilustra las diferentes regiones donde se puede detectar y cuantificar un respectivo analito por un determinado procedimiento analítico:



Las precedentes definiciones de límites de detección y de cuantificación permiten ahora definir la región de detección y de cuantificación. Esto quiere decir que, a concentraciones mayores que LC el analito puede ser cuantificado por el método. A concentraciones entre el LD y LC sólo se puede detectar la presencia del analito en la muestra, pero no se puede cuantificar. A concentraciones inferiores que LD el analito es indetectable.

Para diez medidas, la desviación estandar del blanco de reactivos o electrolito soporte, calculada a un potencial de -500 mV, es de $5,8 \cdot 10^{-3}$ μ A.

Utilizando los valores de $k=3$ y $k=10$ se calcularon los LD y LC para los compuestos en estudio utilizando polarografía d.c. los cuales se encuentran tabulados en la tabla 12.

Es importante hacer notar que dada la sensibilidad de la polarografía d.c., la cual es ampliamente sobrepasada por las polarografías modernas, los valores de LC permiten la determinación de todos estos compuestos en formulaciones comerciales, farmacéuticas, y agrícolas¹ ya que el contenido de droga presente en las muestras esta muy por sobre los LC.

Se llevó a cabo un análisis del método en dos series de soluciones ($n = 10$) para las drogas puras nitrofurantoina, cloranfenicol, paratión y nitrazepam. En todos los casos la concentración de droga fué 2 μ g/ml para la primera serie y de 40 μ g/ml para la

Tabla 12

Limites de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.) para la determinación de diferentes nitro derivados de importancia biológica mediante polarografía d.c. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Compuesto	L.D./ 10^{-6} M	L.C./ 10^{-6} M
Nitrobenceno	1,28	4,27
p-Nitrofenol	0,910	3,04
Cloranfenicol	1,33	4,44
Paratión	1,30	4,43
DON	1,48	4,95
Nitrazepam	1,33	4,44
Clonazepam	1,36	4,55
Flunitrazepam	1,39	4,64
5-Nitro-2-amino-benzofenona	0,920	3,06
Nitrofurantoína	0,930	3,11
Nitrofurazona	0,920	3,07
Furazolidona	0,920	3,08
Nifuroxima	0,910	3,03

segunda. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 13.

3.5. Aplicaciones Analíticas

3.5.1. Determinación polarográfica de Nitro derivados en formulaciones farmacéuticas

Sobre la base de las condiciones establecidas previamente, varios nitro derivados fueron determinados en fármacos. Los resultados polarográficos de esta determinación se resumen en la tabla 14. Estos resultados indican claramente que los excipientes presentes en las formulaciones no interfieren.

Por otra parte, para sustentar esta afirmación se llevaron a cabo estudios de recuperación donde se realizaron 5 determinaciones independientes de nitrofurantoina en muestras sintéticas que contienen excipientes comunes tales como almidon, lactosa y estereato de magnesio (Tabla 15).

3.5.2. Determinación Polarográfica de Paratión en Tejidos Vegetales

El método fué aplicado a la determinación de paratión en hojas de maiz previamente fumigadas.

Se determino la cantidad de paratión remanente en

Tabla 13

Análisis del método polarográfico en dos series de soluciones de concentración 2 $\mu\text{g/ml}$ y 40 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Concentración/ $\mu\text{g/ml}$				
Compuesto	Agreg.	Encont.*	%	D.E.R
Nitrofurantoína	2,00	1,95	97,5	2,9
Cloranfenicol	2,00	1,94	97,0	2,9
Paratión	2,00	2,07	103,5	3,1
Nitrazepam	2,00	2,08	104,0	3,3

Concentración/ $\mu\text{g/ml}$				
Compuesto	Agreg.	Encontr.*	%	D.E.R.
Nitrofurantoína	40,00	40,20	100,5	0,8
Cloranfenicol	40,00	39,95	99,9	1,0
Paratión	40,00	40,50	101,2	1,0
Nitrazepam	40,00	39,98	99,9	0,9

(*) Valor encontrado promedio de 10 determinaciones
D.E.R. desviación estándar relativa.

Tabla 14

Determinación polarográfica de diferentes nitro derivados en formulaciones farmacéuticas. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Compuesto	Contenido Nominal/mg	Contenido ^a Encontrado/mg	D.E.R. ^b
Cloranfenicol (cápsulas)	250	248,10	1,1
Nitrofurantoína (tabletas)	100	100,14	2,0
Nitrofurazona (sol. oftálmica)	20	19,78	1,4
Furazolidona (tabletas)	100	98,66	1,0
Nitrazepam (tabletas)	5	5,03	3,0
Clonazepam (tabletas)	2	2,05	3,3
Flunitrazepam (tabletas)	2	1,98	3,2
Metronidazol (tabletas)	250	244,50	1,9

(a) Promedio de diez determinaciones.

(b) Desviación estándar relativa.

Tabla 15

Estudio de la recuperación de Nitrofurantoina en muestras sintéticas. Cantidad agregada: 100 mg

Muestra	Cantidad encontrada/mg	Recuperación%
1	99,9	99,9
2	101,0	101,0
3	98,9	98,9
4	100,4	100,4
5	101,1	101,1
Promedio	100,3	100,3
Desv. Estándar	0,9	0,9

las hojas de maíz al segundo día posterior a la fumigación (tabla 16), para lo cual a concentraciones inferiores a 2 $\mu\text{g/ml}$ el electrolito soporte fué utilizado como blanco. En la tabla 17 se muestran los resultados del análisis a los días posteriores a la aplicación del pesticida. Bajo estas condiciones de fumigación, y siendo consecuente con las definiciones adoptadas de LD y LC, el método propuesto permite la cuantificación del pesticida hasta el 6° día. Entre el 6° y 8° día, la señal indica la presencia de paratió, sin embargo sólo se puede asegurar que su concentración es menor que 0,098 mg/g. Posterior al 9° día la señal polarográfica desaparece. Cabe destacar que el tiempo de degradación de paratió debe ser cercano a este periodo, ya que internacionalmente se acepta que diferentes vegetales pueden ser consumidos sólo 15 días después del último tratamiento.

Un tratamiento paralelo a hojas de maíz que no fueron tratadas con paratió indica que los constituyentes de la matriz no dan ninguna señal de interferencia.

Como se discutió anteriormente, la diferencia de $E_{1/2}$ entre paratió y su producto de hidrólisis metabólica pNF ($E_{1/2} = 180 \text{ mV}$) (fig 16) permite la determinación simultánea de ambas especies. Dado que es bastante conocido que paratió tiene incidencia en muertes accidentales o intoxicaciones bastante serias, el método podría ser usado en la determinación de pNF en orina en casos de envenenamiento con paratió.

Tabla 16

Estudio de la cantidad de Paratión remanente en hojas de maiz al segundo día de haber sido fumigadas.

Concentración de Paratión/ $\mu\text{g/ml}$					
Muestra	Encontr.	Agreg.*	Calculado	Determin.	Recup.%
1	2,0	3,2	5,2	5,4	103,8
2	1,8	3,2	5,0	4,8	96,0
3	2,0	3,2	5,2	5,1	98,1
4	1,9	3,2	5,1	5,3	103,9
5	1,6	3,2	4,8	4,7	97,9

(*) Equivalente a 0,2 ml de Paratión $1,0 \cdot 10^{-3}$ M.

Tabla 17

Análisis de Paratión en hojas de maiz previamente fumigadas^a.

Día	id/ μA	Contenido encontrado/ mg/g	DER	E $\frac{1}{2}$ /V
1	0,09	0,153	2,7	-0,32
2	0,08	0,135	2,9	-0,33
3	0,07	0,119	3,5	-0,31
4	0,07	0,119	3,3	-0,32
5	0,06	0,108	3,8	-0,32
6	0,06	0,108	4,0	-0,33
7	0,03	*	*	*
8	0,02	*	*	*
9	**	**	**	**

(a) Promedio de ocho determinaciones.

(*) Valor indeterminado.

(**) No se detecta Paratión.

3.5.3. Determinación polarográfica de nitro derivados en orina

Burmicz y col.⁸ intentaron una determinación polarográfica directa de nitrofurantoína en orina al pH fisiológico 7,4. Al utilizar estos autores tampones BR, encontraron, en el blanco de orina, una amplia onda interferente a un potencial de -0,275 V, la cual se sobrepone a las ondas obtenidas para la droga. Esta interferencia impide la determinación directa de nitrofurantoína en orina, por lo cual no se puede realizar directamente en este medio. Mediante polarografía de pulso diferencial la altura del peak de interferencia fue del orden del 20% de la altura del peak debido al grupo nitro. Por lo tanto, estos autores recomiendan un engorroso procedimiento de extracción de la droga desde la orina. Conklin y Hollifield,^{107,108} en una determinación colorimétrica de nitrofurantoína en orina, encontraron que los solventes con mejor eficiencia en la extracción fueron etilacetato y nitrometano.

Sin embargo existen descritos algunos métodos polarográficos directos para determinar cloranfenicol¹⁰⁹, nitrofurantoína¹¹⁰ y metronidazol¹¹¹ en orina.

En el electrolito soporte de CTMA en presencia de piridina y ácido fórmico es posible realizar la determinación directa en orina de todos ellos. En el blanco

de orina no aparece ninguna señal interferente, lo que confirma que en un medio constituido por el electrolito soporte propuesto en este trabajo, la determinación de nitro derivados en orina sea más rápida y exacta al no involucrar procesos de extracción previos a la determinación electroanalítica.

Los porcentajes de excreción urinaria de cada droga estudiada se muestran en la tabla 18. Estos valores corresponden a la droga excretada en forma inalterada así como a nitrometabolitos.

3.5.4. Límites de Detección y de Cuantificación utilizando Polarografía de Pulso Diferencial

Es conocido que las polarografías modernas, particularmente la polarografía de pulso diferencial, superan ampliamente en sensibilidad a la polarografía clásica. Como es natural, al utilizar polarografía de pulso diferencial, los límites de detección y de cuantificación del método pueden ser mejorados notablemente (Tabla 19), debido a que esta técnica discrimina entre la corriente faradaica, producto de la transferencia de electrones, y la corriente de carga o capacitiva.

Al llegar a los límites de detección del método cuando se usa polarografía clásica, la señal referente a la recuperación de droga en la orina comienza a desaparecer.

Tabla 18

Porcentaje de excreción urinaria de nitro derivados en muestras de orina obtenidas a diferentes intervalos de tiempo despues de la administración de una dosis única de droga

Nitrofurantoina, Dosis 100 mg			
Tiempo/h	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
2	20	30	39
10	40	49	53
24	70	68	73
36	73	70	73
48	--	--	--
Furazolidona, Dosis 100 mg			
2	8	10	8
10	20	22	25
18	25	27	25
24	--	--	--
Cloranfenicol, 250 mg			
10	5	4	6
24	12	10	12
36	15	12	21
48	20	22	25
72	--	--	--
Metronidazol, 250 mg			
2	3	2	3
24	18	19	20
72	51	40	45
120	70	62	65
132	--	--	--

No obstante, cuando se usó pulso diferencial, como señal de excitación, se logró detectar concentraciones de droga en orina en el orden de 10^{-7} M.

Dada la gran definición de los polarogramas obtenidos en el electrolito soporte propuesto en este trabajo, ha sido posible determinar especies con gran selectividad y sensibilidad, ya sea utilizando polarografía clásica o de pulso diferencial.

3.5.5. Determinaciones Simultáneas de Nitro Derivados

Dado que la reducción de los compuestos 5-nitrofuranos ocurre a potenciales más negativos que los de otros nitro compuestos utilizados comunmente como agentes terapéuticos, tales como cloranfenicol, tinidazol, metronidazol, y las 7-nitrobenzodiazepinas, fué posible llevar a cabo determinaciones simultaneas de diferentes drogas, siempre que las diferencias en los potenciales de media onda sean superiores a 100 mV. Estas determinaciones simultaneas pueden llevarse a cabo mediante polarografía d.c. (figs 16,29,37-39) o polarografía de pulso diferencial (fig 40) dependiendo de los niveles de concentración del analito. Particularmente interesante resultó la posibilidad de determinar simultáneamente cloranfenicol y nitrofuranos, ya que en muchos casos estas drogas se prescriben simultaneamente. Este tipo de determinaciones se logró en muestras de orina.

Tabla 19

Límites de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.) para la determinación de diferentes nitro derivados de importancia biológica mediante polarografía de pulso diferencial. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5.

Compuesto	L.D./ 10^{-8} M	L.C./ 10^{-8} M
Nitrobenceno	5,11	17,1
p-Nitrofenol	2,37	7,91
Cloranfenicol	5,41	18,0
Paratión	5,47	18,2
DON	6,17	20,6
Nitrazepam	5,53	18,4
Clonazepam	5,86	19,5
Flunitrazepam	6,08	20,3
5-Nitro-2-Amino- benzofenona	2,34	7,79
Nitrofurantoina	2,51	8,36
Nitrofurazona	2,48	8,27
Furazolidona	2,49	8,29
Nifuroxima	2,48	8,26

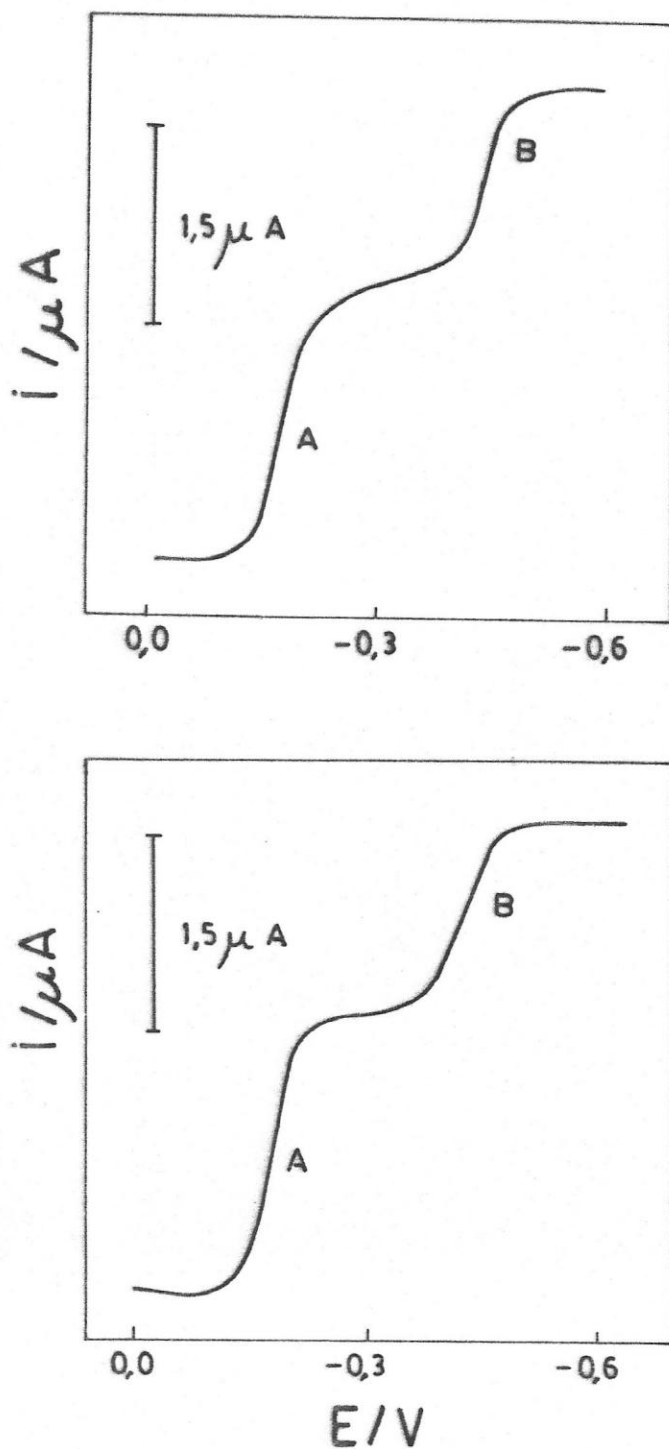


Figura 37.- Ondas de reducción polarográficas de Furazolidona y cloranfenicol a la misma concentración de 0,122 mM. Otras condiciones como en la Fig.6 . (A) Furazolidona; $E_{1/2}$ -0,17; i_d 2,09 μA . (B) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,41 V; i_d 1,42 μA .

Figura 38.-Ondas de reducción polarográficas de nitrofurazona y cloranfenicol a la misma concentración de 0,122 mM. (A) Nitrofurazona; $E_{1/2}$ -0,18 V; i_d 2,10 μA . (B) Cloranfenicol; $E_{1/2}$ -0,41 V; i_d 1,42 μA .

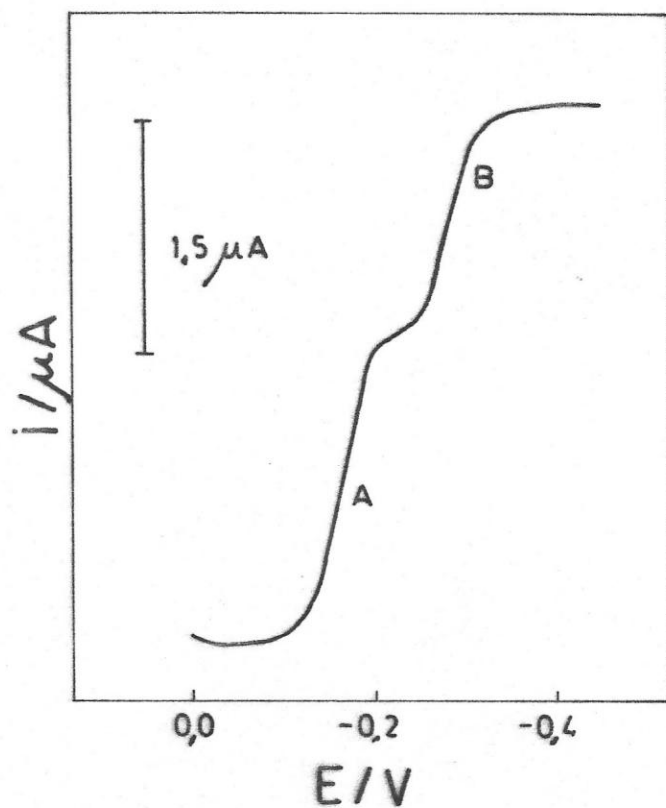


Figura 39.- Ondas de reducción polarográficas de Furazolidona y Clonazepam a la misma concentración de 0,122 mM. (A) Furazolidona; $E_{1/2}$ -0,17 V; i_d 2,07 μA . (B) Clonazepam; $E_{1/2}$ -0,28 V; i_d 1,43 μA .

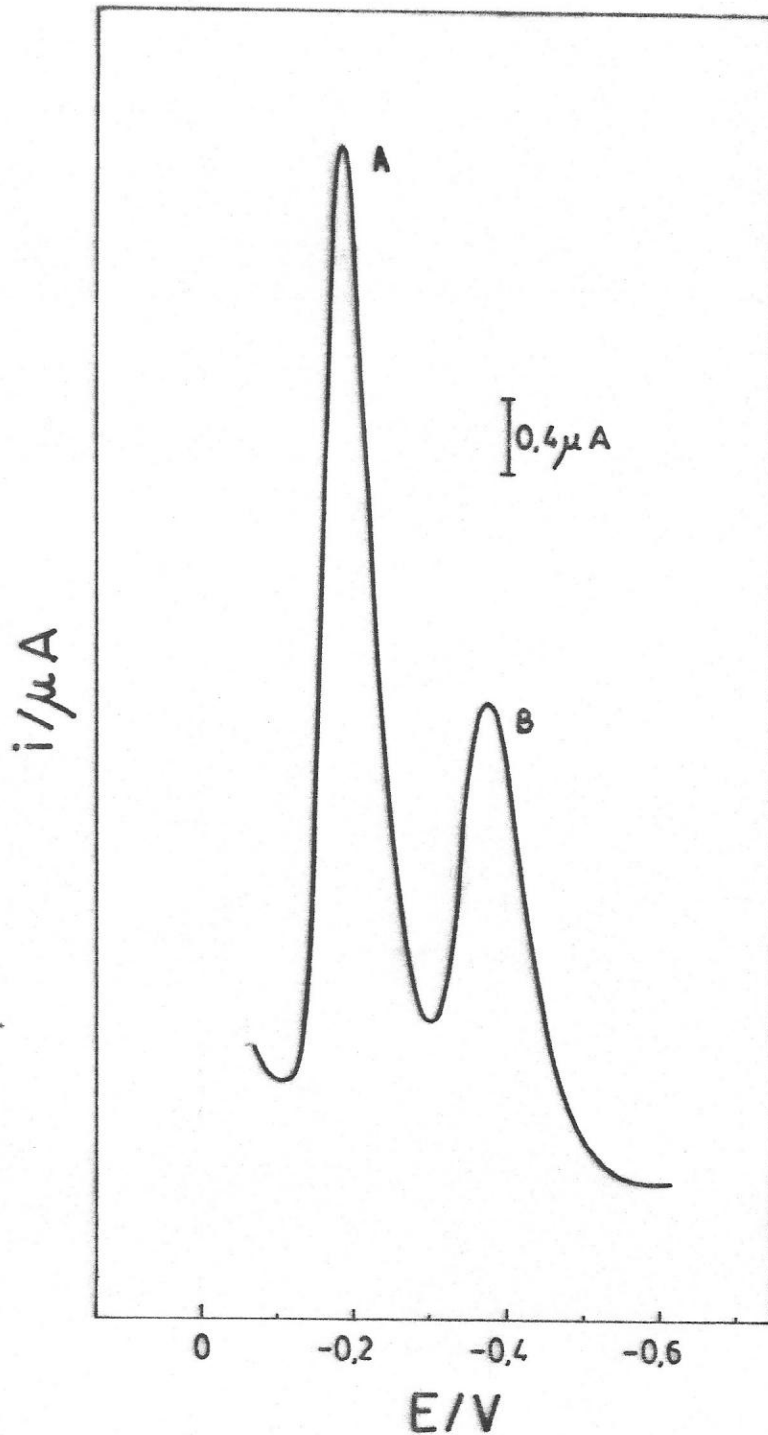


Figura 40.- Polarogramas de pulso diferencial de Nitrofurantoina y cloranfenicol a la misma concentración de 0,037 mM. Electrolito soporte, CTMA-piridina-ácido fórmico, pH 4,5. Tiempo de goteo, 1 s; Amplitud de pulso, 50 mV; velocidad de barrido, 5 mV/s. (A) Nitrofurantoina; E_p -0,18 V; i_p 4,96 μA . (B) Coranfenicol; E_p -0,42 V; i_p 2,32 μA .

4. Conclusiones

El presente trabajo logra, a través del uso de técnicas electroanalíticas, dilucidar los procesos electródicos que experimentan diferentes nitro derivados de importancia biológica.

En un sistema tampónico de piridina y ácido fórmico, en el rango ácido, todos los compuestos analizados son reducidos en una única onda irreversible y controlada por difusión, cuya altura y potencial de media onda son dependientes del pH. Las ondas polarográficas mejor definidas para propósitos analíticos fueron, en general, obtenidas a $\text{pH} < 5,5$.

La irreversibilidad del proceso electródico para la reducción del grupo nitro se debe a la lenta transferencia de electrones en el paso nitro \rightarrow nitroso derivado. Se determinó que la estequiometría para la etapa determinante de la reacción corresponde, en todos los casos, a la formación del intermediario nitroso en un proceso a dos electrones. La formación de este intermediario en el curso del proceso electródico fué verificada por voltametría cíclica. Sin embargo, como su potencial de reducción es más positivo que el correspondiente al grupo nitro el nitroso derivado no puede ser detectado por polarografía ni por

electrólisis a potencial controlado.

Cuando existe la posibilidad de una reducción a seis electrones del grupo nitro, ésta se lleva a cabo por un mecanismo ECE. En este proceso se genera, mediante una reacción química de deshidratación, un intermediario imina el cual se reduce al mismo potencial al cual es formado.

En este estudio queda de manifiesto que una reducción a seis electrones hasta amina primaria es gobernada por la naturaleza y posición de los sustituyentes con respecto al grupo nitro. Sustituyentes donores que poseen electrones π disponibles, determinan la transformación de la hidroxilamina en amina via formación de un intermediario imina en una reacción química acoplada. Por el contrario, compuestos que presentan sustituyentes sin propiedades donoras, sólo son reducidos hasta hidroxilamina en un proceso a cuatro electrones.

En el electrolito soporte propuesto, a base de una solución de cloruro de tetrametilamonio, piridina y ácido fórmico las ondas obtenidas fueron muy bien definidas y se logró realizar una serie de determinaciones de nitro derivados en diversas matrices. No se observó interacciones químicas entre los constituyentes del amortiguador y las sustancias electroactivas, excepto en la oxidación de los productos de reducción de los derivados 2-amino-5-nitrobenzofenona donde queda claramente establecida una reacción química en que participa la piridina como agente

nucleofílico.

Este trabajo ofrece un rápido y sensible método de análisis para compuestos nitro derivados. El método fue aplicado a la determinación de diferentes drogas en formulaciones farmacéuticas, orina y a la determinación del pesticida paratión en hojas de maíz. Todas las determinaciones fueron realizadas directamente, sin consumo de tiempo en separaciones previas. Además, dada la buena definición de las ondas polarográficas y la diferencia de los potenciales de media onda de diferentes pares de compuestos, este electrolito soporte permitió llevar a cabo determinaciones simultáneas de nitro derivados ya sea usando polarografía de pulso diferencial o polarografía d.c.

5. Referencias

1. Bersier, P.M., y Bersier, J., *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1985, 16, 15-128.
2. Bersier, P.M., *Anal. Proc.*, 1987, 24, 44-49.
3. Bersier, P.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1983, 1, 475-490.
4. Whittaker, J.W., Chan, C., y Levine, S.L., *Am. Lab.*, 1983, 15, 79.
5. Vignoli, L., Cristau, B., Gouezo, F., y Fabre, C., *Chim. Anal.(Paris)*, 1963, 45, 439.
6. *ibid*, 1963, 45, 499.
7. Mishra, A.K., y Gode, K.D., *Analyst*, 1985, 110, 1373.
8. Burmicz, J.S., Smyth, W.F., y Palmer, R.F., *Analyst*, 1976, 101, 986.
9. Hess, G.B., *Anal. Chem.*, 1950, 22, 649.
10. Chodkowski, J., y Gralewska-Ludwicka, D., *Pol. J. Chem.*, 1980, 54, 567.
11. Halvorsen, S., y Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1972, 59, 127.
12. Mishra, A.K., y Gode, K.D., *Analyst*, 1985, 110, 31.
13. Pfliegel, P., *Pharmazie*, 1973, 28, 483.
14. Pfliegel, P. y Shoukrallah, I., *ibid*, 1974, 29, 316.
15. Dumanovic, D., Volke, J., y Jovanovic, R., *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, 1971, 54, 882.
16. Dumanovic, D., Volke, J., y Vajgand, U., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1966, 18, 507.
17. Slamnik, M., *J. Pharm. Sci.*, 1976, 65, 736.
18. Browne, J.T., in "Polarography of Molecules of

- Biological Significance", Smyth, W.F., Editor, Academic Press, 1979, pp. 111-125.
19. Meites, L., Campbell, B.H., y Zuman, P., *Talanta*, 1977, 24, 709.
 20. Chien, Y.W., *J. Pharm. Sci.*, 1976, 65, 1471.
 21. Edwards, D.I., Dye, M., y Carne, H., *J. Gen. Micro.*, 1973, 76, 135.
 22. Chien, Y.W., y Mizuba, S.S., *J. Med. Chem.*, 1978, 21, 374.
 23. Koch, R. L., y Goldman, P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1979, 208, 406.
 24. American Hospital Formulary Service (AHFS), "Drug Information," Editorial Staff, Mc Evoy, G. K., Editor, 1990, p. 175-178
 25. Bowen, C.V., y Edwards, F.L., *Anal. Chem.*, 1950, 22, 706.
 26. Koen, J.G., Huber, J.F.K., *Anal. Chim. Acta*, 1970, 51, 303.
 27. Zietek, M., *Mikrochim. Acta*, 1976, 2, 549.
 28. *ibid*, 1976, 2, 463.
 29. Shulgin, A.T., in Iversen, L.L., y Snyder, S.H., Editors., "Handbook of Psicopharmacology," Vol 11, Plenum Press, New York, 1978, p. 243.
 30. Coutts, R.T., y Malickly, J.L., *Can. J. Chem.*, 1973, 51, 1402.
 31. Gómez, J.S., Morales, D., Cassels, B., y Saavedra, J.C., *Quant. Struct. Act. Relat.*, 1986, 5, 153.
 32. Gómez, J.S., Cassels, B., y Saavedra, J.C., *Eur. J. Med. Chem.*, 1987, 22, 433.
 33. American Hospital Formulary Service, *Opcit*, 1988, pp.1231-1235.
 34. Blum, J.E., Haefely, W., Jalfre, M., Polc, P., y Schaerer, K., *Arzneim.-Forsch.*, 1973, 23, 377.
 35. "Martindale, The Extra Pharmacopoeia," 27th Edition, Pharmaceutical Press, London, 1977, p. 766.

36. Schuler, M., Gaillard, J.M., y Tissot, R., *Psychopharmacologia*, 1972, 27, 123.
37. Kruse, R., *Epilepsia*, 1971, 12, 179.
38. Rieder, J., *Arzneim.-Forsch*, 1965, 15, 1134.
39. Eschenhof, E., *ibid*, 1973, 23, 390.
40. American Hospital Formulary Service, *Opcit*, 1990, pp. 438-439, 452-454, 2031-2032.
41. Mc Calla, D.R., Reuvers, A., y Kaiser, C., *Cancer Res.*, 1971, 31, 2184.
42. Glenon, R.A., Young, R., Benington, F., y Morin, R.D., *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 1163.
43. Sternbach, L. H., Ian Fryer, R., Metlesics, W., Sach, G., y Stempel, A., *J. Org. Chem.*, 1962, 27, 3781.
44. Spritzer, K.S., Costa, J.M., y Elving, P.J., *Anal. Chem.*, 1965, 37, 211.
45. Morales, A., Toral, M.I., y Richter, P., *Analyst*, 1984, 109, 633.
46. Richter, P., Morales, A., y Lahsen, J., *Analyst*, 1990, 115, 409.
47. Pezzatini, G., y Guidelli, R., *J. Electroanal. Chem.*, 1979, 102, 205.
48. Meites, L., Editor, "Polarographic Techniques," Interscience, New York, 1965, p. 289.
49. Elving, P.J., *Pure Appl. Chem.*, 1963, 7, 423.
50. Zuman, P., "The Elucidation of Organic Electrode Processes," Academic Press, New York, 1969, p. 22.
51. Heyrovsky, J., y Kuta, J., "Principles of Polarography," Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1965, p. 257.
52. Albery, W.J., Chadwick, A.T., Coles, B.A., y Hampson, N.A., *J. Electroanal. Chem.*, 1977, 75, 229.
53. Rubinstein, I., *ibid*, 1985, 183, 379.
54. Nicholson, R.S., y Shain, I., *Anal. Chem.*, 1964, 36, 706.

55. Fossdal, K., y Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1971, 56, 105.
56. Pearson, J., *Trans. Faraday Soc.*, 1948, 44, 683.
57. Vijayalakshamma, S.K., y Subrahmanya, R.S., *J. Electroanal. Chem.*, 1969, 23, 99.
58. Heyrovsky, M., Vavricka, S., Holleck, L., y Kastening, B., *J. Electroanal. Chem.*, 1970, 26, 399.
59. Fleet, B., y Zuman, P., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1967, 32, 2066.
60. Zuman, P., *Opcit*, 1969, p. 114.
61. Hoffman, A.K., Hodgson, W.G., Maricle, D.L., y Jura, W.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 631.
62. Stocesova, D., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1949, 14, 615.
63. Zuman, P., *Opcit*, 1969, p. 42.
64. Mairanowskii, S.G., in "Progress in Electrochemistry of Organic Compounds" Frankin, A.N., Ersher, A.B., Eds. Plenum Press, 1971, p.85.
65. Meites, L., *Opcit*, 1965, p. 245.
66. Bard, A.J., y Faulkner, L.R., "Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications," Wiley, New York, 1980.
67. Testa, A.C., y Reinmuth, H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 784.
68. Alberts, G.S., y Shain, I., *Anal. Chem.*, 1963, 35, 1859.
69. Hess, G.B., *Anal. Chem.*, 1950, 22, 649.
70. Russu, C., Cruceanu, I., Monciu, D., y Barcaru, V., *Farmaco, Ed. Prat.*, 1965, 20, 22.
71. Summa, F., *J. Pharm. Sci.*, 1965, 54, 442.
72. Brooks, M.A., in Kissinger, P.T., y Heineman, W.R., Editors, "Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry," Dekker, New York, 1984, p. 586.
73. Smyth, M.R., y Osteryoung, J.G., *Anal. Chim. Acta*, 1978, 96, 335.

74. Toral, M.I., Richter, P., y Miranda, A., Anal. Quim., 1990, 86, 461.
75. Richter, P., Morales, A., Gómez, J.S., y Morales, D., Analyst, 1988, 113, 859.
76. Senkowski, B.Z., Levin, M.S., Urbigkit, J.R., y Wollish, E.G., Anal. Chem., 1964, 36, 1991.
77. Oelschlager, H., Volke, J., Lim, G.T., y Bremer, U., Arch. Pharm., Berl., 1970, 303, 364.
78. Clifford, J.M., y Smyth, W.F., Z. Anal. Chem., 1973, 264, 149.
79. Barrett, J., Smyth, W.F., y Hart, J.P., J. Pharm. Pharmacol., 1974, 26, 9.
80. Goldsmith, A., Jenkins, H.A., Grant, J., y Smyth, W.F., Anal. Chim. Acta, 1973, 66, 427.
81. Smyth, W.F., Smyth, M.R., Groves, J.A., y Tan, S.B., Analyst, 1978, 103, 497.
82. Groves, J.A., y Smyth, W.F., Analyst, 1981, 106, 890.
83. Bishop, E., y Hussein, W., Analyst, 1984, 109, 759.
84. Jacobsen, E., y Jacobsen, T.V., Anal. Chim. Acta, 1971, 55, 293.
85. Oelschlager, H., Volke, J., Lim, G.T., y Frank, V., ibid, 1966, 16, 82.
86. Mishra, A.K., y Gode, K.D., Analyst, 1985, 110, 1105.
87. Schofield, K., "Heteroaromatic Nitrogen Compounds," Plenum Press, New York, 1967, p. 194.
88. Slamnik., M., Talanta, 1974, 21, 960.
89. Fricke, F.L., Keppel, G.E., y Hart, S.M., J. Assoc. Agr. Chemists, 1964, 47, 788.
90. Chodkowski, J., y Gralewska, D., Pol. J. Chem., 1980, 54, 576.
91. Kemula, W., y Zawadowska, J., Bull. Acad. Pol. Sci., 1968, 16, 419.
92. ibid, 1969, 17, 599.

93. Bodini, M.E., López-Fonseca, J.M., y Arce, F., Bull. Electrochem., 1990, 6, 802.
94. Stradins, J.P., y Reikhmanis, G.O., Electrokhim., 1967, 3, 178. Chem. Abstr., 1967, 66, 101084y.
95. Stradins, J.P., Gavars, R., Reikhmanis, G., y Hiller, S., Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 1966, 4, 601. Chem. Abstr., 1967, 66, 111011m.
96. Zuman, P., Microchem. J., 1987, 36, 255.
97. Herret, R.J., y Buzard, J.A., Anal. Chem., 1960, 32, 1676.
98. Ryan, J.J., Lee, Y.C., Du Pont, J.A., y Charbonneau, C.F., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1975, 58, 1227.
99. Sudgen, E.A., MacIntosh, A.I., y Vilim, A.B., *ibid*, 1983, 66, 874.
100. MacIntosh, A.I., y Neville, G.A., *ibid*, 1984, 67, 958.
101. Patriarche, G.J., y Vire, J.C., Anal. Chim. Acta, 1987, 196, 193.
102. Squella, J.A., Barnafi, E., Perna, S., y Nuñez-Vergara, L.J., Talanta, 1989, 36, 363.
103. RSC, Analytical Methods Committee, Analyst, 1987, 112, 199.
104. ACS, Committee on Environmental Improvement, Anal. Chem., 1980, 52, 2242.
105. Kaiser, H.H., *ibid*, 1970, 42, 26A.
106. Currie, L.A., *ibid*, 1968, 40, 586.
107. Conklin, J.D., y Hollifield, R.D., Clin. Chem., 1965, 11, 425.
108. *ibid*, 1966, 12, 69.
109. Brezina y Zuman, P., "Polarography in medicine Biochemistry and Pharmacy" Interscience, Chichester y N. York, 1958, p.321.
110. Mason, W.D. y Sandman, B., J. Pharm. Sci., 1976, 65, 599
111. Kane, P.O., J. Polarog. Soc., 1961, 8, 58.

Parte de este trabajo de tesis ha sido publicado en los siguientes artículos:

- Polarographic Behaviour and Determination of Nitrofurantoin, Chloramphenicol and Related Compounds.

Morales, A., Toral, M.I., and Richter, P.

Analyst, 1984, 109, 633.

- Voltammetric Behaviour of Nitrofurazone, Furazolidone and Other Nitro Derivatives of Biological Importance.

Morales, A., Richter, P., and Toral, M.I.

Analyst, 1987, 112, 965.

- Polarographic Determination of Nitrofurazone and Furazolidone in Pharmaceutical Formulations and Urine.

Morales, A., Richter, P., and Toral, M.I.

Analyst, 1987, 112, 971.

- Electrochemical Study of the Hallucinogen (\pm)-1-(2,5-dimethoxy-4-nitrophenyl)-2-Aminopropane.

Richter, P., Morales, A., Gomez, J., Morales, D.

Analyst, 1988, 113, 859.

- Electrochemical Reduction Mechanism and Polarographic Determination of Parathion.

Toral, M.I., Richter, P., and Miranda, A.

An. Quim. Ser. B, En prensa

- Voltammetric Study of 7-Nitro-1,4-benzodiazepin-2-ones and Their Acid Hydrolysis Products, 2-Amino-5-nitrobenzophenones

Richter, P., Morales, A., and Lahsen, J.

Analyst, 1990, 115, 409.

Polarographic Behaviour and Determination of Nitrofurantoin, Chloramphenicol and Related Compounds

Alfonso Morales, Maria I. Toral and Pablo Richter

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Casilla 653, Santiago, Chile

The polarographic behaviour of nitrofurantoin and chloramphenicol have been studied in pyridine - formic acid buffer and tetramethylammonium chloride solution at pH 4.3. The E_p versus pH and i_{lim} versus pH relationships show that the E_p values are pH dependent and that the current is independent of pH except when acid - base equilibria affect it. The difference in E_p values (230 mV) makes simultaneous determination possible. Simultaneous determinations of both drugs were performed in a concentration range suitable for application to pharmaceutical formulations and body fluids. Other nitro derivatives can also be determined without interference. The standard additions technique provided results as satisfactory as the use of a calibration graph. The proposed method has the advantage over previously used electrochemical methods of not requiring prior separations.

Keywords: Nitrofurantoin determination; chloramphenicol determination; polarography; pharmaceutical formulations; urine

All of the available polarographic methods for the determination of nitrofurantoin, chloramphenicol and other nitro derivatives are based on the facility of reduction of the nitro group. However, compounds having the same electroactive group often interfere mutually when they are present together in samples. A brief survey of the literature indicates that polarography has been applied over the years to determine these drugs in pharmaceutical preparations or in body fluids in which one of them is the only reducible species.¹⁻⁶ Further, the variable number of reduction waves described for each compound, depending on the supporting electrolyte, pH and maximum suppressors employed, illustrate the complexity of the electrode reactions involved.

This paper reports a polarographic study of nitrofurantoin, chloramphenicol and related compounds and a method is suggested for their determination with enhanced selectivity.

Experimental

Reagents

All chemicals used were AnalaR-grade reagents.

Nitrofurantoin USP and chloramphenicol RS (Reference Standard) were used for basic studies. Standard solutions (10^{-2} – 10^{-3} M) were prepared in pyridine. Stock solutions of *p*-nitrophenol and chloramphenicol in either ethanol - water mixture or pyridine were also prepared. Capsules and tablets containing these drugs were dissolved in pyridine and assayed polarographically. Gelatin solution (0.5%) was used as a maximum suppressor.

The supporting electrolyte was prepared by diluting 20 ml of pyridine (12.3 M) and 10 ml of formic acid (98–100%) with 120 ml of 0.1 M tetramethylammonium chloride (TMAC) solution. The resulting solution had a pH of 4.3. On varying the ratio of formic acid to pyridine the pH changed from 2.6 to 5.1. Extension of the pH range was achieved by using dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Techniques

Aliquots of the stock solutions were diluted with the supporting electrolyte, de-oxygenated with oxygen-free nitrogen and subjected to polarography in the d.c. mode using a Polariter PO4 instrument (Radiometer). A saturated calomel electrode was used as the reference electrode. The mercury flow-rate, m , and the drop-time, t , were determined at various heights of the mercury column, h . This was repeated for several

concentrations and the value ih^{-1} was constant. A linear dependence of the limiting current on depolariser concentration was established.

The effect of pH in the range 1–14 on the half-wave potential and limiting current for nitrofurantoin and chloramphenicol at a concentration 0.125 mM was studied. From these polarographic data, the optimum pH for determination of the drugs was chosen.

Aliquots of the pure drug solutions were serially diluted with the supporting electrolyte and polarographed and the results were used in the construction of calibration graphs. For the graphs of limiting current versus concentration, the standard additions method was alternatively employed when a solvent other than pyridine was used.

The precision of the method was checked with solutions of similar concentration and the standard deviation of the ratio of diffusion current (i_d) to sample mass was found to be satisfactory. The method was applied to the analysis of individual formulations containing nitrofurantoin (I) and chloramphenicol (II) by reference to the calibration graphs. The same procedure was used for urine without modification. Calibration graphs were obtained by adding known amounts of these drugs to blank urine.

Determination of I and II in Pharmaceutical Formulations

Tablet formulations containing a nominal 100 mg of compound I in a total tablet mass of approximately 210 mg were analysed in order to examine the applicability of the method. Not less than ten tablets were thoroughly ground and mixed. Portions equivalent to about 20 mg of I were accurately weighed, dissolved in pyridine and transferred into separate 10-ml calibrated flasks. The contents were allowed to settle after shaking. A 0.1-ml aliquot of the clear supernatant liquor was diluted to 25 ml with the supporting electrolyte and a portion of this solution subjected to polarography. The amount of I in the portion of the sample taken was calculated by reference to the calibration graph. A similar method of quality control on simple capsules containing a nominal 250 mg of II in a total mass of approximately 300 mg was attempted.

Determination of I in Urine

A calibration graph was constructed in accordance with the limits at which the unchanged drug is excreted. Different amounts of I were added to a fixed volume of urine. Aliquots

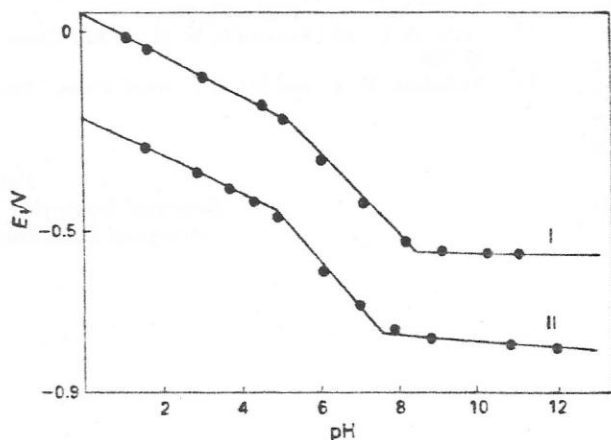
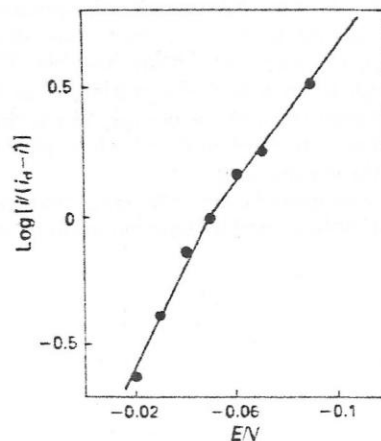
Table 2. Effect of chloramphenicol, *p*-nitrophenol and nitrofurantoin concentrations on the i_d values

Concn. (c) $\times 10^{-6}/M^*$	Chloramphenicol		<i>p</i> -Nitrophenol		Concn. (c) $\times 10^{-6}/M$	Nitrofurantoin	
	$i_d/\mu A$	i_d/c	$i_d/\mu A$	i_d/c		$i_d/\mu A$	i_d/c
1.24	0.018	14.52	0.024	19.35	1.25	0.023	18.40
2.44	0.032	13.11	0.045	18.44	2.5	0.049	19.60
5.88	0.079	13.44	0.115	19.56	6.25	0.116	18.56
12.4	0.162	13.06	0.23	18.55	12.5	0.235	18.80
24.4	0.32	13.11	0.47	19.26	25.0	0.48	19.20
58.8	0.77	13.10	1.15	19.56	62.5	1.18	18.88
124	1.62	13.06	2.38	19.19	125	2.43	19.44
244	3.12	12.79	4.61	18.89	250	4.75	19.00
588	7.78	13.23	11.2	19.05	625	12.0	19.20

* These concentrations apply to both chloramphenicol and *p*-nitrophenol.

Table 3. Equations of the half-wave potentials of I and II at different pH values. The first term of each equation is the slope of the line and the second is the intercept of the line with the potential axis. Substitution of the appropriate pH value will give the E_1 value at that pH

Nitrofurantoin		Chloramphenicol	
pH	Equation	pH	Equation
0-5.02	$-0.049 \text{ pH} + 0.031$	0-4.90	$-0.051 \text{ pH} - 0.208$
5.02-8.26	$-0.101 \text{ pH} + 0.29$	4.90-7.55	$-0.114 \text{ pH} + 0.103$
8.26-14	$-0.0034 \text{ pH} - 0.514$	7.55-14	$-0.0075 \text{ pH} - 0.710$

**Fig. 3.** Variation of E_1 with pH. I, Nitrofurantoin; and II, chloramphenicol**Fig. 4.** Logarithmic analysis of the nitrofurantoin wave at pH 2.6. Slopes 50 and 77 mV

Variation of E_1 and i_{lim} with pH

The half-wave reduction potentials for I and II become more negative with increasing pH. The E_1 versus pH graphs (Fig. 3) show three intersecting linear sections so that it is not possible to express them in terms of only one equation. The equations that describe the variations of E_1 with pH were deduced from the graphs and are given in Table 3. The slight decrease in current observed for I at pH 2.6 is probably associated with the acid-base properties of its two cationic forms.⁴ Further, the $\log[i/(i_d - i)]$ versus E graph at this pH has two linear portions, indicating that two reactions are occurring (Fig. 4). Above pH 5 the wave slowly begins to decay for both compounds and the first break on the E_1 versus pH graph (Fig. 3) relates to the pH at which the hydroxylamine intermediate in the reduction of the nitro group is no longer protonated and therefore cannot be easily reduced. At about pH 8, the current falls sharply and the wave breaks up into two waves. This fall is accompanied by a change in the slope of the E_1 versus pH graph (Fig. 3), indicating that an acid-base equilibrium can affect the reduction mechanism of the molecule as a whole. For I the current became constant in both E_1 and i_{lim} above pH 11, which suggests a pK value probably associated with the above-mentioned acid-base equilibrium that occurs at pH 8.

The second ill-defined and highly irreversible wave was also unaltered in the values of E_1 and of limiting current over the pH range 11-14. The pK_a values obtained polarographically compare reasonably well with those determined by UV spectrophotometry, indicating that nitrofurantoin exists in four different forms.⁴ For all these compounds, including *p*-nitrophenol, the best defined and differentiated waves for analytical purposes were obtained at pH \leq pK₁.

The number of protons (p) involved in the rate-determining step of the electrode reaction is given by

$$\Delta E_{1/2}/\Delta \text{pH} = -0.059p/\alpha n_a$$

where α is the transfer coefficient. The value of αn_a for the irreversible process was calculated from the equation

$$E = E_{1/2} - (0.059/\alpha n_a) \log [i/(i_d - i)]$$

The αn_a and p values corresponding to the rate-determining step of the reaction were calculated at different pH values. At pH 4.3 an αn_a value of 1.14 and a p value of 0.98 were calculated for I. Values of αn_a lying between 1 and 2 suggest that two electrons take part in the rate-determining step of the electrode reaction. The half-wave potential indicates some nitroso character, while the easy reduction in a single wave may be a consequence of the rapid elimination of water from

Voltammetric Behaviour of Nitrofurazone, Furazolidone and Other Nitro Derivatives of Biological Importance

Alfonso Morales, Pablo Richter and M. Inés Toral

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, Las Palmeras 3425, P.O. Box 653, Santiago, Chile

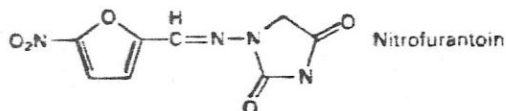
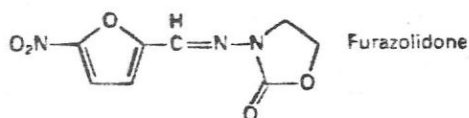
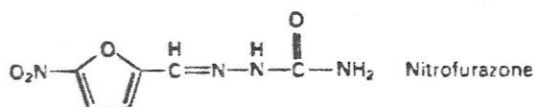
In pyridine - formic acid buffer and tetramethylammonium chloride solution of pH 4.5 at a dropping mercury or a glassy carbon electrode, nitrofurazone, furazolidone and nitrofurantoin are reduced in a single six-electron wave, while chloramphenicol and other structurally related nitro derivatives are reduced in only one four-electron wave, the nitro group being reduced to the amine or to the hydroxylamine, respectively. The electrochemical behaviour of these compounds depends mainly on the nature and position of the substituents. Reduction to the primary amine occurs when the substituents possess available π electrons to conjugate with the nitro group of the aromatic ring, which determines the transformation of the hydroxylamine into the amine via formation of a highly reducible intermediate imine or a quinonoid structure. In contrast, if the formation of the intermediate imine is made impossible by an adverse effect of the substituent, the hydroxylamine does not undergo further reduction.

Cyclic voltammograms were recorded at different pH values and at different scan rates in order to identify certain relatively unstable species. The effect of pH on the diffusion-limited current and on the E_p values of the polarographic waves was also studied and the results obtained were compared with those obtained by cyclic voltammetry.

On this basis, and according to the polarographic and cyclic voltammetric data, a reduction mechanism for the nitrofurans derivatives is suggested, in which the importance of the homogeneous chemical reactions associated with the electron-transfer steps is examined.

Keywords: Nitrofurazone, furazolidone and chloramphenicol; nitro derivatives of 1,4-benzodiazepines; polarography; cyclic voltammetry

Nitrofurazone (I), furazolidone (II) and nitrofurantoin (III) are structurally related, with a nitro group at the 5-position on the furan ring. The electrochemical behaviour of these nitrofurans and other aromatic nitro derivatives such as chloramphenicol, clonazepam, nitrazepam, flunitrazepam and parathion is based on the ease of reduction of the nitro group at a dropping mercury or solid electrode.



Polarography has been widely used in order to elucidate the reduction mechanism at a dropping mercury electrode and to investigate the resemblance with the metabolic pathway for the biological degradation of these nitro derivatives. These compounds are generally metabolised *in vivo* to the corresponding amines via nitroso and hydroxylamine intermediates. However, the polarographic techniques cannot determine these metabolites owing to the ill-defined reduction wave of the hydroxylamine, the inability of the amine group to react at the dropping mercury electrode and because the

reduction of the nitroso group to hydroxylamine occurs at a more positive potential than the reduction potential of the nitro group to hydroxylamine, and consequently that reduction wave is not detected. Further, the variable number of reduction waves for each compound, depending on the supporting electrolyte, pH and maximum suppressors employed, illustrates the complexity of the electrode processes involved. In Britton - Robinson buffer at pH values below 5, the nitro group of the nitrofurantoin is reduced to hydroxylamine in a four-electron process and subsequently to the amine in a two-electron process.¹ Similarly, nitrofurazone shows a two-step reduction wave in different supporting electrolytes, the second wave being attributed to a simultaneous reduction of the hydroxylamine and the azomethine group.²

The determination of some nitrated heterocyclic compounds containing similar types of reduction sites to that of nitrofurazone was studied earlier by Vignoli *et al.*,³ using a Britton - Robinson buffer of pH between 1.81 and 11.98. They observed two waves for the reduction of the nitro group and three waves at lower pH values when the compounds had a substituted imino group.

A polarographic method has been used to determine furazolidone in feed pre-mixes,⁴ but little attention has been paid to the electrochemical behaviour of this compound.

In previous polarographic work⁵ in which a solvent - buffer system containing pyridine and formic acid in conjunction with tetramethylammonium chloride solution was used as the supporting electrolyte, it was found that the nitro group of the nitrofurantoin shows only one reduction wave corresponding to a six-electron process, and that chloramphenicol and other structurally related compounds are reduced in a single four-electron wave.

The aim of this work was to study the electrochemical behaviour of molecules having the same electroactive group in order to elucidate the effects of the nature and position of the substituents on the reduction. Significant aspects involved in

Table 1. Voltammetric data for reduction of I and II in pyridine - formic acid with TMAC as supporting electrolyte

Compound	Scan rate/ V s ⁻¹	<i>i_p</i> /μA	<i>i_p</i> /Cv ^{1/2}	Compound	Scan rate/ V s ⁻¹	<i>i_p</i> /μA	<i>i_p</i> /Cv ^{1/2}
0.196 mM I	0.020	5.60	202	0.196 mM II	0.120	5.8	209
	0.050	9.20	210		0.050	9.2	210
	0.100	13.20	213		0.100	12.8	207
	0.200	17.60	201		0.200	18.0	205
	0.300	20.80	194		0.300	21.6	201
0.476 mM I	0.400	23.60	191	0.476 mM II	0.400	24.2	195
	0.020	14.4	214		0.020	14.4	214
	0.050	22.4	211		0.050	22.4	211
	0.100	33.2	220		0.100	32.0	213
	0.200	43.2	203		0.200	44.2	212
	0.300	51.6	198	0.300	55.2	212	
	0.400	59.2	197	0.400	60.4	201	

Table 2. Polarographic data for the reduction of nine nitro compounds (0.124 mM) in pyridine - formic acid with TMAC as supporting electrolyte

Compound	No. of runs	<i>E_p</i> /V	<i>i_d</i> /μA
<i>p</i> -Nitrophenol	7	-0.50	2.38
Nitrofurantoin	8	-0.16	2.27
Nitrofurazone	7	-0.18	2.30
Furazolidone	7	-0.17	2.29
Chloramphenicol	9	-0.41	1.62
Nitrazepam	5	-0.34	1.62
Flunitrazepam	6	-0.28	1.55
Clonazepam	7	-0.28	1.58
Parathion	8	-0.32	1.64

the reduction were examined, together with the homogeneous chemical reactions accompanying the electrode process.

Experimental

Reagents

All chemicals were of analytical-reagent grade unless stated otherwise.

Nitrofurazone (I), furazolidone (II) and nitrofurantoin (III) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were used for the basic studies. Standard solutions (1.0×10^{-2} M) were prepared by dissolving the appropriate amount of each drug in dimethylformamide (DMF). Gelatine solution (0.5%) was used as a maximum suppressor.

The supporting electrolyte was prepared by diluting 20 ml of pyridine (12.3 M) and 10 ml of formic acid (98–100%) with 120 ml of 0.1 M tetramethylammonium chloride (TMAC) solution. The resulting solution had a pH of 4.5. On varying the ratio of formic acid to pyridine the pH could be varied over the range 2.6–5.1.⁵

Other nitro derivatives, such as chloramphenicol, *p*-nitrophenol, nitrazepam, flunitrazepam, clonazepam and parathion (EPA Research, Triangle Park, NC, USA), were also dissolved in DMF.

Apparatus

Polarographic assays were performed using a Polariter PO4 instrument (Radiometer, Copenhagen, Denmark). A dropping mercury electrode was used as the working electrode and a saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode.

Cyclic voltammetric experiments were performed using a CV-27 voltammograph (Bioanalytical Systems, Lafayette, IN, USA). A three-electrode assembly was used for all measurements. Glassy carbon was employed as working electrode, an SCE as the reference electrode and a platinum coil as the counter electrode.

An Orion Research Digital Ion-Analyzer 701 with glass and SCE electrodes was used for pH determinations.

Techniques

Aliquots of the standard solutions were diluted with the supporting electrolyte, de-oxygenated with oxygen-free nitrogen and analysed using the d.c. polarographic mode. The mercury flow-rate, *m*, and the drop time, *t*, were determined at various heights of the mercury column, *h*. The diffusion-controlled character of the current and the dependence of the diffusion-limited current on the depolariser concentration were established.

Cyclic voltammetric experiments were carried out under identical experimental conditions. All measurements were performed at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Dissolved air was removed from the solutions by bubbling oxygen-free nitrogen through the cell for 10 min, then passing it over the solution during the electrolysis. Voltammograms were recorded at scan rates between 0.02 and 0.4 V s⁻¹. The current function $i_p/Cv^{1/2}$ was found to be fairly constant for I and II (Table 1).

pH Studies

The effects of pH on the half-wave potentials and diffusion-limited current for I and II at a concentration 0.124 mM were studied over the pH range 1–14. The corresponding voltammograms were recorded under identical conditions.

Results and Discussion

Under the experimental conditions described above, the polarographic reduction of some aromatic nitro compounds of biological importance was found to give rise either to a single well defined wave corresponding to a six-electron process or to a single wave corresponding to a four-electron process. The electrochemical behaviour depends on the nature of the aromatic ring and on the nature and position of the substituents. When a solvent - buffer system (pH 4.5) containing pyridine and formic acid in conjunction with tetramethylammonium chloride solution was used as the supporting electrolyte, compounds containing a nitro-substituted furan ring behave as *p*-nitrophenol and are reduced to the corresponding amine in a six-electron reaction in a single step. Reduction of such compounds, except *p*-nitrophenol, occurs at relatively lower negative potentials than that of other nitro compounds, which indicates some nitroso character (Table 2). When equimolar solutions of I–III were polarographed using the supporting electrolyte mentioned above, the ratio of wave heights was approximately 1.00 ± 0.04 , indicating a reduction process similar to that for the corresponding primary amine (Fig. 1). Using controlled potential electrolysis, Mishra and Gode² recently demonstrated that the ultimate reduced product of nitrofurazone is the primary amine.

Reduction by six electrons in a single step occurs only if the substituents possess available π electrons to conjugate with

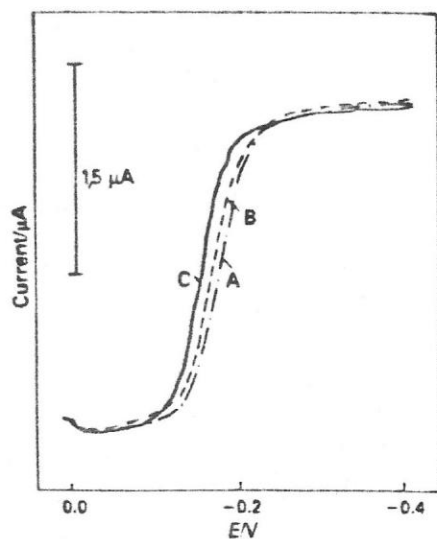
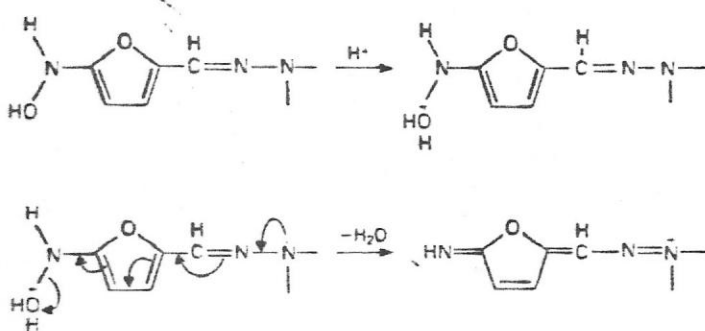


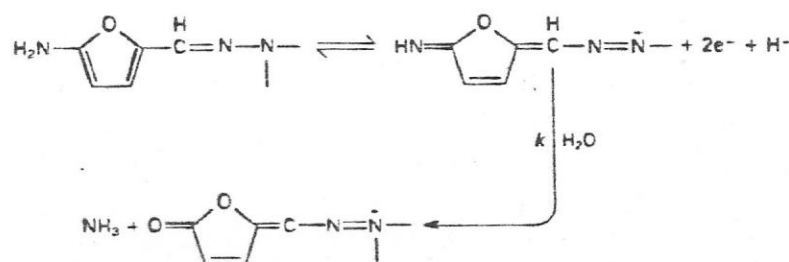
Fig. 1. Polarographic reduction waves of nitrofurazone, furazolidone and nitrofurantoin, each at 0.124 mm. (A) Nitrofurazone: E_1 -0.18 V and i_d 2.3 μ A. (B) furazolidone: E_1 -0.17 V, i_d 2.29 μ A. (C) Nitrofurantoin: E_1 -0.16 V, i_d 2.27 μ A. V_i = 0.00 V

the nitro group of the aromatic ring, which makes the transformation of the hydroxylamine into the imine or a quinonoid structure possible. This substituted donor group must be located at the 2-position on the furan ring or in a *para* or *ortho* position on the benzene ring in order to achieve the interaction of the π systems of the aromatic ring and of the substituents with the intermediate hydroxylamine to give the corresponding imine, which is then reduced to the primary amine.

Electrochemical reduction of I-III in a single wave can be explained regardless of the electron transfer process by the extremely fast chemical reactions occurring, owing to the presence of the moiety $>C=N-N<$. The following scheme represents the mechanism of formation of the corresponding imine from the intermediate hydroxylamine.



p-Nitrophenol, *p*-nitroaniline, nitrosophenols and other aromatic nitro compounds containing similar types of reduction sites and a donor group substituent show analogous polarographic behaviour.⁵⁻⁹



Scheme 1

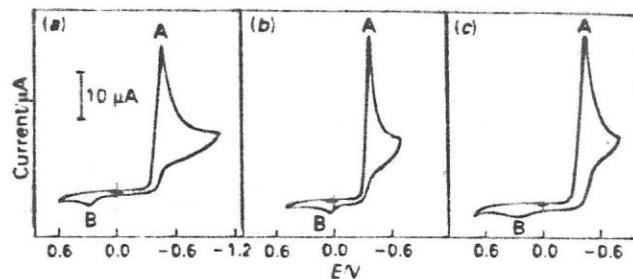
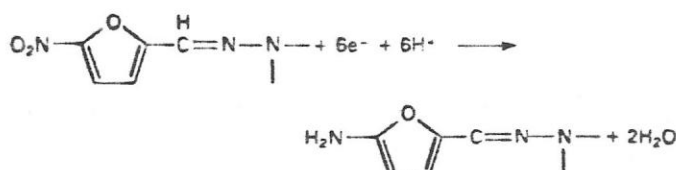


Fig. 2. Cyclic voltammograms of (a) nitrofurazone; (b) furazolidone; and (c) nitrofurantoin, each at 0.476 mm. pH, 4.5. Glassy carbon electrode. Scan rate. 0.1 V s⁻¹

Cyclic voltammograms of the nitrofuran derivatives (Fig. 2) were recorded under identical conditions, in order to identify intermediate species. In all instances the scan is initiated in a negative direction from 0.0 V. The initial reduction peak A corresponds to a six-electron reduction of the nitro group to the amine derivative, as shown below.



The amine thus produced is subsequently oxidised in the reverse scan at peak B to the imine or quinonoid structure intermediate. This imine is hydrolysed to a quinone derivative, which is neither oxidised nor reduced at these potentials, as shown in Scheme 1.

It can be observed that the electron transfer precedes the chemical reaction (EC reaction). Similar behaviour has been shown to occur in the oxidation of *p*-aminophenol at a platinum electrode in aqueous solutions.^{10,11} Wave clipping, that is, reversal of the scan direction before peak A, causes peak B to disappear, indicating that peak B is the oxidation product of the primary amine previously formed in A.

At scan rates higher than 0.3 V s⁻¹ a second cathodic peak C appears (Fig. 3), indicating that a reversible reduction of the imine derivative occurs, and that the hydrolysis of this imine is too slow to affect the reduction process. In other words, if the scan rate is very high relative to k , very little imine will be lost to the succeeding hydrolysis reaction and the electrochemical process will be reversible (see Fig. 3). Conversely, if the scan rate is low relative to k , the chemical reaction will be essentially over before the voltage scan is reversed, and the electrode process will appear totally irreversible.

The reduction potential of the highly reducible intermediate imine is more positive than the reduction potential of the nitro group to amine (peak A) and consequently this wave is not observed in normal d.c. polarography.

On the other hand, it was observed that chloramphenicol,^{5,12-14} nitrzapam,¹⁵ flunitrazepam and parathion show a different voltammetric behaviour to the nitrofuran derivatives. The former are reduced in a single four-electron wave

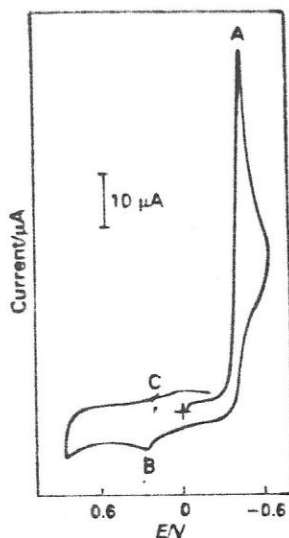


Fig. 3. Cyclic voltammogram of nitrofurazone. Scan rate, 0.3 V s^{-1} ; other conditions as in Fig. 2

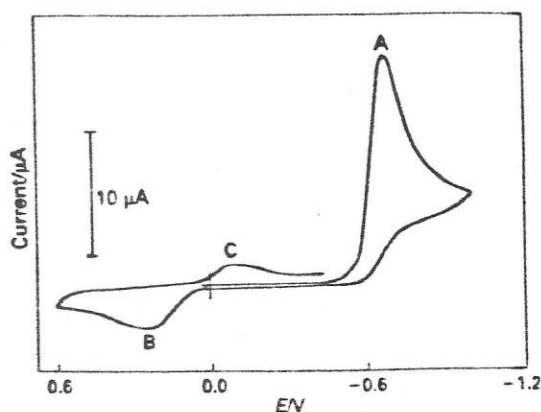


Fig. 4. Cyclic voltammogram of chloramphenicol. Conditions as in Fig. 2

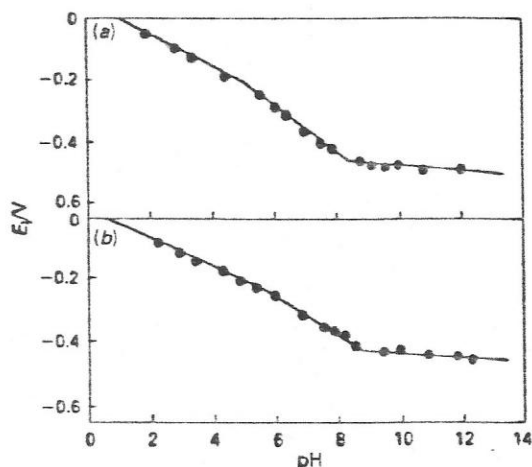
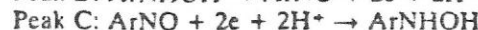
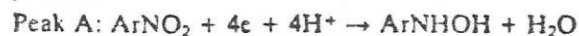


Fig. 5. Variation of E_1 with pH. (a) Nitrofurazone and (b) furazolidone, each at 0.124 mM

corresponding to the reduction of the nitro group to the hydroxylamine. This hydroxylamine derivative does not undergo further reduction because the formation of the highly reducible intermediate imine is blocked by an adverse effect of the substituents. Fig. 4 shows a typical cyclic voltammogram for these compounds in pyridine - formic acid. The three peaks observed correspond to the following well known electrode process:



Kissinger and Heineman¹⁶ showed that the three peaks observed in the voltammogram of chloramphenicol in an acetate buffer system and using a carbon paste electrode involve more than a simple electron transfer. The irreversibility of peak A is due to the slow electron transfer occurring in the step nitro \rightarrow nitroso derivative.¹²⁻¹⁵

In addition to these aspects, the buffer constituents of the supporting electrolyte also seem to have a significant effect on the shape and number of the reduction waves reported. We have observed that in a well buffered medium such as that constituted by pyridine and formic acid, in the acidic range single waves were always obtained in the reduction of all the nitro derivatives studied. On the other hand, in poorly buffered media or in Britton - Robinson buffer, nitrofurans derivatives are reduced to hydroxylamine, which is further reduced to the amine in a second separate wave.¹⁻³ According to Hess,¹² chloramphenicol is reduced in two steps in phthalate buffer of pH 4 and a similar reduction in two separate waves in acetate media has been reported.¹³

pH Studies

In d.c. polarography, the half-wave potentials for I and II are pH dependent and are shifted cathodically with increasing pH. The E_1 versus pH graph (Fig. 5) shows three linear portions. The equations that describe the variations of E_1 with pH were deduced from the graph and are given in Table 3.

The diffusion-limited current for both compounds is also pH dependent (Fig. 6). The slight decrease in the wave height below pH 3 is probably associated with an acid - base equilibrium as previously reported for nitrofurantoin.^{1,5} Above pH 5.0 the wave slowly begins to decay for I and II, and at this pH the first break on the E_1 versus pH graph occurs, representing the pH at which the hydroxylamine intermediate in the reduction of the nitro group is no longer protonated and therefore cannot be easily reduced. At approximately pH 8.5 for I and at pH 8.8 for II, each wave falls sharply and breaks up into two waves. This fall is accompanied by a change in the slope of the E_1 versus pH graph, indicating that a different electrode process occurs. Therefore, for all these compounds the best defined and differentiated waves for analytical purposes were obtained at $3 < \text{pH} < 5$. The scission of the polarographic wave and the change in the slope of the E_1 versus pH graph observed at pH 8-9 can be related to the cyclic voltammetric behaviour. Possibly an increase in pH increases the dissociation constant of the protonated species and these factors affect the protonation rate and consequently the E_1 values of the reduction wave are shifted to more

Table 3. Equations of the half-wave potentials of I and II at different pH values. The first term of each equation is the slope of the line and the second is the intercept of the line with the potential axis. Substitution of the appropriate pH value will give the E_1 value at that pH

I		II	
pH	Equation	pH	Equation
0.0-5.12	$E_1 = -0.051\text{pH} + 0.050\text{V}$	0.0-5.5	$E_1 = -0.045\text{pH} + 0.024\text{V}$
5.12-8.43	$E_1 = -0.075\text{pH} + 0.173\text{V}$	5.5-8.79	$E_1 = -0.061\text{pH} + 0.112\text{V}$
8.43-14	$E_1 = -0.0089\text{pH} - 0.384\text{V}$	8.79-14	$E_1 = -0.0080\text{pH} - 0.354\text{V}$

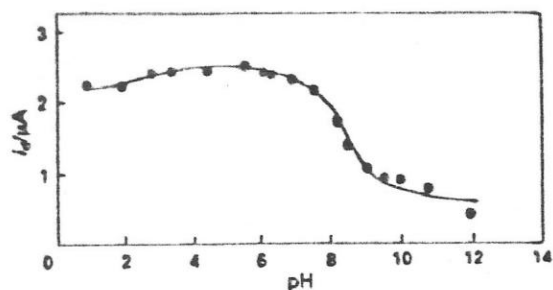


Fig. 6. pH dependence of the diffusion-limited current of 0.124 mM nitrofurazone

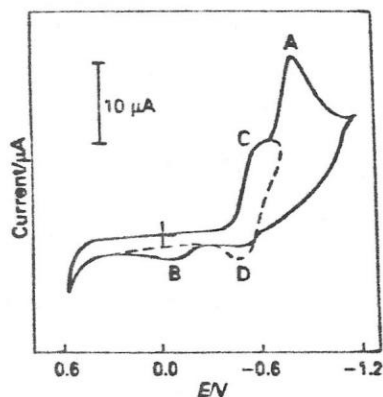


Fig. 7. Cyclic voltammogram of 0.476 mM nitrofurazone at pH 10. D was obtained when the sweep was reversed after the first reduction peak. Other conditions as in Fig. 2

negative potentials. Such a situation occurs when protonation precedes electron transfer.¹⁷

Cyclic voltammetric studies of the effect of pH on the reduction of the nitrofurans were carried out in order to relate them to the polarographic data obtained. In the pH range 1–8.5 no difference was observed in the shape of the cyclic voltammetric waves (Fig. 2), except that the potentials were shifted cathodically as the pH increased, indicating a similar electrode process over the pH range. However, above approximately pH 8.5 a noteworthy difference appears, indicating that a different process is occurring. For I–III a one-electron reduction peak appears at -0.5 V, corresponding to the reversible reduction of the nitro group to a nitro anion radical. This peak precedes the main reduction wave, which is shifted, at these pH values, to a more negative potential (Fig. 7). Wave clipping at a potential between peaks C and A (see Fig. 7) causes peaks A and B to disappear, indicating that peak D corresponds to the oxidation of the

anion radical formed in C. The existence of this relatively stable anion radical in alkaline media has been recently reported in the reduction of nitrobenzene when platinum, gold and glassy carbon electrodes were used.¹⁸ The formation of the nitro anion radical can be explained by delocalisation of the electrons in the aromatic ring due to the low proton activity in the bulk of the solution. Detection of the nitro anion radical is possible only through cyclic voltammetry.

Mechanism of the Electrode Process

Based on the polarographic and cyclic voltammetric studies, a reduction mechanism for I–III can be proposed. The nature of the waves and peaks was found to be diffusion controlled in the supporting electrolyte used, as shown by the $i_{lim}h^{-1}$ and $i_p/Cv^{1/2}$ relationships.

The irreversibility of the electrode process was verified by logarithmic analysis of the wave. The slope of the E versus $\log(i/i_d - i)$ graph exceeds appreciably $59/n$ mV and the numerical value of $E_2 - E_1$ exceeds $54.6/n$ mV.¹⁹

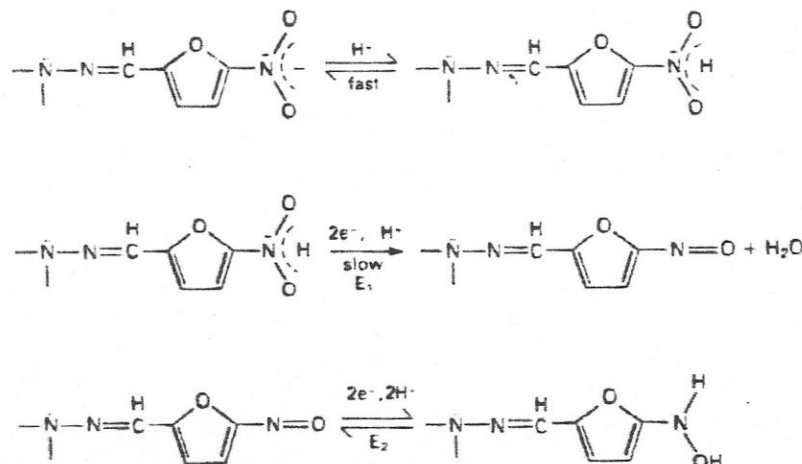
The αn_a values (where α is the transfer coefficient) and the number of protons (p values) corresponding to the rate-determining step were calculated for I and II at selected pH values. At pH 4.5 the αn_a values for I and II were found to be 1.23 and 1.15, respectively, indicating that two electrons take part in the rate-determining step of the reaction.

From the equation:

$$\frac{dE_1}{dpH} = \frac{-0.059}{\alpha n_a} \cdot p$$

p was found to be 0.93 and 0.88 for I and II, respectively, showing that one proton is involved in the rate-determining step of the reaction over the pH range 1–8. The participation of the hydrogen ion in the rate-determining step is due to protonation of the nitro group to form a more readily reducible species, which is reduced to the nitroso intermediate (CE reaction). A similar stoichiometry of the rate-determining step for the reduction of nitroxazepine hydrochloride has been reported recently (Scheme 2).²⁰

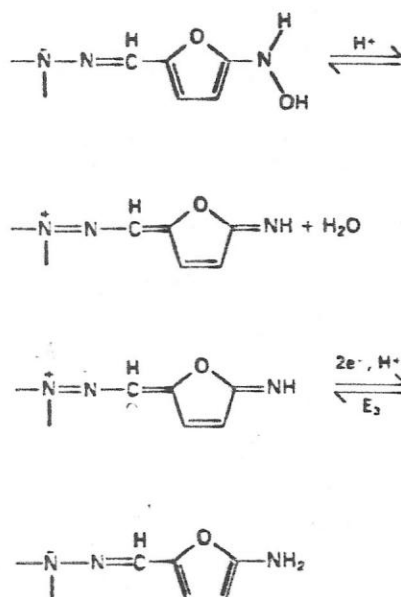
The nitroso intermediate group is rapidly reduced to the hydroxylamine, which is stabilised at this stage whenever the fast chemical reactions that would allow the transformation of this hydroxylamine into the highly reducible intermediate imine are inhibited. This inhibition takes place when the substituent does not have donor properties, in which event a four-electron reduction occurs. This was observed in compounds such as chloramphenicol, parathion, nitro derivatives of 1,4-benzodiazepines and other structurally related substances (CEE reaction). The nitroso-hydroxylamine reversible couple can be detected by cyclic voltammetry only when the hydroxylamine is the ultimate reduction product (Fig. 4).



Scheme 2

It must be stressed that the nitroso intermediate is not observed when normal d.c. polarography is used because the reduction potential of the nitroso group (E_2) is more positive than that of the nitro group.

On the other hand, in the reduction of the nitrofurans derivatives due to the effect of the donor properties of the substituent by a EC reaction, the hydroxylamine undergoes very fast chemical reactions, protonation and loss of a water molecule, giving rise to the highly reducible intermediate imine, which is then reduced to the primary amine in a reversible process (Fig. 3). This reversible couple was observed by cyclic voltammetry at high scan rates. At slow scan rates this reaction appears to be totally irreversible owing to the hydrolysis of the imine to give an inert product (Figs. 2 and 3) as indicated above. The reactions are shown below.



It must be noted that the potential E_3 is more positive than E_2 and therefore only one wave is observed. It may be concluded that the hydrolysis of the imine derivative is too slow to affect the polarographic wave. The above-mentioned processes, as already stated, take place in a well buffered medium of pH 4.5. In the pH range 9–14 the potentials of I and II are shifted cathodically and one reversible couple appears, at more positive potentials, corresponding to the reversible reduction of the nitro group to a nitro anion radical derivative (Fig. 7).

Conclusions

The voltammetric behaviour of some aromatic nitro compounds of biological interest, usually prescribed as therapeutic agents, has been studied by polarography and cyclic voltammetry. In pyridine-formic acid buffer, in the acidic range, the reduction of the nitro group occurs in a single step independently of the structure of the compound. The best defined and differentiated d.c. polarographic waves, for analytical pur-

poses, were obtained at $3 < \text{pH} < 5$. As is apparent from Table 2, the difference in the half-wave potentials makes the simultaneous determination of different nitro derivatives possible.

Cyclic voltammetry was used to identify certain intermediates, metabolites and final products when reducing, under similar conditions, nitro derivatives having different substituents. Hence the formation of the intermediate nitroso group in the reduction of the nitro compounds, which are reduced to hydroxylamine, has been clearly demonstrated, together with the formation of the intermediate imine when the nitro compounds are reduced to amines. The donor properties of the substituent drive the reduction completely to the primary amine, whereas a substituent that is not a donor promotes reduction to hydroxylamine.

Cyclic voltammetry also proved to be useful for the diagnosis of the electrode reactions that are coupled with homogeneous chemical reactions.

Support from the Department of Investigation (DIB) of the University of Chile is gratefully acknowledged.

References

- Burmicz, J. S., Smyth, W. F., and Palmer, R. F., *Analyst*, 1976, 101, 986.
- Mishra, A. K., and Gode, K. D., *Analyst*, 1985, 110, 1373.
- Vignoli, L., Cristau, B., Gouezo, F., and Fabre, C., *Chim. Anal. (Paris)*, 1963, 45, 439.
- Slamnik, M., *Talanta*, 1974, 21, 960.
- Morales, A., Toral, M. I., and Richter, P., *Analyst*, 1984, 109, 633.
- Chodkowski, J., and Gralowska-Ludwicka, D., *Pol. J. Chem.*, 1980, 54, 567.
- Stořesová, D., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1949, 14, 615.
- Testa, A. C., and Reinmuth, W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 83, 784.
- Nicholson, R. S., and Shain, I., *Anal. Chem.*, 1965, 35, 190.
- Shearer, C. M., Christenson, K., Mukherji, A., and Papariello, G. J., *J. Pharm. Sci.*, 1972, 61, 1627.
- Bard, A. J., and Faulkner, L. R., "Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications," Wiley, New York, 1980.
- Hess, G. B., *Anal. Chem.*, 1950, 22, 649.
- Fossdal, K., and Jacobson, E., *Anal. Chim. Acta*, 1971, 56, 105.
- Van Der Lee, J. J., Van Bennekom, W. P., and De Jong, H. J., *Anal. Chim. Acta*, 1980, 117, 171.
- Halvorsen, S., and Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1972, 59, 27.
- Kissinger, P. T., and Heineman, W. R., *J. Chem. Educ.*, 1983, 60, 702.
- Zuman, P., "The Elucidation of Organic Electrode Processes," Academic Press, New York, 1969.
- Rubinstein, I., *J. Electroanal. Chem.*, 1985, 183, 379.
- Meites, L., *Editor*, "Polarographic Techniques," Interscience, New York, 1965, p. 289.
- Mishra, A. K., and Gode, K. D., *Analyst*, 1985, 110, 31.

Paper A6/415

Received October 30th, 1986

Accepted February 12th, 1987

Polarographic Determination of Nitrofurazone and Furazolidone in Pharmaceutical Formulations and Urine

Alfonso Morales, Pablo Richter and M. Inés Toral

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, Las Palmeras 3425, P.O. Box 653, Santiago, Chile

In pyridine - formic acid buffer and tetramethylammonium chloride solution over the pH range 0-8.5, nitrofurazone, furazolidone and other nitrofurans are reduced in a six-electron process, giving rise to a well defined polarographic reduction wave at a dropping mercury electrode. The current is diffusion controlled and proportional to the concentration from about 5.88×10^{-3} M to the limit of detection of 1.24×10^{-6} M. The proposed method permits these drugs to be determined, without any prior separation or extraction, in pharmaceutical formulations and in urine at levels at which the unchanged drugs are excreted.

Other drugs commonly used as therapeutic agents, such as nitro derivatives of 1,4-benzodiazepines, chloramphenicol, metronidazole and tinidazole, are reduced in a single four-electron process at more negative potentials, which makes simultaneous determinations possible.

Keywords: Nitrofurazone determination; furazolidone determination; polarography; pharmaceutical formulations; urine

Nitrofurazone [5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone] (I) and furazolidone [3-(5-nitrofurfurylideneamino)-2-oxazolidone] (II) are synthetic nitrofurans with a nitro group at the 5-position on the furan ring. They have been widely used in the treatment of caecal coccidiosis in chickens and necrotic enteritis in swine. They are generally added to animal feeds to prevent various poultry and swine diseases. In man these drugs are therapeutically effective as antibacterial and bactericidal agents. Structures of the compounds are shown in the preceding paper, p. 965.

The exact mechanism of action of nitrofurazone is not known. It appears, however, that the drug acts by inhibiting bacterial enzymes involved in carbohydrate metabolism. Furazolidone is bactericidal owing to its interference with several bacterial enzyme systems, possibly including prevention of acetylation of coenzyme A. Furazolidone also acts as a monoamine oxidase inhibitor.

These compounds have been determined by spectrophotometry,¹ conductimetry,² gas - liquid chromatography,³ high-performance liquid chromatography⁴ and iodimetry.⁵ A survey of the literature indicates that very little attention has been paid to the polarographic determination of these drugs.⁶⁻⁹ This paper reports a method for the polarographic determination of nitrofurazone and furazolidone in pharmaceutical formulations and urine.

Preliminary experiments showed that, in well buffered solutions and using a donor-active solvent, the reduction of aromatic nitro compounds in a single four- or six-electron process depends on the nature and position of the substituents on the aromatic ring, as discussed in the preceding paper.¹⁰

Experimental

Reagents

All chemicals were analytical-reagent grade reagents.

Stock solutions (10^{-2} M) of nitrofurazone and furazolidone (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were prepared by dissolving the appropriate amount of each drug in dimethylformamide (DMF). Tablets containing these drugs were dissolved in DMF and assayed polarographically. Gelatine solution (0.5%) was used to eliminate the polarographic maxima. The supporting electrolyte used contained 0.1 M tetramethylammonium chloride solution and pyridine - formic acid buffer (pH 4.5) and was prepared as described previously.¹¹

Apparatus and Conditions for Polarographic Analysis

Polarographic analysis was performed using a Polariter PO4 instrument (Radiometer, Copenhagen, Denmark). A saturated calomel electrode (SCE) was used as a reference electrode together with a dropping mercury electrode (DME) as the working electrode. Dissolved air was removed from the solutions by bubbling oxygen-free nitrogen through the cell for 10 min. All measurements were performed at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Procedure

Aliquots of the stock solutions were diluted in 15 ml of supporting electrolyte, 1 ml of gelatine solution was added and the solution was purged with oxygen-free nitrogen for 10 min and subjected to polarography in the d.c. mode.

pH Studies

The effect of pH in the range 1-14 on the limiting current for I and II at a concentration of 0.124 mM was studied. From these polarographic data, the optimum pH for the determination of the drugs was chosen.

Calibrations Graphs

Aliquots of the pure drugs dissolved in DMF were diluted in the supporting electrolyte and polarographed. The standard additions method was employed in all instances and the results were used in the preparation of limiting current versus concentration graphs.

Determination of I and II in Pharmaceutical Formulations

An ophthalmic solution containing a nominal 20 mg per 100 ml of I was used for analysis. Portions of 1.0 ml of the ophthalmic solution were transferred into separate 10-ml calibrated flasks and diluted to the mark with the supporting electrolyte and assayed polarographically.

Tablet formulations containing a nominal 100 mg of II in a total mass of approximately 378 mg were analysed in order to examine the applicability of the proposed method. Ten tablets were thoroughly ground and mixed. Samples of approximately 20 mg of II were accurately weighed, dissolved in

between polarography and voltammetry arise because polarography determines only the nitro moiety whereas voltammetry permits the determination and detection of other metabolites.¹⁰

Because of the carcinogenicity and other adverse effects of nitrofurazone when administered in large oral doses, the determination of this drug in normal urine samples was not possible. However, the calibration graph constructed using spiked urine samples was linear in the range 3–60 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

When a solvent - buffer system containing pyridine and formic acid in conjunction with tetramethylammonium chloride solution is used as the supporting electrolyte, these nitrofurans are reduced in a single six-electron wave whereas other nitro derivatives are reduced in a single four-electron wave. Reduction of these nitrofurans occurs at lower negative potentials than for other nitro compounds commonly used as therapeutic agents, such as chloramphenicol, tinidazole, metronidazole and some nitro derivatives of 1,4-benzodiazepines. The large difference in E_1 values makes simultaneous determinations possible, as can be seen in Figs. 1–3.

Support from the Department of Investigation (DIB) of the University of Chile is gratefully acknowledged.

References

1. Herrett, R. J., and Buzard, J. A., *Anal. Chem.*, 1969, **32**, 1676.
2. Egerts, V., Simanska, M. V., and Hillers, S., *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis, Kim. Ser.*, 1963, **2**, 177.
3. Ryan, J. J., Lee, Y. C., Du Pont, J. A., and Charbonneau, C. F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1975, **58**, 1227.
4. Sudgen, E. A., MacIntosh, A. I., and Vilim, A. B., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1983, **66**, 874.
5. Rao, G. R., Raghuvver, S., Murthy, S. S. N., and Bajrangrao, B., *Indian Drugs*, 1979, **17**, 50.
6. Vignoli, L., Cristiau, B., Gouezo, F., and Fabre, C., *Chim. Anal. (Paris)*, 1963, **45**, 439.
7. Vignoli, L., Cristiau, B., Gouezo, F., and Fabre, C., *Chim. Anal. (Paris)*, 1963, **45**, 499.
8. Mishra, A. K., and Gode, K. D., *Analyst*, 1985, **110**, 1373.
9. Slamnik, M., *Talanta*, 1974, **21**, 960.
10. Morales, A., Richter, P., and Toral, M. I., *Analyst*, 1987, **112**, 965.
11. Morales, A., Toral, M. I., and Richter, P., *Analyst*, 1984, **109**, 633.

Paper A6/430

Received November 11th, 1986

Accepted December 23rd, 1986

Electrochemical Study of the Hallucinogen (±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-nitrophenyl)-2-aminopropane

Pablo Richter, Alfonso Morales* and J. Sebastián Gómez-Jeria

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, Las Palmeras 3425, P.O. Box 653, Santiago, Chile

Demián Morales-Lagos

Institute of Chemistry, Faculty of Sciences, Austral University of Chile, P.O. Box 567, Valdivia, Chile

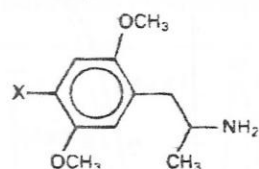
An electrochemical study of the hallucinogen (±)-1-(2,5-dimethoxy-4-nitrophenyl)-2-aminopropane, which differs from similar compounds in that a hydrophilic nitro group replaces hydrophobic substituents on the 4-position of the benzene ring, was carried out using a solvent - buffer system containing pyridine - formic acid and tetramethylammonium chloride solution.

Polarographically and voltammetrically the drug behaves as other structurally related aromatic nitro derivatives, the nitro group being reduced to the hydroxylamine in a single, well defined irreversible, diffusion-controlled and pH-dependent wave. The $E_{1/2}$ versus pH and i_{lim} versus pH relationships were examined and cyclic voltammograms were recorded at different pH values and at different scan rates in order to elucidate the reduction mechanism and to identify relatively unstable intermediate species.

The results of this study suggest that a significant relationship can be established between the electrochemical behaviour of any compound and its molecular - electronic structure, and between molecular structure and pharmaceutical or biological activity, as confirmed recently by quantitative structure - activity relationship studies.

Keywords: (±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-nitrophenyl)-2-aminopropane; nitro derivatives; polarography; cyclic voltammetry

1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-2-aminopropane, like other structurally related derivatives containing different substituent groups, has proved to be a particularly active hallucinogenic agent. It was found that the introduction of a hydrophobic atom or group such as Br, CH₃ or C₂H₅ at the 4-position in the original molecule provided compounds with both higher hallucinogenic potency and with different effects on the qualitative nature of the drug experienced by humans.¹



X = Br; DOB X = C₂H₅; DOET
X = CH₃; DOM X = NO₂; DON

1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-2-aminopropane derivatives

(±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-nitrophenyl)-2-aminopropane (DON; racemic form) is one of many drugs investigated for their hallucinogenic properties. As the nitro group is clearly hydrophilic, and as the drug shows a low octanol - water partition coefficient compared with the 4-CH₃ (DOM) and 4-Br (DOB) analogues,² and as it is not so effective as these on the serotonin receptors of the sheep's umbilical artery,³ it has been suggested that this compound might not be a very potent hallucinogen in humans. However, Coutts and Malicky,⁴ in a rat behavioural assay, demonstrated that DON shows a similar potency to the 4-CH₃ analogue. Recently, quantitative structure - activity relationship (QSAR) studies on indole-alkylamines⁵ and phenylalkylamines⁶ were carried out and the results suggested that DON should be a very potent hallucinogen at low doses, comparable to DOB and DOM. Subsequently, these theoretical and pharmacological presumptions were confirmed experimentally⁷ using racemic DON which

was synthesised as the nitrate salt following a previously reported procedure⁸ and then characterised spectroscopically.⁹

It is reasonable to assume that the biological activity of any type of drug depends on its molecular structure, and the spectrum of activity and selective toxicity can be explained by the fact that the receptor possesses systems with which the drug can interact. It is also evident that the key to the activity of these compounds is the position and nature of the substituents. On the other hand, the nature and position of the substituents in structurally related compounds are not only decisive with respect to the biological or pharmaceutical activity but also in the electrochemical behaviour of such compounds. Hence a significant correlation may be established between QSAR studies and electrochemistry.

Great attention has been paid to electrochemical studies of the nitro derivatives, which are frequently prescribed for therapeutic purposes and widely used. The pattern of action is a consequence of the ability of these drugs to accept electrons, which makes the reduction of the nitro group possible, these being compounds metabolised *in vivo* to the corresponding amines via nitroso and hydroxylamine intermediates. In this context, electrochemistry permits the investigation of the reduction mechanism and the establishment of its resemblance with the metabolic pathways for the biological degradation of these nitro derivatives.

The aim of this work was to study the effect of the nature and position of the substituents on the reduction of the nitro group in DON and to establish a comparison with the electrochemical behaviour of the nitro-containing heterocyclics and other aromatic nitro derivatives of biological importance when a dropping mercury or solid electrode is used. Further, a rapid polarographic method for the determination of DON is proposed that is applicable in overdose cases where a relatively high concentration of the free drug remains in a particular body fluid, provided that chloramphenicol is absent.

A survey of the literature indicated that no electrochemical study on this drug has been reported to date.

* To whom correspondence should be addressed.

9. Gómez-Jeria, J. S., Cassels, B., Clavijo, R., Vargas, V., Quintana, R., and Saavedra-Aguilar, J. C., *Microgram*, 1986, **19**, 153.
10. Morales, A., Toral, M. I., and Richter, P., *Analyst*, 1984, **109**, 633.
11. Hess, G. B., *Anal. Chem.*, 1950, **22**, 649.
12. Fossdal, K., and Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1971, **56**, 105.
13. Van Der Lee, J. J., Van Bennekom, W. P., and De Jong, H. J., *Anal. Chim. Acta*, 1980, **117**, 171.
14. Kissinger, P. T., and Heineman, W. R., *J. Chem. Educ.*, 1983, **60**, 702.
15. Morales, A., Richter, P., and Toral, M. I., *Analyst*, 1987, **112**, 965.
16. Stošesová, D., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1949, **14**, 615.
17. Zuman, P., "The Elucidation of Organic Electrode Processes," Academic Press, New York, 1969, p. 42.
18. Morales, A., Richter, P., and Toral, M. I., *Analyst*, 1987, **112**, 971.
19. Rubinstein, I., *J. Electroanal. Chem.*, 1985, **183**, 379.
20. Nicholson, R. S., and Shain, I., *Anal. Chem.*, 1964, **36**, 706.
21. Pezzatini, G., and Guidelli, R., *J. Electroanal. Chem.*, 1979, **102**, 205.
22. Meites, L., *Editor*, "Polarographic Techniques," Interscience, New York, 1965, p. 289.
23. Reinmuth, W. H., *Anal. Chem.*, 1960, **32**, 1891.
24. Meites, L., Campbell, B. H., and Zuman, P., *Talanta*, 1977, **24**, 709.
25. Meites, L., *Editor*, "Polarographic Techniques," Interscience, New York, 1965, p. 245.
26. Halvorsen, S., and Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1972, **59**, 127.
27. Mishra, A. K., and Gode, K. D., *Analyst*, 1985, **110**, 31.

Paper A7/490

Received November 30th, 1987

Accepted January 26th, 1988

Voltammetric Study of 7-Nitro-1,4-benzodiazepin-2-ones and Their Acid Hydrolysis Products, 2-Amino-5-nitrobenzophenones

Pablo Richter, Alfonso Morales and Joaquín Lahsen

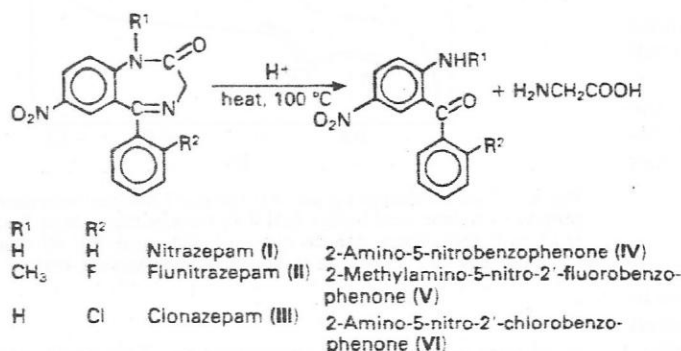
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, Las Palmeras 3425, P.O. Box 653, Santiago, Chile

The electrochemical reduction of 7-nitro-1,4-benzodiazepin-2-ones and of their acid hydrolysis products, 2-amino-5-nitrobenzophenones, was studied by polarography and cyclic voltammetry in a solvent - buffer system containing pyridine, formic acid and tetramethylammonium chloride solution in order to elucidate the effect of the nature and position of the substituents on the reduction of the nitro group. It was found that these two types of compounds can be polarographically and voltammetrically distinguished and that their reduction mechanisms differ owing to a structural change in substituents located at a *para*-position relative to the nitro group. Based on polarographic and cyclic voltammetric data, reduction mechanisms for these two species are proposed in which the donor - acceptor properties of the substituents and the importance of the chemical reactions associated with the electron-transfer steps are indicated.

Keywords: 7-Nitro-1,4-benzodiazepin-2-one; 2-amino-5-nitrobenzophenone; polarography; cyclic voltammetry

Nitrazepam (I), flunitrazepam (II) and clonazepam (III) are 1,4-benzodiazepines which contain a nitro group in the 7-position. Several workers have studied the polarographic behaviour of these compounds. In the acidic range of Britton - Robinson buffers, two polarographic reduction waves are observed. The first corresponds¹⁻³ to the reduction of the 7-nitro group to a hydroxylamine derivative and the second to a simultaneous reduction of the hydroxylamine and the azomethine groups. In a phosphate buffer of pH 6.9 the reduction occurs in two waves, the second being attributed⁴ to a single two-electron reduction of the azomethine group.

The nitro derivatives of the 1,4-benzodiazepines I-III, which have a common molecular skeleton, show similar electrochemical behaviour and cannot be distinguished owing to the proximity of their half-wave potentials. However, II and III have been determined in blood and urine by acid hydrolysis to the corresponding 2-amino-5-nitrobenzophenones followed by gas - liquid chromatography with electron-capture detection.⁵ Compound II can alternatively be determined in the presence of its analogues based on differences in the hydrolysis rates.² Compounds I-III can be hydrolysed quantitatively in acidic media to the corresponding benzophenones according to the following reaction:



Whereas the electrochemical reduction of the nitro group in I-III has been widely studied,^{1-4,6} no information is available concerning the reduction of the nitro group in their hydrolysis products IV-VI. The reduction in IV-VI is altered owing to the presence of an amino group in the *para*-position.

In this study the electrochemical behaviour of I-III was compared with that of IV-VI.

Experimental

Reagents

All chemicals used were of analytical-reagent grade unless stated otherwise.

Compounds I-III were obtained from La Roche (Basilea, Switzerland) and used as received. The benzophenone derivatives were synthesised by the method of Sternbach *et al.*⁷ [m.p. 158 °C (IV), 118 °C (V) and 183 °C (VI)]. Stock solutions (1 × 10⁻² M) were prepared by dissolving the appropriate amount of each compound in dimethylformamide (DMF). Gelatin solution (0.5%) was used as a maximum polarographic suppressor. The supporting electrolyte was prepared by adding 1 ml of pyridine (12.3 M) and 0.5 ml of formic acid (98-100%) to 100 ml of 0.1 M aqueous tetramethylammonium chloride. The resulting solution had a pH of 4.5. On varying the ratio of formic acid to pyridine the pH could be varied over the range 2.5-5.1. Extension of the pH range was achieved by using dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Apparatus

Polarographic curves were recorded using a Polariter PO4 instrument (Radiometer, Copenhagen, Denmark). A dropping mercury electrode (DME) was used as the working electrode (mercury flow-rate = 2.360 mg s⁻¹, drop time = 3.15 s) and a saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode.

Cyclic voltammograms were recorded using a CV-27 voltammograph (Bioanalytical Systems, Lafayette, IN, USA) with a three-electrode assembly. The working electrode was glassy carbon, the counter electrode a platinum coil and the reference electrode an aqueous SCE. Before each experiment the glassy carbon electrode was polished with CF-1050 polishing alumina (BAS) on a felt wetted with water or ethanol and finally cleaned with acetone on a fluff-free tissue.

Procedures

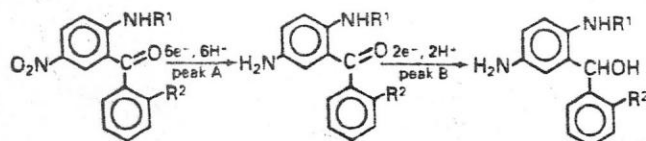
Aliquots of the stock solution were diluted with 15 ml of the supporting electrolyte to yield 0.184 mM solutions (unless stated otherwise). 1 ml of 0.5% gelatin solution was added, the solution was purged with oxygen-free nitrogen for 10 min and d.c. current - voltage curves were recorded at a DME.

hydroxylamino derivative. At this pH, the protonation of the hydroxylamino group is insufficiently fast and the wave at more negative potentials (Fig. 1) corresponds to the reduction of the azomethine group. This interpretation is in agreement with those proposed for the reduction of 7-nitro-1,4-benzodiazepin-2-ones by other workers in other supporting electrolytes.^{1-4,6}

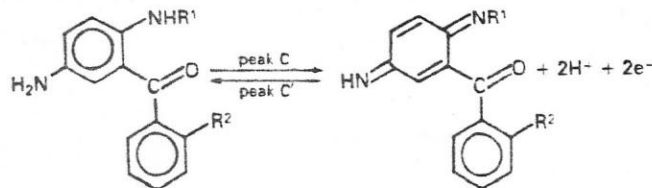
The hydrolysis products IV-VI show, on the other hand, a six-electron reduction of the nitro group followed by a two-electron reduction of the benzophenone carbonyl to the corresponding alcohol (Fig. 2). Evidently, the presence of the NHR¹ group in the *para*-position relative to the hydroxylamino group facilitates dehydration and reduction of the quinonediimine formed.

Cyclic voltammograms support this interpretation; reduction of the nitrobenzodiazepines I-III (Fig. 3) in peak A yields an arylhydroxylamine that is oxidised in peak C to a nitroso compound, which in a second cycle is reduced in peak D. The height of peak C is unaffected by the reduction in peak B (compare the full and broken lines in Fig. 3).

Reduction of the 2-amino-5-nitrobenzophenones IV-VI results in a six-electron reaction peak A (Fig. 4) representing a 2,5-diaminobenzophenone; the carbonyl group is then reduced in peak B:



The 2,5-diaminobenzophenone is oxidised in peak C to a quinonediimine, which is reversibly reduced in peak C':



The oxidation potentials of the 2,5-diaminobenzophenone in IV-VI are unfortunately close to those of the phenylhydroxylamine group in the structurally related I-III (compare Figs. 3 and 4), which prevents the fraction of arylhydroxylamine which did not undergo dehydration (if any) from being distinguished.

The presence of pyridine results in a separation of the anodic peak C into two and the disappearance of the reduction

peak C' (Fig. 5). Analogous effects of pyridine were observed in the oxidation of 1,4-diaminobenzene, used as a model compound (Fig. 6). These effects can be attributed either to a rapid nucleophilic addition of pyridine to the quinonediimine formed or to an effect of an adsorbed pyridine film. The separation of peaks C and D disappears at scan rates higher than 500 mV s⁻¹, probably owing to an insufficient rate of either nucleophilic addition or film formation. This problem will be studied further.

The reduction potentials of the nitrobenzodiazepines I-III and their hydrolysis products IV-VI are sufficiently different for polarography to be used as an analytical method in future studies of the hydrolysis of I-III.

The authors express their gratitude to Professor P. Zuman for his invaluable aid in the preparation of the manuscript. Thanks are also extended to the Department of Investigation (DTI) of the University of Chile (Project Q2443) for financial support.

References

- Oelschläger, H., Volke, J., Lim, G. T., and Frank, V., *Arzneim.-Forsch.*, 1966, **16**, 82.
- Smyth, W. F., Smyth, M. R., Groves, J. A., and Tan, S. B., *Analyst*, 1978, **103**, 497.
- Mishra, A. K., and Göde, K. D., *Analyst*, 1985, **110**, 1105.
- Halvorsen, S., and Jacobsen, E., *Anal. Chim. Acta*, 1972, **59**, 127.
- de Silva, J. A. F., Puglisi, C. V., and Munno, N., *J. Pharm. Sci.*, 1974, **63**, 520.
- Bishop, E., and Hussein, W., *Analyst*, 1984, **109**, 759.
- Sternbach, L. H., Fryer, R. I., Metlesics, W., Sach, G., and Stempel, A., *J. Org. Chem.*, 1962, **27**, 3781.
- Kemula, W., and Krygowski, T. M., in Bard, A. J., and Lund, H., *Editors*, "Encyclopedia of Electrochemistry," Volume XVIII, Marcel Dekker, New York, 1979, pp. 78-130.
- Stočasová, D., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1949, **14**, 615.
- Zuman, P., "The Elucidation of Organic Electrode Processes," Academic Press, New York, 1969, p. 42.
- Morales, A., Toral, M. I., and Richter, P., *Analyst*, 1984, **109**, 633.
- Morales, A., Richter, P., and Toral, M. I., *Analyst*, 1987, **112**, 965.
- Morales, A., Richter, P., and Toral, M. I., *Analyst*, 1987, **112**, 971.
- Richter, P., Morales, A., Gómez-Jeria, J. S., and Morales-Lagos, D., *Analyst*, 1988, **113**, 859.

Paper 9/00608G

Received February 2nd, 1989

Accepted November 23rd, 1989