



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO EN MEDIO APRÓTICO
DE 2-NITRO ACETANILIDAS-4-SUSTITUIDAS.
GENERACIÓN DEL ANIÓN RADICAL NITRO Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD FUNGICIDA
CONTRA Postia placenta

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A :
MARIA DE GUADALUPE DIAZ NANCLARES

MEXICO, D. F.



2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Profesor Jaime Medina Oropeza

Vocal: Profesor Andres Guillermo Martínez Casas

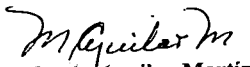
Secretario: Dra. Martha Aguilar Martínez

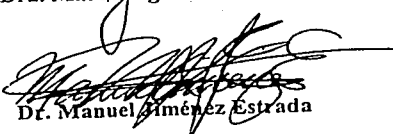
1er Suplente: Profesora Adriana Guadalupe Mejía Chavez

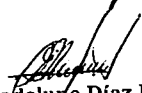
2do. Suplente: Profesora Ana Isabel Carranco Perez.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Electroquímica , Instituto de Química, UNAM.
Laboratorio 210, Instituto de Química, UNAM.

Asesora del tema:  Dra. Martha Aguilar Martínez

Supervisor Técnico:  Dr. Manuel Jiménez Estrada

Sustentante:  María de Guadalupe Díaz Nanclares

CONTENIDO

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------|------|
| Abreviaturas y Símbolos | |
| Introducción | 1 |
| CAPITULO I | |
| ANTECEDENTES | |
| 1.1 Electroquímica de compuestos con grupo nitro | 3 |
| 1.2 Importancia de los compuestos nitro en los sistemas biológicos | 5 |
| 1.3 Importancia de las amidas en los sistemas biológicos | 10 |
| 1.4 Correlación estructura Química –Actividad | 13 |
| 1.4.1 Ecuación de Hammett | 13 |
| 1.4.2 Constante de reacción | 16 |
| 1.4.3 Efecto de los sustituyentes | 17 |
| 1.4.4 Ecuación de Hammett-Zuman | 17 |
| 1.4.5 Correlación estructura Química-Potencial Rédox-Actividad Biológica | 19 |
| 1.5 La Madera | |
| 1.5.1 Anatomía de la madera | 20 |
| 1.5.2 Composición química de la madera | 22 |
| 1.5.3 Hongos degradadores de la madera | 23 |
| 1.5.4 Tipos de putrefacción de la madera | 24 |
| 1.5.5 Durabilidad de la madera | 26 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Objetivo | 27 |
| CAPITULO II | |
| DESARROLLO EXPERIMENTAL | |
| 2.1 Estudio electroquímico | |
| 2.1.1 Aparatos y Reactivos | 28 |
| 2.1.2 Voltamperometría Cíclica y Cronoculombimetría | 29 |
| 2.1.3 Actividad antifúngica | 32 |
| CAPITULO III | |
| RESULTADOS Y DISCUSION | |
| 3.1 Estudio de la reducción del grupo nitro y el efecto de los sustituyentes sobre los potenciales rédox | 34 |
| 2-nitro acetanilida | 34 |
| 4-metoxi-2-nitro acetanilida (4-OCH ₃ NA) | 37 |
| 4-Bromo-2-nitro acetanilida (4-BrNA) | 44 |
| 4-trifluorometil-2-nitro acetanilida (4-CF ₃ NA) | 45 |
| 4-Ciano-2-nitro acetanilida (4-CNNA) | 49 |
| 2,4-dinitro acetanilida (4-NO ₂ NA) | 51 |
| 4-Hidroxi-2-nitro acetanilida (4-OHNA) | 54 |
| 3.2 Análisis de los parámetros i_{pc} , i_{pa}/i_{pc} e $i_{pc}/v^{1/2}$ | |
| 3.2.1 Gráficas i_{pc} vs $v^{1/2}$ | 62 |
| 3.2.2 Análisis de la relación i_{pa}/i_{pc} vs v | 66 |
| 3.2.3 Gráficas $i_{pc}/v^{1/2}$ vs $\log v$ | 69 |
| 3.3 Obtención de la Constante de Velocidad Química Homogénea (k) | 72 |

| | | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4 | Obtención de la Constante de Velocidad de Transferencia de Electrones Heterogénea (k_s) | 75 |
| 3.5 | Correlación Estructura Química - Potenciales Rédox | 78 |
| 3.5 | Evaluación de Actividad Antifúngica contra <i>Postia placenta</i> y su comparación con los potenciales de reducción. | 80 |
| CAPITULO IV CONCLUSIONES | | 82 |
| CAPITULO V Anexos | | |
| 5.1 | ELECTROQUÍMICA | |
| 5.1.1 | Parámetros a considerar en las reacciones electroquímicas | 84 |
| 5.1.2 | Reacciones Electroquímicas | 85 |
| 5.2 | Voltamperometría Cíclica | 90 |
| 5.3 | Cronoculombimetría | 103 |
| 5.3.1 | Perfiles de Concentración-Distancia | 106 |
| 5.3.2 | Señal de Respuesta | 109 |
| 5.3.3 | Cronoculombimetría y Reacciones Acopladas | 112 |
| | Sugerencias | 115 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 116 |

Abreviaturas y Símbolos

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| σ | Constante de sigma de Hammett |
| ρ | Constante de reacción. |
| μ | Micras |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados centígrados |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| E | Potencial |
| E_{λ} | Potencial de cambio |
| E° | Potencial normal |
| E_i | Potencial inicial |
| $E_{1/2}$ | Potencial de media onda |
| E_{pa} | Potencial de pico anódico |
| E_{pc} | Potencial de pico catódico |
| E_{red} | Potencial de reducción |
| ΔE | Diferencia de potencial |
| g | Gramos |
| G | Energía libre de Gibbs |
| H | Hertz |
| i | Corriente |
| C | Coulombio |
| i_{pa} | Corriente de pico anódico |
| i_{pc} | Corriente de pico catódico |
| M | Concentración molar |
| mL | Mililitro |
| mV | Milivoltio |
| mV/s | Milivoltios por segundo |
| ppm | Partes por millón |

v

Velocidad de barrido

V

Voltios

$v^{1/2}$

Raíz cuadrada de la velocidad de barrido

VC

Voltametría Cíclica

4-OHNA

2-nitro 4-hidroxi acetanilida

2-NA

2-nitro acetanilida

4- OCH₃NA

2-nitro 4-metoxi acetanilida

4- BrNA

2-nitro 4-bromo acetanilida

4- CF₃NA

2-nitro 4-trifluorometil acetanilida

4- CNNA

2-nitro 4-ciano acetanilida

4- NO₂NA

2,4-dinitro acetanilida

Introducción

Los nitrocompuestos son compuestos que han sido ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos, bactericidas, herbicidas. En particular, las acetanilidas han sido utilizadas sobre todo como herbicidas y bactericidas, se ha encontrado que el grado de sustitución y las posiciones de los sustituyentes en estos compuestos tienen influencia en la potencia de la actividad biológica.^[17-25]

Estudios previos por varios investigadores^[11-12] han puesto de manifiesto que la actividad biológica de los nitrocompuestos se debe a la presencia del grupo nitro el cual se reduce fácilmente por acción de las reductasas presentes en las células. Sin embargo, la investigación sobre la relación de la reducción del grupo nitro con la actividad biológica en las nitro acetanilidas ha sido poco estudiada, así como, la posible actividad antifúngica de estos compuestos y en particular su actividad contra hongos degradadores de la madera.

Es por ello, que en el presente trabajo se expone el estudio electroquímico por voltamperometría cíclica de siete nitro acetanilidas conteniendo diferentes sustituyentes en el anillo aromático. Los potenciales de reducción obtenidos del grupo nitro proporcionan información acerca de la facilidad del proceso de transferencia de electrones para la generación del anión-radical nitro y su posible relación con la actividad antifúngica,

En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de la posible actividad antifúngica de las nitroacetanilidas estudiadas contra el hongo degradador de la madera *Postia placenta*, que es de gran importancia económica para la comunidad aserradera, la industria del mueble y la ecología en general. *Postia placenta* y otros hongos de su género actualmente son controlados por biocidas de amplio

espectro, muchos de los cuales están siendo restringidos en su uso por su amplia toxicidad. ^[83-85]

La aplicación de la ecuación de Hammett-Zuman permite conocer la susceptibilidad de la molécula a las modificaciones estructurales y los resultados obtenidos pueden posteriormente correlacionarse con su actividad biológica.

Así el estudio de nuevas moléculas que ofrezcan mayor y/o mejor actividad biológica que los compuestos comercialmente utilizados o reconocidos cobra gran importancia por el futuro beneficio que representa a la humanidad.

CAPITULO I

Antecedentes

1.1 Electroquímica de compuestos con grupo nitro.

El nitrógeno en el grupo nitro está en un nivel de oxidación muy alto. Por esto es extremadamente difícil remover un electrón y consecuentemente la electroquímica anódica del grupo nitro es esencialmente desconocida. En efecto, los compuestos nitro pueden usarse como disolventes para la oxidación anódica de otras sustancias. Por otra parte, el alto estado de oxidación del nitrógeno en el grupo nitro da a este grupo funcional una rica y compleja electroquímica catódica. Controlando adecuadamente las condiciones es posible convertir un grupo nitro en una variedad de productos. El nitrobenzono, por ejemplo, puede ser convertido a fenilhidroxilamina, *p*-aminofenol, anilina, azoxibenzeno, azobenzeno o hidrazobenzeno, dependiendo de las condiciones experimentales y cuya elección es crítica. En los nitrobenzenos sustituidos se ha observado que el mecanismo de reducción está fuertemente influenciado por las propiedades electrónicas y estéricas de los sustituyentes, así como también por la naturaleza del medio electrolítico. Estudios polarográficos previos, llevados a cabo en disolventes práticos revelaron que la reducción de *p*-nitrodifenilamina ocurre en un solo paso de 6 electrones, conduciendo a la *p*-amino-difenilamina^[1]. En un disolvente aprótico tal como dimetilsulfóxido, el mecanismo de reducción es diferente, puesto que estudios de e.p.r. revelaron la presencia de un anión-radical indicando la transferencia de un electrón^[2].

La incorporación de un grupo nitro en las moléculas orgánicas con actividad biológica es principalmente una consecuencia de su facilidad para ser reducido en presencia de diferentes sistemas enzimáticos^[3]. En este sentido los parámetros termodinámicos que caracterizan la facilidad de reducción son muy importantes para definir el tipo de propiedades biológicas de los diferentes nitrocompuestos^[4]. Como ha sido previamente demostrado por algunos autores los efectos tóxicos producidos por algunos nitrofármacos sobre células tumorales y en microorganismos son fuertemente dependientes de la formación del producto de reducción por un electrón (RNO_2^-)^[5]. Por eso, es muy importante el conocimiento de las características rédox de tales especies para anticipar los efectos citotóxicos en los sistemas biológicos. Se ha encontrado en una serie de compuestos nitroheterocíclicos una correlación directa entre los potenciales de media onda polarográficos y las velocidades de nitro reducción en diferentes sistemas biológicos^[6]. Como el primer paso en el proceso de reducción está definido por la reacción $\text{RNO}_2 + 1e^- \rightleftharpoons \text{RNO}_2^-$ involucrando el par $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$, consecuentemente, el potencial de reducción de este par sería un parámetro apropiado para definir las propiedades de reducción de estos compuestos. Además, han sido informados por algunos autores correlaciones entre electroafinidades y potenciales de reducción, obtenidos por técnicas electroanalíticas o por radiólisis de pulso, para compuestos nitroheterocíclicos^[7] y nitroaromáticos^[8].

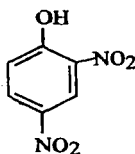
1.2 Importancia de los compuestos nitro en los sistemas biológicos.

Los compuestos nitro y nitroso están involucrados en gran medida en algunas de las reacciones bioquímicas más importantes que ocurren en los seres vivos. Numerosas reacciones biosintéticas involucran procesos de oxidación-reducción, como el proceso de fosforilación oxidativa, dando como resultado metabolitos de vital importancia, dichos procesos se pueden ver afectados por la presencia de compuestos nitro y nitroso.

La principal fuente de ATP en los organismos aeróbicos es el proceso de fosforilación oxidativa en el cual la nicotinamida reducida y los flavinucleótidos son reoxidados usando oxígeno molecular. Esta oxidación está acoplada a una serie de reacciones de transferencia de electrones, que lleva a una generación de adenosina trifosfato a partir de adenosina difosfato y fosfato inorgánico. En células normales, éste es un mecanismo importante para el control fisiológico del equilibrio energético. Si las coenzimas simplemente fueran directamente reoxidadas por oxígeno molecular en lugar de una ruta de reacciones sucesivas de transferencia de electrones, la producción de moléculas de ATP sería nula. Las moléculas de ATP son el depósito más importante de energía químicamente útil y cualquier sustancia que pueda interferir con las reacciones de la fosforilación oxidativa, afectará la mayoría de las reacciones sintéticas y de degradación de los organismos aeróbicos.

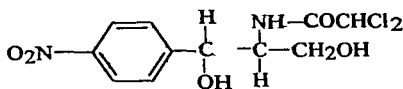
Cierto tipo de nitrocompuestos aromáticos pueden actuar como poderosos agentes desacoplantes de las reacciones de la fosforilación oxidativa. Por ejemplo, el 2,4-dinitrofenol. La acción desacoplante del fenol produce una reoxidación de las coenzimas reducidas pero, sin la concomitante formación de ATP bioquímicamente útil. Ya que las coenzimas son convertidas otra vez a sus formas oxidadas y pueden utilizarse de nuevo en el metabolismo oxidativo del

alimento nuevo, pero la falta de ATP causa que el organismo padezca hambre en un aparente medio abundante en energía,



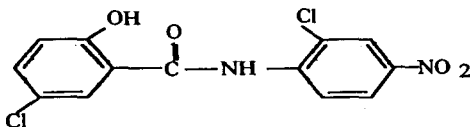
2,4 dinitrofenol

Los compuestos nitro han presentado actividades como antibióticos, insecticidas, fungicidas, moluscosidas y pesticidas entre otras. Como ejemplo se puede citar el Cloranfenicol, el cual es un antibiótico no sintético de amplio espectro, su acción principal es bacteriostática, inhibiendo el crecimiento del microorganismo por inhibición de la biosíntesis de las proteínas.



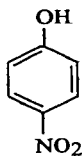
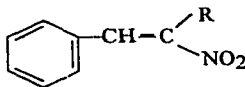
Cloranfenicol

Debido a que, algunas especies de moluscos, pueden actuar como portadores de enfermedades o representar plagas en jardines, se emplean para exterminarlos ciertos compuestos nitro con actividad moluscoscida, como la N-(2-cloro-4-nitrofenil)-5-cloro-salicilánilida, en donde la posición del grupo nitro puede acentuar o atenuar dicha actividad.



N-(2cloro-4-nitrofenil)-5-clorosalicilanilida

La presencia de hongos puede causar pérdidas económicas sustanciales en sembradíos y/o en el almacenamiento de productos. La introducción de un grupo nitró en hidrocarburos aromáticos y/o alifáticos a menudo da como resultado sustancias con actividad fungicida, así como, la halogenación simultánea produce un aumento en la efectividad fungicida de estas sustancias. Un ejemplo es, el *p*-nitrofenol que muestra propiedades antifúngicas y se usa para conservar productos de cuero. Otro grupo de nitrocompuestos que han presentado actividad antifúngica son las nitro olefinas relacionadas al 2-nitroestireno, el cual es un antifúngico utilizado en medicina y agricultura^[10].

*p*-nitrofenol

2-Nitroestireno

La incorporación de un grupo nitró en moléculas orgánicas como lo son, los nitroheterocíclicos de amplio uso terapéutico, se debe principalmente a la facilidad del grupo nitró a ser reducido en presencia de diferentes sistemas enzimáticos (flavo proteínas, citocromo p450). Por ejemplo, el nitroimidazol es selectivamente tóxico para bacterias anaerobias y protozoarios, ya que su actividad terapéutica esta basada en la reducción del grupo nitró, aceptando electrones a nivel del

metabolismo del piruvato a potenciales que no pueden ser generados en células aeróbicas. Además, el nitroimidazol es un excelente sensibilizador de células hipóxicas en mamíferos, adicionándole un efecto citotóxico.

Se ha observado que en condiciones anaerobias o hipóxicas (baja tensión de oxígeno), el proceso de reducción de los nitrocompuestos, involucra la transferencia inicial de un electrón (generación del anión-radical) con la subsecuente formación del derivado nitroso e hidroxilamina, involucrando la transferencia de 2 a 4 electrones, respectivamente. Lo anterior ha permitido afirmar a muchos investigadores que la importancia biológica de los compuestos nitroaromáticos radica en la facilidad con la que el grupo nitro es reducido en la célula logrando así los efectos terapéuticos asociados. En este sentido, la identificación de los parámetros termodinámicos que caractericen la facilidad de reducción, son muy importantes para definir el tipo de propiedades biológicas de los diferentes nitrocompuestos [11].

Se cree que la reducción de los nitrocompuestos bajo condiciones aeróbicas e hipoxicas es debido a la presencia de flavo proteínas denominadas "nitroreductasas", que los reconocen como sustratos, por ser buenos aceptores de electrones. La aceptación de uno o dos electrones por el nitrocompuesto, los cuales tienen capacidad de aceptar hasta seis electrones, resulta en la producción de intermediarios nitroso sumamente reactivos. La subsecuente reducción de un electrón de estos intermediarios nitroso resulta en la producción de oxígeno reactivo (un anión-radical hidroxilamina) figura 1.1.

En el caso de la generación del anión- radical nitro por la adición de un electrón RNO_2^- y , la reacción de éste con oxígeno es usualmente más rápida que la habilidad de la enzima a adicionar un segundo electrón, así la aceptación de este segundo electrón por el nitrocompuesto es inhibida. Este fenómeno causa el traslado del segundo electrón a otro sustrato como el NADPH [12].

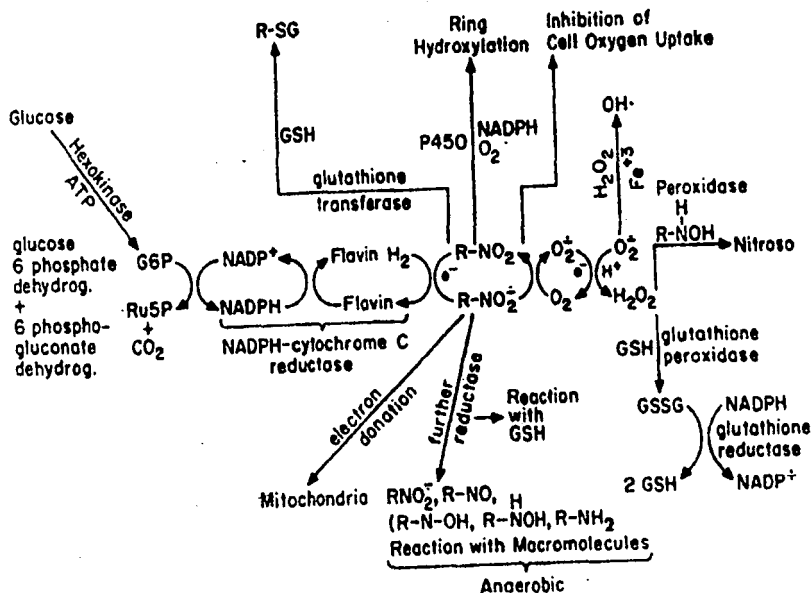
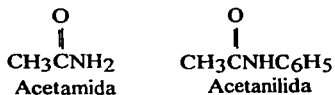


Figura 1.1 Rutas metabólicas para nitrocompuestos

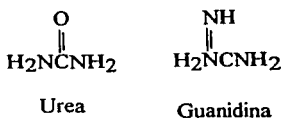
La reducción de compuestos con baja afinidad electrónica, por ejemplo misonidazol, es dependiente de la concentración de oxígeno presente. A baja tensión de oxígeno los nitrocompuestos pueden utilizar remanentes de oxígeno y reducirlo a peróxido fortaleciendo el ataque hipóxico además de la reducción del compuesto.

1.3 Importancia de las amidas en los sistemas biológicos.

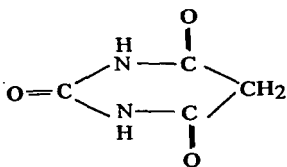
Una amida es un compuesto que tiene un nitrógeno trivalente unido a un grupo carbonilo, las N-fenil amidas, tienen el nombre trivial de anilidas.



La urea es uno de los compuestos más importantes relacionados con las amidas. El exceso de nitrógeno del metabolismo de las proteínas se excreta en los animales superiores como urea. Algunos animales superiores la excretan como amoníaco, mientras que los reptiles y pájaros lo excretan como guanidina. Ambos, guanidina y urea así como el amoníaco, se emplean ampliamente como fertilizantes nitrogenados y como materiales de partida para polímeros sintéticos y fármacos.



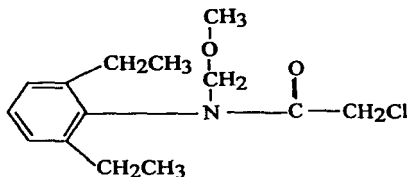
La urea se emplea para sintetizar barbitúricos (sedantes) mediante la reacción de ésta con malonatos de dietilo α -sustituídos. La síntesis de amidas y derivados de amidina dependientes de nucleósido trifosfato, están acompañadas de la formación del correspondiente nucleosido difosfato y P_i , lo cual sugiere un mecanismo de activación del grupo carboxilo por la formación de un acilfosfato intermediario o por catálisis electrofílica de un complejo cuaternario el cual resulta en la división del fosfato terminal de ATP.



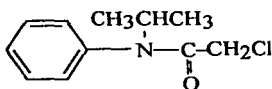
Ac. Barbitúrico

Se ha encontrado que las amidas y los derivados de urea presentan actividad herbicida, bloqueando la transferencia de electrones del oxígeno molecular en reacciones fotoquímicas de las plantas.

Ciertas acetanilidas son ampliamente utilizadas como herbicidas, para el control de la maleza en cosechas de maíz, frijol de soja y otros, como ejemplo, podemos citar al Alaclor (2-cloro-2',6'-dietil-N-metoximetil acetanilida) y el Propaclor (2-cloro-N-isopropil acetanilida)^[17,21,23].

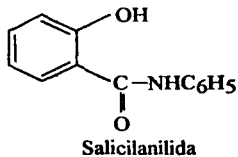


Alaclor



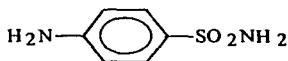
Propaclor

Se ha encontrado que la Salicilanilida entre otros, ha presentado actividad antifúngica, mediante la inhibición de ciertas enzimas o sistemas enzimáticos de los hongos a través de enlaces hidrógeno^[27].



Las sulfonamidas son compuestos en los cuales el nitrógeno está unido a un grupo sulfonilo en lugar de a un grupo acilo, las sulfonamidas se preparan por la acción de un cloruro de aril-sulfonilo sobre amoniacaco o sobre una amina primaria o secundaria.

Muchas de las *p*-amino sulfonamidas son agentes bacteriostáticos efectivos, ya que inhiben el crecimiento y multiplicación de algunos tipos de bacterias que requieren del ácido *p*-amino benzoico (PABA) para la biosíntesis de los ácidos fólicos. Las sulfas se hidrolizan *in vivo* a sulfanilamida, y las enzimas de algunas bacterias toman a ésta erróneamente por PABA. Cuando la enzima se une a la sulfanilamida, queda inhibida para catalizar la incorporación del PABA para convertirlo en una molécula de ácido fólico.



Sulfanilamida
Estructura esencial para actividad farmacológica

En general, la transformación de ATP a ADP-P_i está asociada con la biosíntesis de grupos amida y derivados de amidina, mientras que, la división a AMP-PP_i ocurre en la biosíntesis de grupos guanidina. Hay dos excepciones, la síntesis de amidas, catalizadas por asparagina sintetasa bacterial y la nicotinamida-adeninadineucleotido (NAD) sintetasa. La formación de AMP-PP_i, en la biosíntesis de asparagina catalizada por la enzima bacterial, indica un mecanismo de catálisis el cual difiere de la síntesis de otras amidas biológicas^[10].

1.4 Correlación Estructura Química- Actividad

Los compuestos orgánicos son capaces de mostrar variación en la reactividad con respecto a diversos sustituyentes en un centro de reacción determinado, permitiendo un cambio en el carácter nucleofílico o electrofílico de la molécula.

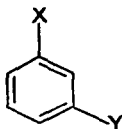
Sabiendo que una reacción polar consiste en la interacción entre el nucleófilo y un electrófilo, las demandas electrónicas de una reacción, es decir, los factores que facilitan o dificultan el proceso, se pueden ver como demandas causadas por donadores de electrones al centro nucleofílico y como demandas de atractores de electrones para un centro electrofílico. Una reacción responde a la perturbación electrónica dependiendo del efecto del sustituyente, del tipo de reacción y de sus demandas electrónicas.^[26]

Existe una clasificación para los sustituyentes con relación al hidrógeno, el cual se ha asignado con el sustituyente cero, teniendo por tanto sustituyentes donadores y atractores de electrones.

1.4.1 Ecuación de Hammett.

La dificultad para determinar el efecto de los sustituyentes en una reacción dada radica en que tan cerca o lejos se encuentren los sustituyentes del centro de reacción. Si estos se encuentran cerca, el efecto estérico afectará el centro de reacción, y la interpretación del efecto electrónico no es adecuada, pero si los sustituyentes están lo suficientemente lejos para evitar el efecto estérico, los efectos electrónicos serán muy marcados.

En 1937 Hammett^[28] determinó que la influencia electrónica de un sustituyente X, puede ser entendida por el estudio de reacciones con derivados bencénicos en la cadena Y:



El sustituyente se encuentra separado físicamente del sitio de reacción pero su influencia electrodonadora o electroattractora se transmite a través de la relativa polarización del sistema conjugado de electrones π .

La aproximación de Hammett se utiliza para hacer una reacción estándar para la evaluación del efecto del sustituyente considerando la disociación del ácido benzóico sustituido a 25°C en agua. La sustitución de un grupo electroattractor como el grupo nitro en la posición *para* del ácido benzóico causa un incremento en la fuerza del ácido, en tanto que los grupos electro-donadores disminuyen esta fuerza, tal es el caso del grupo amino.

Los sustituyentes en posición *orto* no son incluidos porque su proximidad al sitio de reacción produce interacciones estéricas que no se presentan en las posiciones *meta* o *para*.^[28]

Puede obtenerse una medida cuantitativa del efecto electrónico de cada sustituyente con relación al hidrógeno, por una comparación del ΔG_x para las constantes de disociación de los ácidos benzóicos sustituidos (K_x) con el ΔG_H para el ácido benzóico (compuesto padre), esto es:

$$\text{Efecto del sustituyente} = \Delta G_x - \Delta G_H = \sigma_x \quad (1)$$

Donde σ_x es la constante de Hammett del sustituyente.

Los sustituyentes donadores de electrones se caracterizan por valores negativos de σ y los atractores por valores positivos. El hidrógeno como punto de referencia, tiene un valor de $\sigma = 0$. Existen tablas con los valores de σ para una gran cantidad de sustituyentes.

Escribiendo $K_x / K_H = K_{rel}$ e introduciendo una constante de proporcionalidad ρ conocida como la constante de reacción, se tiene:

$$\log K_{rel} = \rho \sigma \quad (2)$$

La ecuación (2) se conoce como la ecuación de Hammett y se cumple con mucha precisión para cientos de reacciones que tienen lugar cerca del anillo del benceno o con sustituyentes localizados en las posiciones *meta* o *para*.

La forma más conveniente de utilizar la ecuación de Hammett es graficando el $\log K/K_0$ ó solamente $\log K$ para el equilibrio y, para velocidades se grafica $\log k/k_0$ o solo k , en el eje de las ordenadas (eje vertical) y los valores de σ para los sustituyentes en el eje abscisas (eje horizontal). K y k son las constantes de equilibrio y velocidad respectivamente para los compuestos sustituidos y K_0 y k_0 son las constantes para los compuestos sin sustituir.

Una línea recta indica que la relación de energía libre de la ecuación (3) es válida:

$$-\Delta G^\circ = -\Delta G^\circ_0 + 2.303 RT \rho \sigma \quad (3)$$

La pendiente de la recta es la ρ de la reacción.

1.4.2 Constante de reacción

La pendiente de la gráfica de Hammett ($\log k$ vs σ) es la constante de reacción ρ ; la cual es una medida de la sensibilidad de una reacción al efecto electrónico de los sustituyentes, es una respuesta del efecto de los sustituyentes sobre la reacción química. De la definición, se tiene que para la reacción de disociación del ácido benzoico en agua a 25°C, el valor de $\rho \sigma = 1.00$ el que se establece como un estándar y, que permite conocer la susceptibilidad o demandas electrónicas de otras reacciones.

Un valor positivo de ρ significa que la reacción responde al efecto de los sustituyentes con la misma sensibilidad que la ionización del ácido benzoico; esto es, la constante de equilibrio (o velocidad de reacción) es incrementada por grupos electro-atradores. Si $\rho > 1$, la reacción es más sensible al efecto de los sustituyentes que la disociación del ácido benzoico. Si $0 < \rho < 1$ entonces, los grupos electro-atradores incrementan la velocidad o constante de equilibrio pero en menor proporción que la disociación del ácido benzoico.

Una ρ negativa muestra que los grupos electro-donadores incrementan la constante de reacción. Una ρ pequeña frecuentemente significa que el mecanismo de la reacción involucra intermediarios radicales o un estado de transición cíclico con una pequeña separación de cargas.

Existen casos donde la pendiente de la gráfica $\log k$ vs σ cambia abruptamente con la variación del sustituyente obteniéndose por tanto dos líneas rectas. Este comportamiento resulta usualmente por cambios en el mecanismo de reacción como respuesta a la variación de la demanda electrónica de los sustituyentes^[29].

1.4.3 Efecto de los Sustituyentes.

El efecto de los sustituyentes muestra la participación de varios factores. Así, un sustituyente puede provocar la distorsión o polarización de la densidad electrónica en el sistema, tanto en el sustrato como en el producto de la reacción. El mecanismo importante para la polarización (redistribución) de la densidad electrónica es el efecto de la resonancia, también conocido como efecto mesomérico.

Los sustituyentes más electronegativos que un carbono aromático originan una carga parcial positiva en el carbono sustituido, mientras que los sustituyentes menos electronegativos causan el efecto opuesto. Este efecto genera dipolos que afectan el estado electrónico del sitio de reacción dependiendo de la orientación del dipolo y del signo de la carga que se forma en el sitio de reacción. Éste es un efecto electrostático que opera a través del espacio y se denomina efecto de campo.

Otro posible mecanismo de interacción del sustituyente con el sitio de reacción es el efecto inductivo en el que la transmisión del efecto del dipolo procede a través de los enlaces. Este efecto se debe a la diferencia de electronegatividad entre el carbono y un heteroátomo al cual está unido y depende de la proximidad del sustituyente al centro de reacción.

1.4.4 Ecuación de Hammett-Zuman

Los efectos electrónicos de los sustituyentes sobre los potenciales de óxido-reducción también han sido estudiados mediante la aplicación de la ecuación (4) de Hammett-Zuman.¹³⁰¹

$$\Delta E_{1/2} = \rho_{\pi} \sigma_x \quad (4)$$

Donde : $\Delta E_{1/2} = (E_{1/2})_X - (E_{1/2})_H$, es la diferencia de los potenciales de óxido-reducción entre el compuesto sustituido y el compuesto de referencia, σ_x , es la constante del sustituyente, ρ_{π} , es la constante de la reacción.

σ_x es la constante de Hammett del sustituyente y depende del tipo y de la posición del sustituyente y en cierto grado del tipo de anillo aromático, pero es independiente del grupo electroactivo, de la reacción involucrada y de las condiciones de la reacción. La constante de proporcionalidad $\rho_{\pi R}$ (medida en voltios) es la constante de la reacción y expresa la susceptibilidad de la reacción electroquímica a los efectos de los sustituyentes. Este valor depende del tipo del grupo electroactivo R, de la composición del medio electrolítico y de la temperatura pero es independiente de la clase y posición de los sustituyentes

La aplicación de la ecuación de Hammett-Zuman permite predecir los potenciales de medio pico para compuestos que aun no han sido estudiados y de igual manera permite conocer el valor de las constantes de los sustituyentes σ_x , para compuestos que aun no han sido reportados. El signo de la constante ρ de la ecuación permite distinguir si el estado de transición involucra captura o donación de electrones en el sitio de reacción.

Para la aplicación de la ecuación de Hammett-Zuman se deben obtener los potenciales rédox para una serie de compuestos bajo las mismas condiciones experimentales, y debe procurarse incluir una amplia gama de sustituyentes en posiciones *meta* y *para*, recordando que la ecuación de Hammett-Zuman no describe exitosamente sustituyentes en posiciones *orto* debido a problemas de impedimento estérico.

1.4.5 Correlación Estructura Química- Potencial Rédox- Actividad Biológica

Los potenciales de deducción proveen información acerca de la posibilidad de la transferencia de electrones (ET) *in vivo*. La relación establecida entre la facilidad de reducción, representada por el potencial de reducción (E_{pc}), el potencial de media onda ($E_{1/2}$) ó el potencial rédox (E_{red}) y las actividades biológicas, muestra la importancia de los estudios electroquímicos como herramientas para la comprensión del mecanismo de acción de los fármacos contra varias enfermedades, para la predicción de actividades biológicas y para el diseño de compuestos potencialmente activos. No es posible esperar una correlación absoluta, puesto que existen otros factores tales como solubilidad, metabolismo, difusión, adsorción, sitio de unión, permeabilidad de la célula y estereoquímica los que ineludiblemente juegan papeles críticos^[31]. Un grupo considerablemente grande de sustancias activas, poseen valores $E_{1/2}$ mayores que $-0.5V$ vs el electrodo normal de hidrógeno (NHE), en el intervalo fisiológicamente activo el cual puede permitir la aceptación de electrones a partir de donadores biológicos^[32] o estas sustancias pueden experimentar cambios metabólicos, dando lugar a derivados fácilmente reducibles^[33].

Los compuestos nitro son excepcionales por su intervalo de actividad, la relativa carencia de resistencia y su interesante química^[34]. El principal parámetro químico que determina la eficacia de los fármacos nitro es el potencial de reducción del grupo nitro ^[35] y hay una amplia evidencia que algunas propiedades electroquímicas de los compuestos nitro pueden correlacionarse con los efectos biológicos de estos compuestos^[36]. Esto indica que parte de la actividad de estos fármacos puede derivarse de la producción de superóxido catalizado por el grupo nitro (ciclo futile(inútil)) o se debe a la acción de sus metabolitos reducidos (alquilación biorreductiva).

1.5 La Madera

1.5.1 Anatomía de la madera.

La madera forma parte importante de los ecosistemas forestales, ya que constituye un enorme depósito de materiales orgánicos. Los tejidos de la madera equivalen al 90% de la biomasa total (en peso seco). Los troncos y ramas contribuyen con el 70% y las raíces con el 20% restantes.

Muchas plantas son productoras de madera, pero la madera que tiene valor comercial se obtiene principalmente de troncos de árboles forestales. Al realizar un corte transversal de un árbol a la altura del tronco o fuste, se pueden observar a simple vista diferentes capas que forman circunferencias de grosor variable y que caracterizan a la madera. (figura 1.2). En la parte más externa se encuentra la corteza que es un tejido constituido por células muertas y que tiene como función proteger las capas interiores. Inmediatamente por debajo de la corteza encontramos una capa llamada *floema* por la cual circula la savia descendente, rica en nutrientes manufacturados por las hojas, que alimentan el proceso de crecimiento secundario que tiene su origen en el *cambium vascular*. Esta última es una capa muy delgada, visible únicamente por microscopio, y tiene como función formar las nuevas células que dan origen al *floema* y al *xilema*.

El *xilema* es la zona más evidente que se observa al realizar un corte transversal del tronco. En esta zona se pueden observar dependiendo de la especie dos regiones las cuales se distinguen por el color. La región más externa y cercana a la corteza se llama *albura*, la cual es de color más claro mientras que la región central es denominada *duramen*, la cual es de color más oscuro.

La *albura* o *madera blanda* es por donde circulan los minerales y nutrientes disueltos en la savia, que fueron absorbidos por las raíces. La *albura* está constituida por células parenquimatosas, llamadas *traqueidas*, éstas presentan numerosas puntuaciones areoladas.

A través de las *traqueidas* que se conectan entre sí en las células, el agua y los minerales ascienden, haciendo su transporte más eficiente. Con el paso de los años dependiendo de la especie, las paredes inferiores de las células viejas que constituyen el xilema se van engrosando gradualmente debido al depósito de "productos de desecho" como taninos, gomas y resinas. Estos desechos que se acumulan en las células impiden el transporte eficiente del agua lo que ocasiona la muerte de esta parte del xilema la cual es llamada duramen, madera dura o corazón. El depósito de estas sustancias le confiere a esta zona el color oscuro que la diferencia de la *albura*. Generalmente un árbol joven está constituido principalmente por *albura* mientras que en un árbol maduro se encuentra una amplia zona de *duramen*.

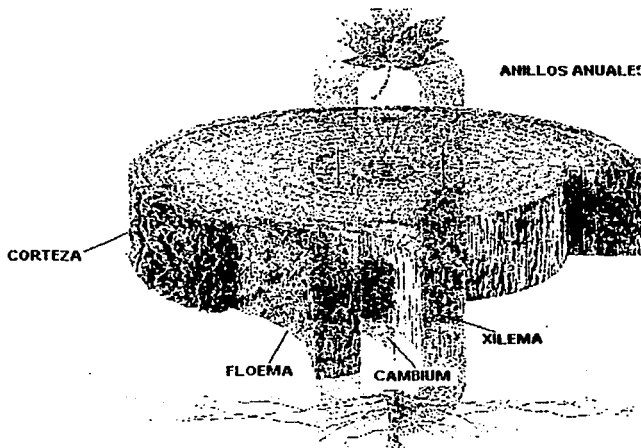


Figura 1.2 Corte transversal de un tronco de madera

1.5.2 Composición química de la madera.

La madera está constituida principalmente por tres polímeros: *celulosa*, *hemicelulosa* y *lignina*, los cuales le confieren su estructura y propiedades. De estos el más abundante e importante es la celulosa (35 al 45%), la cual es un polímero lineal de unidades de anhidro-D-glucopiranosas con enlaces β -1,4 glicosídicos. Estas cadenas de celulosa constituyen microfibrillas que forman el esqueleto de la madera.

La hemicelulosa es menos abundante (20 a 45%) y es un polisacárido constituido por residuos de azúcares como xilosa, glucosa, manosa, galactosa y arabinosa.

La lignina está presente en la madera en un 15 a un 35% y es un polímero amorfo constituido por unidades fenólicas.

La celulosa forma las paredes secundarias, mientras que la hemicelulosa y la lignina se localizan entre las capas de dichas paredes. La *hemicelulosa* forma una matriz de polímeros y actúa como sostén de los filamentos celulósicos, mientras que la lignina actúa como cementante entre las capas de celulosa.

Además de estos polímeros estructurales se encuentran otros compuestos que no forman parte de la estructura de la madera, como son carbohidratos simples, almidón, elementos minerales y metabolitos secundarios o extractivos. El término extractivo incluye una gran variedad de compuestos químicos, tanto primarios como secundarios. Entre los primarios tenemos lípidos, ácidos grasos, etc. Entre los secundarios, los principales son flavonoides, isoflavonoides, lignanos, triterpenos, cumarinas, xantonas, compuestos aromáticos y aceites volátiles. Las especies de madera difieren mucho en cuanto al tipo y cantidad de extractivos que tienen. También existe una considerable variación en la distribución de los extractivos en la madera de árboles de manera individual. Los extractivos no forman parte de la estructura de la pared celular y constituyen entre el 3 y 4% de la masa seca de la madera y en algunas especies tropicales hasta un 25%. Son los extractivos los principales responsables de impartir a la madera olores y

sabores característicos. La madera de algunas especies a las que los extractivos imparten dichas características, es muy resistente al ataque por hongos e insectos, razón por la cual se considera que estos compuestos están estrechamente relacionados con la resistencia natural a agentes degradadores.

1.5.3 Hongos degradadores de la madera.

Bajo condiciones naturales, la degradación de la madera es un acontecimiento importante ya que de esta manera se restituyen al suelo los componentes químicos, que están parcialmente inmovilizados haciéndose nuevamente accesibles para otros organismos. Bajo este punto de vista los hongos y otros organismos degradadores de la madera como los insectos y escarabajos juegan un papel decisivo en el reciclaje de la materia orgánica.

Los hongos que degradan a la madera, también llamados xilófagos, desempeñan una función importante dentro de la naturaleza, pero no así cuando destruyen objetos de madera útiles para el hombre. Dentro del reino fungi, diversas especies de *Ascomycetes* y *Deuteromycetes* son capaces de degradar a la celulosa. Sin embargo, son los *Basidiomycetes* los principales destructores de la madera. Algunas especies degradan celulosa y hemicelulosa, otras más degradan incluso lignina. En aserraderos y madererías en donde se almacena la madera por tiempos más o menos largos, si la madera no está bien seca o si existe humedad en el medio, los hongos prosperan. Para que estos se desarrollen deben existir por lo menos dos condiciones: a) el aumento de humedad de la madera debe ser superior al punto de saturación de la fibra (30%) e inferior al 90%. Si la madera está saturada de agua, los hongos tampoco pueden prosperar por la falta de oxígeno, b) la temperatura del ambiente debe ser mayor a 24°C e inferior a 32°C. Bajo estas condiciones ambientales, los hongos se desarrollan haciendo que la madera pierda peso, se degrade y manche, lo cual disminuye su valor y utilidad.

Los hongos xilófagos están constituidos de filamentos llamados hifas, estas estructuras se desarrollan en abundancia, se ramifican, entrelazan y anastomosan, formando una estructura filamentosa llamada micelio. Son las hifas las que le confieren a los hongos la capacidad de degradar los tejidos leñosos debido a la habilidad de penetrar dicho tejido. A partir del micelio se forman estructuras reproductivas llamadas cuerpos fructíferos. Dichas estructuras contienen en su interior miles de esporas las cuales son liberadas al medio después de madurar. Si las condiciones son las adecuadas, las esporas producen micelio sobre el nuevo sustrato, causando una nueva infección^[38-43].

1.5.4 Tipos de Putrefacción de la madera.

Los hongos se pueden clasificar en dos categorías según el tipo de ataque sobre la madera:

a) Hongos Manchadores (Ascomicetes) y Mohos (Deuteromicetes):

En cuanto a los hongos manchadores, éstos presentan hifas de color oscuro, las cuales penetran la albura dando la apariencia de vetas o manchas azul-gris o negras, de ahí su nombre. Este tipo de hongos degradan principalmente almidones y azúcares. Por otro lado, los mohos se desarrollan en la superficie de la madera, produciendo esporas de color verde o negro con apariencia algodonosa. Los mohos consumen solo azúcares libres y almidones.

Este grupo de hongos y moho alteran la apariencia estética de la madera, pero tienen efectos casi nulos sobre la resistencia mecánica; sin embargo, la resistencia al impacto (tenacidad) puede ser afectada negativamente cuando el manchado de la madera es severo dando las condiciones para que aquellos hongos que si pudren la madera la colonicen^[45].

b) Hongos Xilófagos (Basidiomicetes).

Este tipo de hongos causan la putrefacción de la madera atacando componentes estructurales como celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que ocasiona una pérdida de peso y resistencia mecánica de la madera.

Dentro de esta categoría de hongos xilófagos, existen tres subgrupos que se distinguen principalmente por el tipo de putrefacción que producen:

- 1) Hongos de la Putrefacción Blanda: Degradan principalmente celulosa y hemicelulosa y en menor grado lignina. Estos hongos crecen en las paredes secundarias de las fibras de la madera, formando cavidades cilíndricas con fondos cónicos, por su tipo de ataque causan el ablandamiento de las capas superficiales de la madera^[47].

Los dos siguientes subgrupos inician su ataque cuando las hifas penetran la pared celular moviéndose de una célula a otra a través de puntuaciones presentes en las células o mediante cavidades desarrollando el micelio en los lúmenes de las paredes celulares.

- 2) Hongos de la Putrefacción Blanca: Degradan los tres componentes estructurales de la madera: celulosa, hemicelulosa y lignina. La degradación de la madera se inicia con la actividad de las endo- β -1,4-gluconasas que hidrolizan al azar los enlaces β -1,4 a lo largo de la cadena de celulosa seguida por la actividad de una exo- β -1,4 gluconasa que libera unidades de celobiosa o glucosa a partir del extremo no reductor de la celulosa. Finalmente, la β -1,4 glucosidasa hidroliza celobiosa y celodextrinas solubles en agua liberando glucosa. Además hidrolizan al ácido celobiónico liberando glucosa y gluconolactosa^[47].

- 3) Hongos de la Putrefacción Morena: Degradan al igual que los hongos de putrefacción blanca, la celulosa y la hemicelulosa y sólo parcialmente a la lignina. El proceso de degradación difiere del que presentan los hongos de

putrefacción blanca, en que en la putrefacción morena no es un proceso completamente enzimático, ya que sólo cuentan con la actividad de la endo- β -1,4-gluconasa y carecen de la exo- β -1,4 gluconasa, razón por la cual aparentemente no podrían degradar a la celulosa cristalina. No obstante estos hongos despolimerizan la celulosa rápidamente durante las primeras etapas de la putrefacción de la madera. Koenigs^[40] propone que el ataque inicial hacia la celulosa cristalina es a través de un sistema H_2O_2/Fe^{2+} , mediante un proceso de degradación oxidativo. Aunque los hongos de putrefacción blanca también producen H_2O_2 y éste es degradado rápidamente por enzimas como la catalasa, lo cual no ocurre en los hongos de putrefacción morena.

1.5.5 Durabilidad de la madera.

La durabilidad de una madera se define como su capacidad intrínseca para resistir el ataque combinado de los factores bióticos (hongos, termitas, etc.) y abióticos (humedad, aire, fuego, etc), que la degradan en condiciones de servicio. Esta propiedad varía entre las diferentes especies, siendo algunas maderas poco, moderadamente o muy durables^[48].

La resistencia natural de una madera está asociada principalmente, a la presencia de metabolitos secundarios o extractivos, componentes químicos no estructurales de la madera. Esta propiedad de la madera varía aún en el tronco de un mismo árbol, existiendo diferencias entre la madera de la albura considerada poco resistente por su baja concentración de metabolitos secundarios, en contraste con la del duramen considerada más resistente por su alto contenido de metabolitos secundarios.

Objetivo

Relacionar el comportamiento electroquímico con la actividad antifúngica de siete 2-nitroacetanilidas, 4-sustituidas contra el hongo degradador de la madera Postia placenta.

CAPITULO II

Desarrollo Experimental

2.1 Estudio Electroquímico.

2.1.1 Aparatos y Reactivos.

La voltamperometría cíclica y cronocolumbimetría se llevaron a cabo en un potenciostato Electrochemical Workstation instrument de Bioanalytical Systems Inc. (BAS 100 B/W) acoplado a una computadora Gateway 2000 modelo 4DX-33 [52].

Se utilizó una celda no dividida, enchaquetada para mantener una temperatura constante de 25°C, para lo cual la celda se conectó a un recirculador eléctrico Fisher Scientific. La celda disponía de un arreglo de tres electrodos, el de carbón vítreo como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y Ag/AgNO₃ 5mM en CH₃CN como electrodo de referencia (figura 2.1), el cual consiste en un alambre de plata sumergido en una solución de AgNO₃ 5mM en acetonitrilo. El electrodo de Ag⁰/Ag⁺ es reversible en acetonitrilo.

Para el pulido del electrodo de carbón vítreo se utilizó alúmina con un tamaño de partícula de 0.05µm de Buehler Ltd. con la cual se preparó una pasta usando para ello agua destilada, el electrodo se frotó suavemente con movimientos circulares durante 1 a 2 minutos, posteriormente se lavó el electrodo con suficiente agua destilada para eliminar completamente cualquier residuo de alúmina. Finalmente, se enjuagó con acetona y se dejó secar, resultando una superficie brillante y con terminado tipo espejo. Este procedimiento se repitió antes de realizar cada voltamperometría y cronocolumbimetría para evitar que los

resultados fueran alterados por algún depósito del material sobre el electrodo de trabajo.

El acetonitrilo, nitrato de plata, tetrafluoroborato de tetraetilamonio (Et_4NBF_4) y ferroceno utilizados fueron marca Aldrich.

Con el propósito de establecer un sistema de referencia que considere las condiciones experimentales características de estos sistemas, los potenciales de reducción informados en este trabajo están referidos al par ferrocinio/ferroceno Fc^+/Fc de acuerdo a la recomendación de la IUPAC^[49]. En este caso $E(\text{Fc}^+/\text{Fc}) = 444 \text{ mV vs ESC}$ y $E(\text{Fc}^+/\text{Fc}) = 64 \text{ mV vs Ag/AgNO}_3$.

Las nitroacetanilidas estudiadas en este trabajo (tabla 2.1) fueron sintetizadas en el Instituto de Química de la UNAM por el Dr. Manuel Jiménez.

2.1.2 Voltamperometría cíclica y Cronocolumbimetría.

Se decidió utilizar el acetonitrilo como disolvente debido a que tiene una constante dieléctrica alta, es excelente para disolver a la mayoría de los compuestos orgánicos y presenta un amplio intervalo de potencial junto con el electrolito soporte tetrafluoroborato de tetraetilamonio (Et_4NBF_4) dando lugar a un medio electrolítico con límites anódicos y catódicos de $+1.83 \text{ V}$ y $-3.1 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}^+$ respectivamente.

Los potenciales de óxido-reducción y otros parámetros electroquímicos de las 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas se determinaron por voltamperometría cíclica y cronocolumbimetría en un medio aprótico de Et_4NBF_4 0.1M en CH_3CN . Todas las soluciones de los compuestos bajo estudio se prepararon a concentraciones 1mM en el medio electrolítico, verificando previamente la pureza de los compuestos por cromatografía en capa fina (ccf). Se utilizaron placas de silica gel como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo 70:30 y 50:50, usando como revelador una lámpara de luz ultravioleta de onda corta marca Mineralight UVS 11.

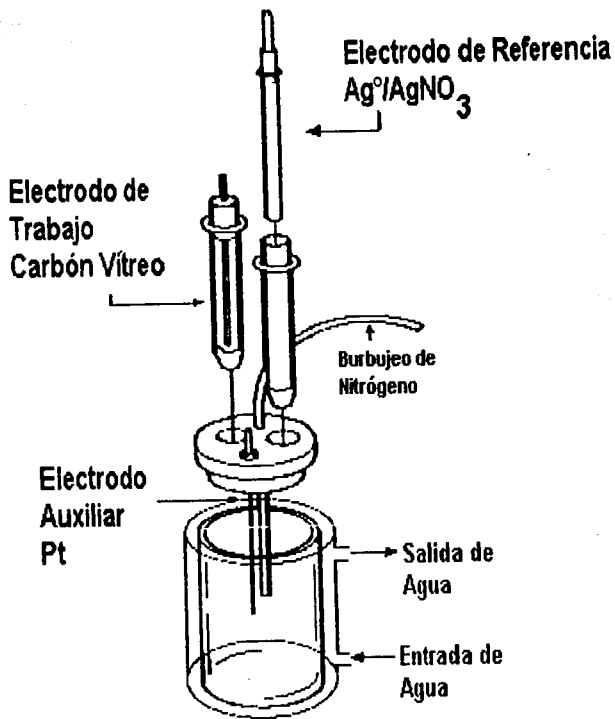
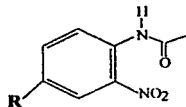


Figura 2.1 Celda electroquímica de trabajo.

Tabla 2.1 Estructura de las nitroacetanilidas estudiadas.



| R | Compuesto | Abreviatura |
|-------------------|--------------------------------------|------------------------|
| -OH | 2-nitro,4-hidroxi acetanilida | 4-OHNA |
| -H | 2-nitro acetanilida | 2-NA |
| -OCH ₃ | 2-nitro,4-metoxiacetanilida | 4- OCH ₃ NA |
| -Br | 2-nitro,4-bromo acetanilida | 4- BrNA |
| -CF ₃ | 2-nitro,4-trifluorometil acetanilida | 4- CF ₃ NA |
| -CN | 2-nitro,4-ciano acetanilida | 4- CNNA |
| -NO ₂ | 2,4-dinitro acetanilida | 4- NO ₂ NA |

Se colocó la solución del medio electrolítico soporte en la celda, suministrándole una corriente de nitrógeno por 50 minutos para desplazar el oxígeno disuelto. Posteriormente se realizó una voltamperometría cíclica desde -3100 a +1830 mV, para comprobar la ausencia de posibles picos de reducción u oxidación en el medio electrolítico. Una vez hecho esto, se preparó la solución del respectivo compuesto bajo estudio.

2.1.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

El efecto de las 2-nitroacetanilidas, 4-sustituidas, se evaluó *in vitro* contra el crecimiento micelial del hongo de pudrición morena Postia placenta. Los compuestos fueron disueltos en 1ml de acetona. La solución se vertió en un tubo de ensaye que contenía 25ml del medio de cultivo (malta-agar 1.5%) previamente esterilizado (121°C, 15 kg/cm², durante 15 minutos). La mezcla se homogenizó completamente con un vortex. Se tomaron 5 alícuotas de 5ml cada una, las cuales se vertieron en 5 cajas Petri (60 x 15 mm).

La cantidad necesaria de acetanilida se calculó para obtener concentraciones finales de aproximadamente 0.25mg/ ml.

Las cajas petri con el medio se dejaron dentro de la campana durante 24 horas para eliminar completamente el disolvente, al término de este período en cada placa de agar se colocó un inóculo (6mm) con una muestra del micelio, la cual se tomó con un sacabocados de un cultivo de dos semanas de crecimiento. Cada experimento consistió de cinco réplicas, las cuales se incubaron en una estufa de cultivo a 29°C durante una 7 días^[53]. El control negativo fue tratado únicamente con acetona y como control positivo se utilizó fenol.

El crecimiento micelial (diámetro de la colonia) de las placas se midió diariamente. La prueba se dio por concluida cuando el micelio de las placas control negativo alcanzó los bordes de la caja Petri. (figura 2.2). La inhibición causada por los extractos y los compuestos sobre el crecimiento micelial fue calculada utilizando la expresión matemática (5):

$$\%Inhibición = \frac{C.C - C.T}{C.C} \times 100\% \quad (5)$$

Donde : C.C. es crecimiento del control.
C.T. es crecimiento del tratamiento

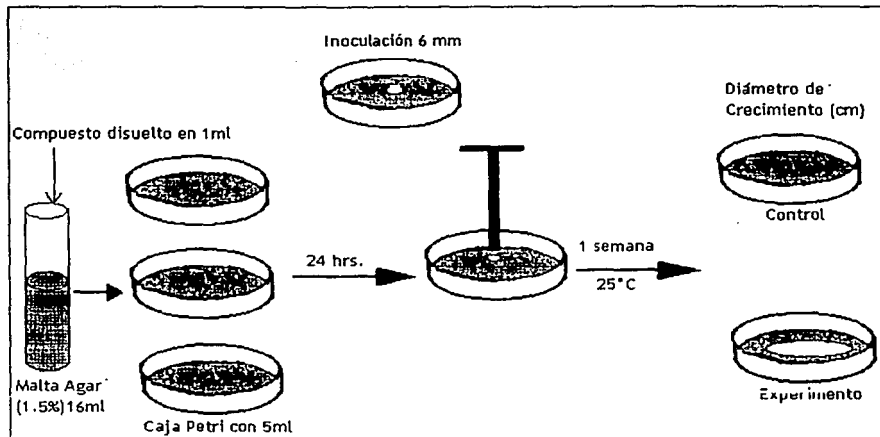


Figura 2.2 Esquema de la metodología experimental para las pruebas de actividad antifúngica de los compuestos estudiados.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

3.1 Estudio de la reducción del grupo nitro y el efecto de los sustituyentes sobre los potenciales rédox.

Se examinó el comportamiento electroquímico de siete 2-nitroacetanilidas. Todos estos compuestos tienen en común un anillo aromático sustituido con los grupos acetamida y nitro en C₁ y C₂ respectivamente. Ellos difieren entre sí, por los efectos inductivos y de resonancia de los sustituyentes (-H, -OMe, -Br, -CF₃, -CN, -NO₂, -OH) en la posición C₄. Los compuestos de esta serie permitieron estudiar la influencia de los sustituyentes sobre su potencial de reducción y relacionar los potenciales de reducción E_{pc1} del grupo nitro, con su actividad fungicida contra *Postia placenta*. El comportamiento electroquímico de las 2-nitro acetanilidas se estudió en medio aprótico polar de acetonitrilo en 0.1M de tetrafluoroborato de tetraetilamonio (ET₄NBF₄). Este medio electrolítico se eligió debido a que en éste se llevó a cabo la disolución completa de los compuestos y también porque en este medio se tiene un intervalo de potencial muy amplio de +1830 mV a -3100 mV.

2-nitroacetanilida (2-NA)

En la figura 3.1 se presenta el voltamperograma cíclico (VC) completo obtenido a una velocidad de barrido de 100mV/s del compuesto padre 2-nitroacetanilida el que muestra el comportamiento típico de las nitroacetanilidas aquí estudiadas.

Se inició el primer segmento en 0.0mV hacia dirección negativa. Durante este primer barrido, el compuesto 2-NA mostró dos picos catódicos localizados en $E_{pc1} = -1394$ mV y $E_{pc2} = -1984$ mV vs Fc^+/Fc que corresponden a la reducción del grupo nitro (tabla 3.1). Al invertir el sentido del potencial $E_{\lambda 1} = -3000$ mV se notó la ausencia de dos picos anódicos correspondientes a los picos estudiados Ic y IIC de la figura 3.1 haciendo evidente la irreversibilidad de estas reacciones. Apareció durante este segundo segmento un pequeño pico anódico a un potencial de $E_{pa} = -625$ mV. Al invertir nuevamente el potencial en $E_{\lambda 2} = 1700$ mV para formar el tercer segmento no se observaron otros picos catódicos aparte de Ic y IIC en la zona comprendida entre 1700mV y -3000 mV. La figura 3.1b muestra únicamente la parte catódica del VC en donde se observa la reducción del grupo nitro.

Con el propósito de investigar la reversibilidad del proceso RNO_2/RNO_2^- (pico Ic) correspondiente a la primera onda se hizo un VC iniciando el barrido en $E_i = -1000$ mV hasta un potencial $E_{\lambda} = -1600$ mV (figura 3.1.c) apareciendo durante el segundo segmento un pico anódico (Ia) con un potencial de oxidación $E_{pa} = -1325$ mV. La separación entre el potencial de pico anódico y el potencial de pico catódico de este proceso mostró un $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 69$ mV. Este valor corresponde a un sistema reversible tomando como referencia al par redox ferricinio-ferroceno que tiene un $\Delta E_p = 69$ mV a 100mV/s, bajo las mismas condiciones experimentales.

Sin embargo, la relación de corriente $i_{pa}/i_{pc} = 0.83$, está alejada del valor correspondiente a una reacción reversible y no corresponde a la reducción de un compuesto nitro en medio aprótico^[53-55], por lo que se deduce que hay algún otro factor que influye en el mecanismo.

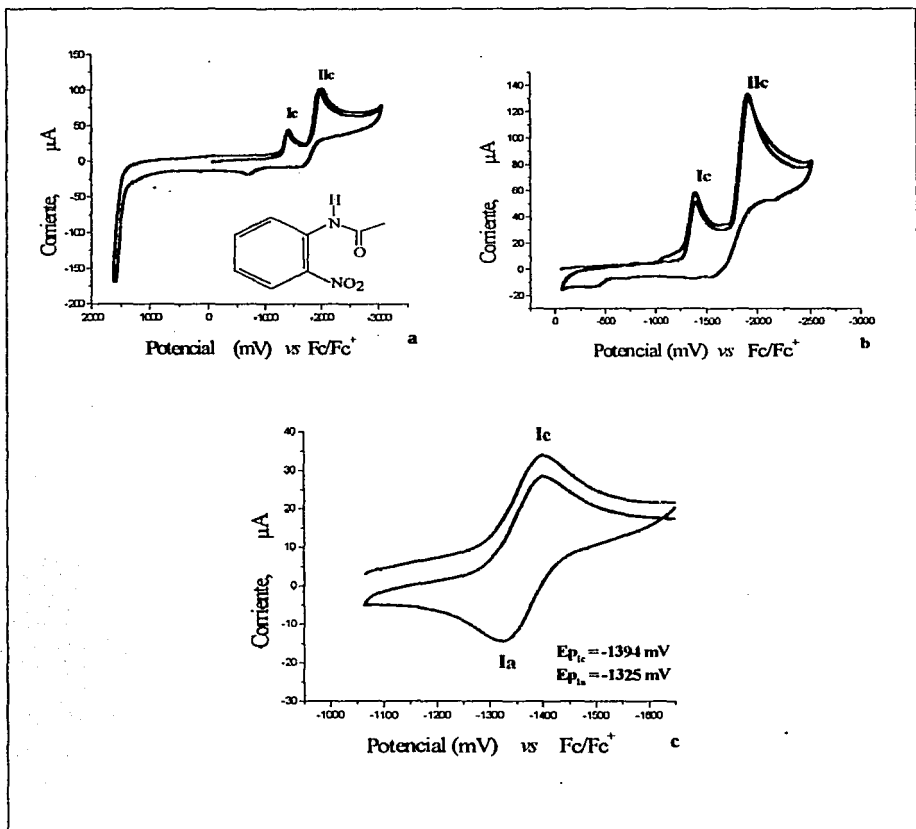


Figura 3.1 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitroacetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -3.0$ V, $E_{\lambda,2} = 1.7$ V, b) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -2.6$ V, c) $E_i = -1.0$ V, $E_{\lambda,1} = -1.60$ V.

4-metoxi-2-nitro acetanilida (4-OCH₃NA)

La presencia del sustituyente metoxilo en el sistema 2-NA causó que, (figura 3.2), el potencial necesario para la reducción de la 4-metoxi-2-nitro acetanilida (4-OCH₃NA) $E_{pc1} = -1373$ mV vs Fc^+/Fc , fuera 21 mV menos catódico que el compuesto padre (tabla 3.1). Se esperaría que este sustituyente por ser un fuerte donador de electrones causaría un aumento en la densidad electrónica del anillo aromático, haciendo la reducción más difícil. Sin embargo, por estar en posición *meta* con respecto al grupo nitro, su efecto inductivo atractor de electrones es mayor que el de resonancia, dejando al centro electroactivo más susceptible a la reducción, lo cual fue evidente tanto para el primero como para el segundo pico de reducción el cual apareció a un $E_{pc2} = -1964$ mV vs Fc^+/Fc .

La figura 3.2-a muestra el VC completo del derivado metoxi, en tanto que en la figura 3.2-b sólo se observa la reducción del grupo nitro. La altura de pico IIc es tres veces la altura del pico Ic, lo que está de acuerdo con el mecanismo propuesto. Al invertir el barrido de potencial en $E_{\lambda} = -2400$ mV aparecieron tres pequeñas ondas localizadas entre -500 mV y -1700 mV. La onda en -725 mV se puede asignar a la reoxidación del nitroso compuesto.

La cuasireversibilidad de la reacción RNO_2/RNO_2^- en este derivado se mostró cuando se hizo su VC iniciando en -1250 mV y aplicando un potencial de cambio $E_{\lambda} = -1600$ mV. Los picos Ic y Ia se localizaron entre $E_{pc1} = -1373$ mV y $E_{pa1} = -1310$ mV, con un $\Delta E_p = 63$ mV y una relación de picos $i_{pa}/i_{pc} = 0.835$. El que la corriente de pico anódico sea menor que la del pico catódico, indica que parte del anión radical producido en el pico Ic, se consume a causa de una reacción química (C) acoplada al proceso electroquímico (E). Esto sugiere la presencia de una reacción de autoprotonación del anión radical con el hidrógeno amídico, ya que es posible que éste, esté formando en el compuesto inicial, un puente de hidrógeno, generando un anillo de seis miembros con uno de los átomos de oxígeno del grupo nitro como se muestra en la estructura de la figura 3.3

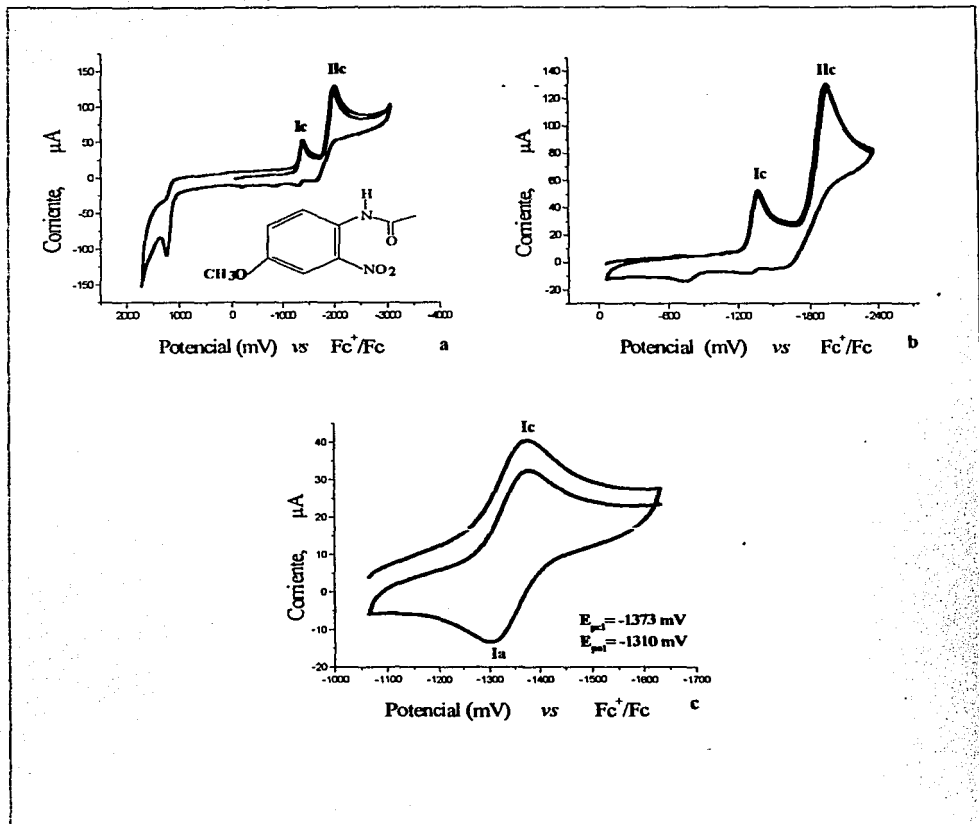


Figura 3.2 Voltamperogramas cíclicos para 4-metoxi-2-nitro acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -3.1$ V, $E_{\lambda,2} = 1.7$ V, b) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -2.4$ V, c) $E_i = -1.15$ V, $E_{\lambda,1} = -1.6$ V.

De acuerdo a ésto, una vez que ha ocurrido la primera transferencia de electrón sobre el nitrógeno, los electrones que forman la doble unión entre el nitrógeno y el oxígeno de grupo nitro, se desplazan hacia el oxígeno, el cual toma al hidrógeno en una reacción química, evitando así que el anión radical se reoxide. Esta reacción química sería seguida a su vez de una segunda transferencia de electrón, siguiendo un mecanismo ECE.

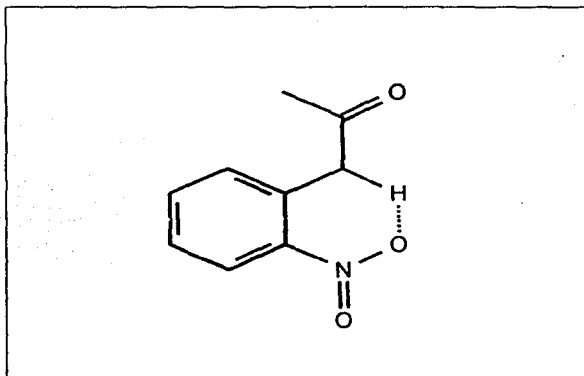


Figura 3.3 Estructura de la 2-NA mostrando la formación del puente de Hidrógeno

Se ha descrito que el potencial del segundo pico catódico está asociado a una serie compleja de reacciones iniciada por el anión-radical $R\text{-NO}_2^{\cdot-}$ (7) al correspondiente dianión (8) ^[9]. Este intermediario fuertemente básico sustrae un protón del medio para producir la especie (9), la que rápidamente pierde un ión hidroxilo para producir nitrosobenceno (10), el cual finalmente se reduce a fenilhidroxilamina (14). (figura 3.2). Los estudios hechos por Bard y sus

colaboradores^[65], acerca del comportamiento electroquímico de nitrobenzono y nitrosobenzono en amoniaco líquido apoyan la secuencia de los pasos mencionados. Ellos encontraron que en ese disolvente el dianión (8) es una especie con un tiempo de vida largo, en donde la transferencia de protones es lenta. Sin embargo, cuando adicionaron alcohol isopropílico como donador de protones, el segundo pico obtenido por experimentos de voltamperometría cíclica aumentó a una altura que corresponde a la transferencia de tres electrones cuando las reacciones mostradas en las ecuaciones II y III (figura 3.4) se iniciaron por la protonación de (8) con isopropanol.

Para comprobar que las dos ondas observadas en la voltamperometría cíclica de la 2-nitroacetanilida correspondieron a la reducción del grupo nitro se determinó el VC del nitrobenzono^[61] (figura 3.5), el cual permitió corroborar que tanto el pico anódico como el catódico de la figura 3.1.c corresponden a la reducción del grupo nitro a su correspondiente anión-radical. La identidad de este anión-radical para el nitrobenzono ha sido confirmada por espectroscopía de resonancia magnética de electrón^[68].

A diferencia del nitrobenzono, la 2-nitroacetanilida presenta en la posición *orto* con respecto al grupo nitro, un grupo amida, el cual es un grupo electroattractor, dando como resultado que la reducción al anión-radical del grupo nitro de la 2-nitroacetanilida fuese 177 mV menos catódica $E_{pc1} = -1394$ mV vs Fc^+/Fc , que la correspondiente reducción en el nitrobenzono, el que se encuentra en $E_{pc1} = -1571$ mV vs Fc^+/Fc bajo las mismas condiciones experimentales. Además la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre uno de los oxígenos del grupo nitro y el hidrógeno amídico, ayudando a hacer más fácil en la 2-nitroacetanilida la ganancia de un electrón por el nitrógeno del grupo nitro, generando así el anión -radical correspondiente (figura 3.3).

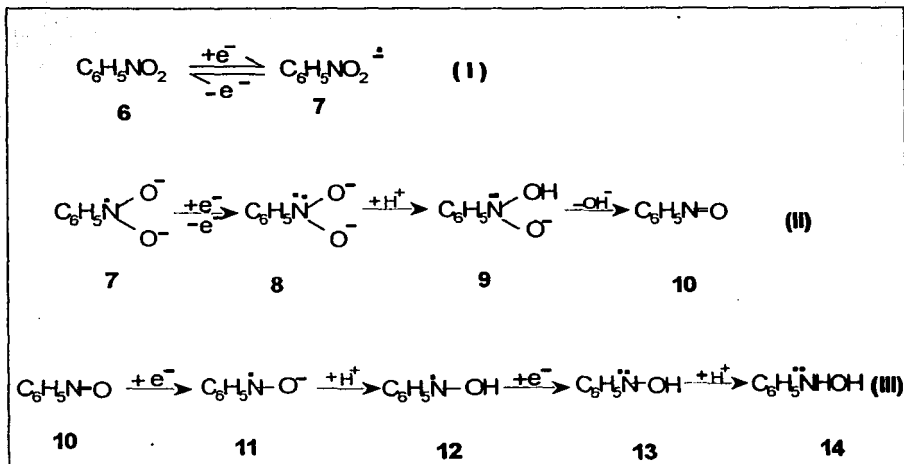


Figura 3.4 Mecanismo de reducción para el grupo nitro aromático en medio aprótico..

El voltamperograma del nitrobenzeno (figura 3.5-a) también presenta un segundo pico catódico a $E_{pc2} = -2027$ mV vs Fc^+/Fc correspondiente a la serie de reacciones que conducen al $\text{R-NO}_2^{\cdot -}$ hasta R-NH-OH y de igual manera, no presenta un pico anódico asociado, lo que hace evidente su naturaleza irreversible, permitiendo corroborar lo observado en la 2-nitro acetanilida.

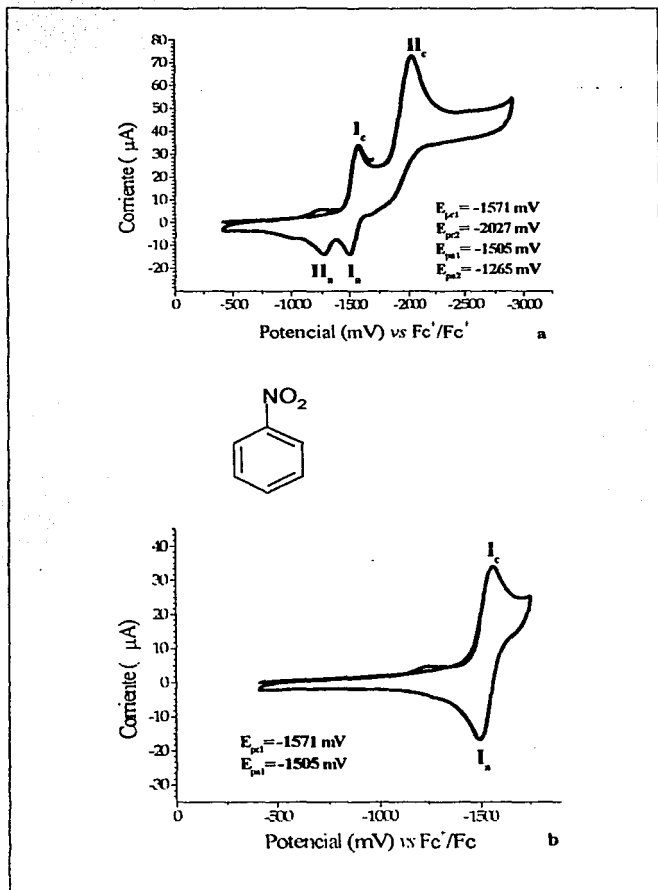


Figura 3.5 Voltamperogramas cíclicos del nitrobenzeno 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm^2), electrodo de referencia $\text{Ag}^0/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_{\lambda,1} = -2.92 \text{ V}$, b) $E_{\lambda,1} = -1.77 \text{ V}$

Como se observa en la figura 3.1-a el VC mostró únicamente los picos correspondientes al grupo nitro y no apareció alguna otra señal que mostrara la reducción del grupo acetanilida: Para verificar que bajo las condiciones experimentales usadas el grupo acetamida es electroinactivo, se llevó a cabo un experimento de VC de acetanilida (figura 3.6). En este VC no se observó alguna señal de óxido-reducción en el intervalo de potencial comprendido entre 1000 mV y -3000 mV vs Fc^+/Fc por lo que se corroboró que la función amida no se redujo.

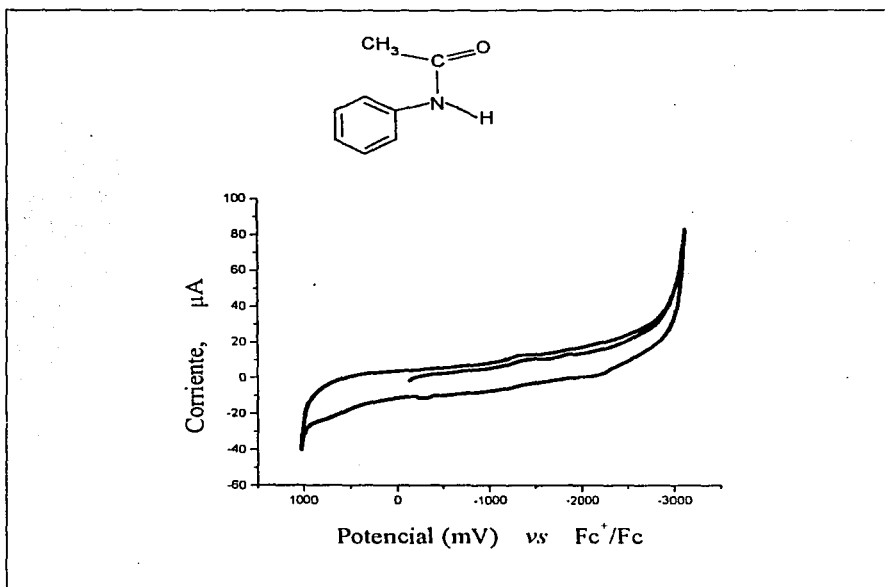


Figura 3.6 Voltamperograma cíclico de la Acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vitreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $Ag^+/AgNO_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. $E_i=0.0$ V, $E_{\lambda 1}=-3.0$ V, $E_{\lambda 2}=1.0$ V,

Cuando a la 2-nitroacetanilida se le sustituyó con grupos donadores ó atractores de electrones en la posición C₄ del anillo aromático (posición *meta* con respecto al grupo nitro), se observó que la electroreducción del grupo nitro en los derivados, mostró el comportamiento electroquímico del compuesto padre (2-nitro acetanilida). Y de acuerdo al comportamiento esperado, los sustituyentes donadores de electrones aumentaron la densidad electrónica en el grupo electroactivo (grupo nitro) provocando con ello que se necesite mayor cantidad de energía para lograr su reducción haciendo a los potenciales más negativos, los sustituyentes electroatractores disminuyeron la densidad electrónica del grupo electroactivo, haciendo menor la cantidad de energía requerida para su reducción, llevando a los potenciales a potenciales menos negativos.

4-Bromo-2-nitro acetanilida (4- BrNA)

Debido a que los halógenos son considerablemente mas electronegativos que el carbono, se genera un momento dipolar en el enlace carbono-halógeno. No obstante, estos elementos poseen también pares de electrones no compartidos que pueden deslocalizarse en los haluros de arilo hacia el anillo bencénico. De esta manera, los halógenos presentan un equilibrio entre la atracción de electrones via efecto inductivo y la donación de electrones por efecto de resonancia.

El derivado 4-bromo-2-nitro acetanilida mostró un potencial de reducción para la primera transferencia de electrones, $E_{pc1} = -1269$ mV, 125 mV menos negativo que el potencial E_{pc1} correspondiente a 2-NA (Tabla 3.1 y figura 3.7-c). Este comportamiento indica, que en este caso la atracción de electrones del bromo es más pronunciado que su efecto donador.

El VC de la figura 3.7-b muestra los picos I_c y II_c en -1269 mV y -1872 mV respectivamente además de la presencia de dos pequeños picos anódicos en

-1606 mV, -1441 mV Correspondientes al pico IIc y una onda anódica más intensa localizada en -709 mV debido a la oxidación del grupo nitroso.

La cuasireversibilidad del primer pico de reducción del grupo nitro se muestra en el VC de la figura 3.7-c. Los picos Ic y Ia corresponden a la reacción $\text{RNO}_2 + 1\text{e}^- \rightleftharpoons \text{RNO}_2^-$ y están situados en $E_{pc1} = -1269\text{mV}$ y $E_{pa1} = -1206\text{ mV}$, con un $\Delta E_p = 63\text{mV}$ y una relación de corrientes $i_{pa}/i_{pc} = 0.733$ (Tabla 3.1)

4-Trifluorometil-2-nitro acetanilida (4- CF₃NA)

Debido a su fuerte efecto inductivo atractor de electrones, el sustituyente trifluorometil (-CF₃) dió como consecuencia que la reducción del grupo nitro en 4-CF₃NA ocurriera a un potencial menos negativo que el del compuesto padre. El primer pico de reducción Ic está localizado en $E_{pc1} = -1251\text{ mV}$ en tanto que el pico IIc apareció en -1893 mV (figura 3.8-a, tabla 3.1). La zona anódica del VC de la figura 3.8-b es más complicada que en los otros compuestos, mostrando que se están llevando a cabo reacciones de oxidación de los productos formados en el pico IIc. El pico anódico cercano a -625 mV observado en los derivados anteriores no apareció en este compuesto.

La cuasireversibilidad del primer pico de reducción se observa en la figura 3.8-c, en donde el pico Ic aparece en $E_{pc1} = -1251\text{ mV}$ y el pico Ia en $E_{pa1} = -1186\text{ mV}$ con un $\Delta E_p = 65\text{ mV}$ y una relación de corrientes $i_{pa}/i_{pc} = 0.920$ (Tabla 3.1).

Ha sido descrito en la literatura^[56] que la presencia de un grupo trifluorometil en un nitroaromático permite observar la presencia del compuesto nitroso, el cual usualmente no aparece en los VC de los compuestos nitroaromáticos, debido a que se acopla fácilmente con las hidroxilaminas ó se dimeriza para formar azoxicompuestos^[57].

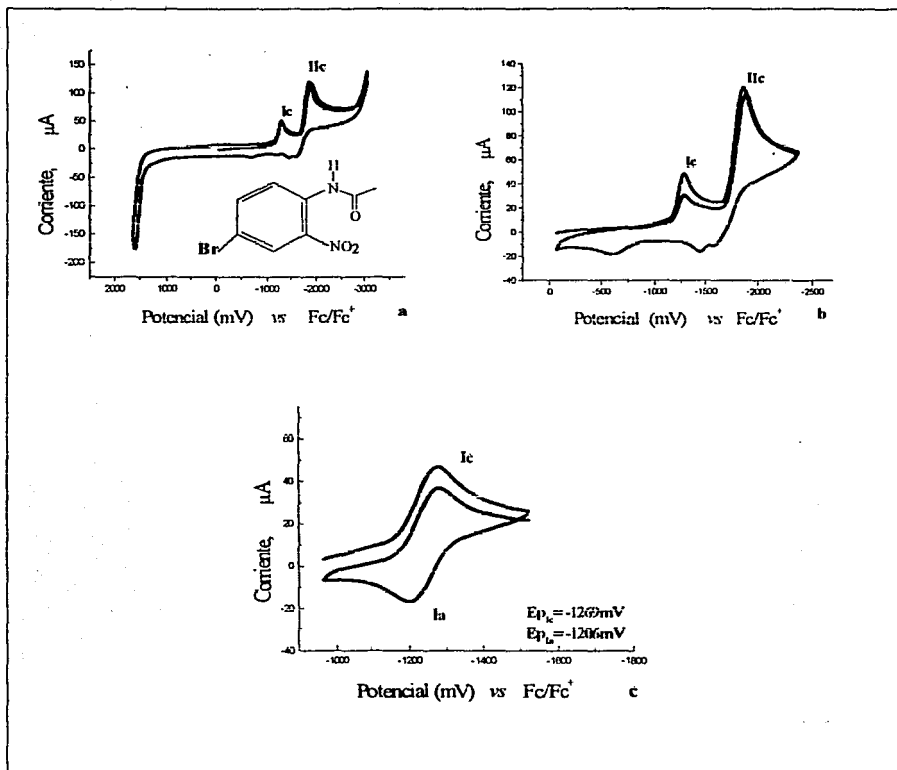


Figura 3.7 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitro-4-bromo acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vitreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $Ag^+/AgNO_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda 1} = -3.0$ V, b) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda 1} = -2.3$ V, c) $E_i = -1.0$, $E_{\lambda 1} = -1.6$ V.

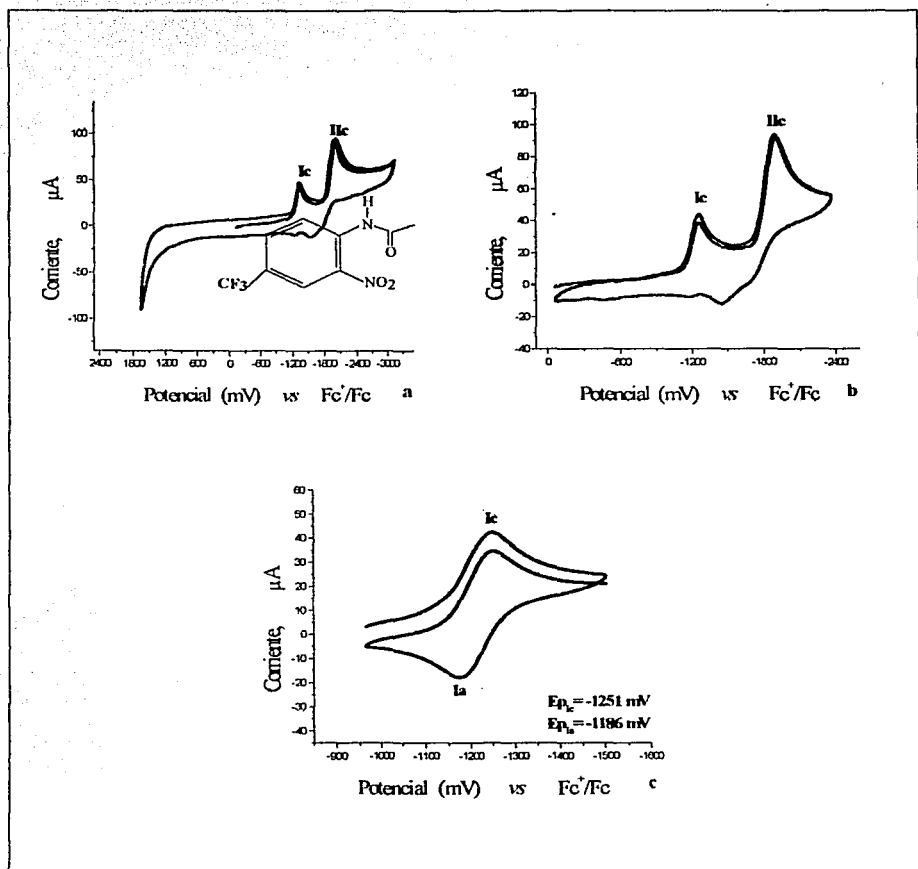


Figura 3.8 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitro-4-trifluorometil acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $Ag^+/AgNO_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -3.0$ V, b) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda,1} = -2.3$ V, c) $E_i = -1.0$, $E_{\lambda,1} = -1.6$ V.

Se sabe también, que bajo la influencia de potenciales suficientemente negativos, la transferencia del electrón al intermediario nitroso puede efectivamente competir con las reacciones de acoplamiento intermolecular para producir hidroxilamina y compuestos amino^[58]. Consecuentemente, el intermediario nitrosobenceno no se detecta comúnmente en la reducción de los compuestos nitroaromáticos. Sin embargo, una notable excepción a esto se encontró en la reducción electroquímica de *orto* y *meta*-trifluorometilnitrobenzenos en dimetilformamida^[59]. De acuerdo a esto, la gran estabilidad del compuesto *o*-nitrosotrifluorobenceno relativa a posteriores reacciones de reducción y acoplamiento se debe a la estructura contribuyente I (figura 3.9)

El intermediario *p*-sustituido no mostró el pico correspondiente a la oxidación del nitrosocompuesto por ser más susceptible a una posterior reducción de un electrón a partir de la estructura contribuyente II. De acuerdo a este modelo la estabilidad del isómero *meta* estaría entre las estabilidades de los intermediarios I y II. (figura 3.9)

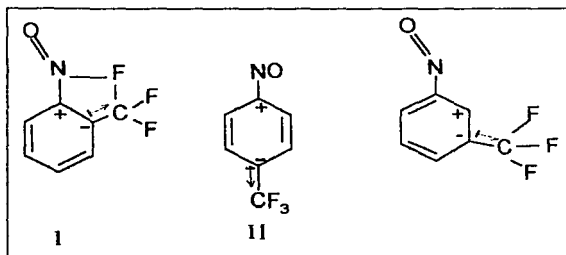


Figura 3.9.- Estructuras de los Intermediarios de 2-nitro,4-trifluorometil acetanilida.

Sin embargo, en el presente estudio la 4-trifluorometil-2-nitro acetanilida (figura 3.8) no mostró en su VC la onda de oxidación del nitroso compuesto, el cual ocurre a potenciales más anódicos del primer paso de reducción y sólo cuando se han alcanzado potenciales más negativos que la segunda onda de reducción. El sustituyente amida con su efecto donador de electrones neutraliza el efecto del grupo 4-trifluorometil, recuperando el grupo nitroso su reactividad usual.

4-Ciano-2-nitro acetanilida (4- CNNA)

El efecto de resonancia atractor de electrones en sustituyentes tales como el grupo ciano, dio como consecuencia que la reducción del grupo nitro en la 4- CNNA (figura 3.10-a) presentara cambios hacia potenciales positivos mucho más pronunciados que en el caso de los sustituyentes atractores de electrones, tales como el grupo trifluorometil (figura 3.8) y halógeno (figura 3.7) en los cuales la capacidad atractora de electrones es debido a su efecto inductivo.

El VC de este compuesto (figura 3.10-a) es más complejo que el de los derivados anteriores. Durante el primer barrido se observaron los picos I_c y II_c localizados en $E_{pc1} = -1207$ mV y $E_{pc2} = -1855$ mV, correspondientes a las reacciones $RNO_2 + 1e^- \rightleftharpoons RNO_2^-$ y $RNO_2^- \rightleftharpoons RNHOH$ respectivamente. Al invertir el barrido de potencial en $E_2 = -2500$ mV se encontraron una onda y un pico anódicos en -1675 mV y -1515 mV debidos a la oxidación de los productos obtenidos en II_c. La figura 3.10-c muestra que en este compuesto la reacción $RNO_2 + 1e^- \rightleftharpoons RNO_2^-$ parecería de naturaleza reversible, en $E_{pc1} = -1207$ mV y $E_{pa1} = -1153$ mV y un $\Delta E_p = 54$ mV. Sin embargo, relación de corrientes $i_{pa}/i_{pc} = 0.840$ dista del valor igual a la unidad, característico de un sistema reversible (Tabla 3.1), lo cual indicaría, al igual que en las 2-nitro acetanilidas anteriores, la presencia de una reacción química acoplada a la primera transferencia de carga.

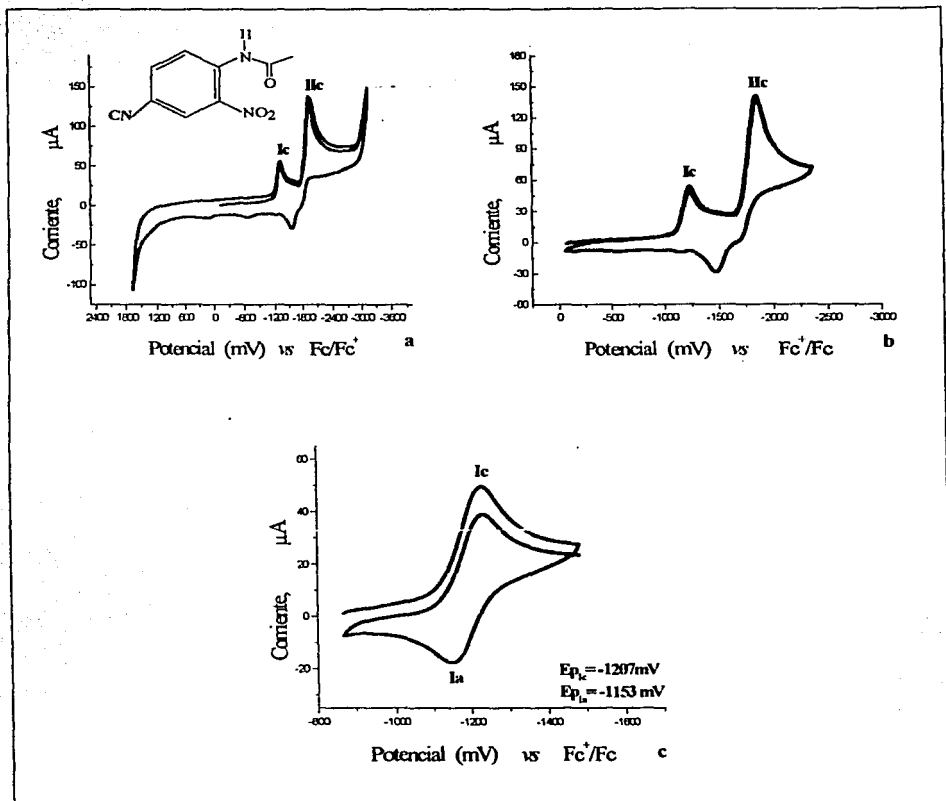


Figura 3.10 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitro-4-ciano acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm^2), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0 \text{ V}$, $E_{\lambda_1} = -3.0 \text{ V}$, b) $E_i = 0.0\text{V}$, $E_{\lambda_1} = -2.3 \text{ V}$, c) $E_i = -1.0$, $E_{\lambda_1} = -1.6 \text{ V}$.

2,4-dinitro acetanilida (4- NO₂NA).

La presencia de un segundo grupo nitro en la estructura de la 2-NA hizo que el VC de la 2,4-dinitro acetanilida fuera más complejo que el observado en los otros derivados. Este segundo grupo nitro, debido a su efecto de resonancia atractor de electrones, modifica sustancialmente el entorno electrónico del grupo nitro en C₂ el cual se encuentra en posición *meta* con respecto a él, dando como resultado que la primera transferencia de electrones observada en el VC de este compuesto, ocurra a un potencial menos negativo $E_{pc1} = -1183$ mV que la correspondiente al compuesto padre 2-NA la cual aparece en $E_{pc1} = -1394$ mV.

El VC completo de este compuesto se muestra en la figura 3.11-a. El barrido hacia potenciales negativos se inició en 0.0mV observándose cuatro picos catódicos irreversibles I_c, I_{IIc}, I_{IIIc} y I_{IVc} localizados en -1183 mV, -1706 mV, -1980 mV y -2290 mV respectivamente. Los picos I_c y I_{IIc} se deben a la reducción del primer grupo nitro, posiblemente el que está formando el puente de hidrógeno con la amida, ya que debe reducirse a potenciales menos negativos que el otro grupo nitro. Los picos I_{IIIc} y I_{IVc} se deben a su vez a la reducción del grupo nitro en la posición C₄ y van a potenciales muy negativos debido a que en el potencial del pico I_{IIc} el primer grupo nitro, ha sido convertido de un fuerte grupo atractor a un fuerte grupo donador de electrones como es la hidroxilamina (RNHOH). En el segundo segmento del VC aparecieron dos pequeños picos anódicos localizados en -1893 mV y -1498 mV. El VC de la figura 3.11-b muestra únicamente la zona electroactiva del sistema. Al hacer un siguiente VC con $E_i = 0.0V$ y $E_{\lambda 1} = -2.1V$ (figura 3.11-c) se comprobó que los picos anódicos encontrados, no se deben a la oxidación de los productos formados en I_{IVc}, ya que la zona anódica comprendida entre cero y $-2.1V$ es igual en los voltamperogramas b y c de la figura 3.11. Se observó además que el pico I_{IIa} podría estar asociado al pico I_{IIIc}.

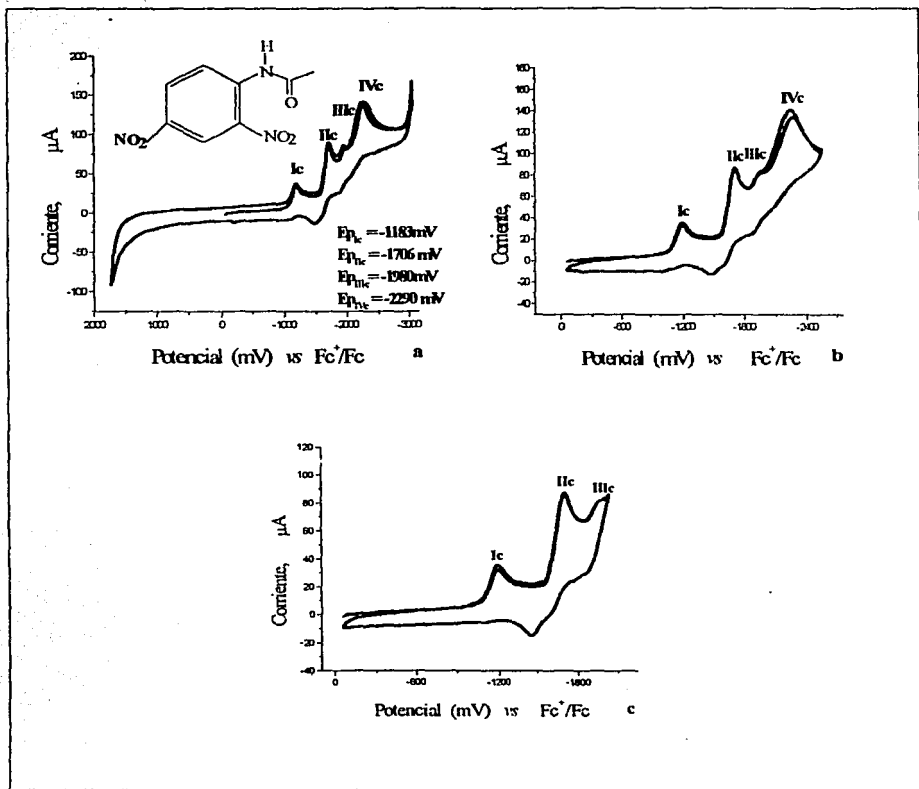


Figura 3.11 Voltamperogramas cíclicos para 2,4-dinitro acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vitreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $Ag^+/AgNO_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda 1i} = -3.0$ V , b) $E_i = 0.0$ V, $E_{\lambda 1i} = -2.5$ V, c) $E_i = -1.0$ V, $E_{\lambda 1i} = -1.9$ V.

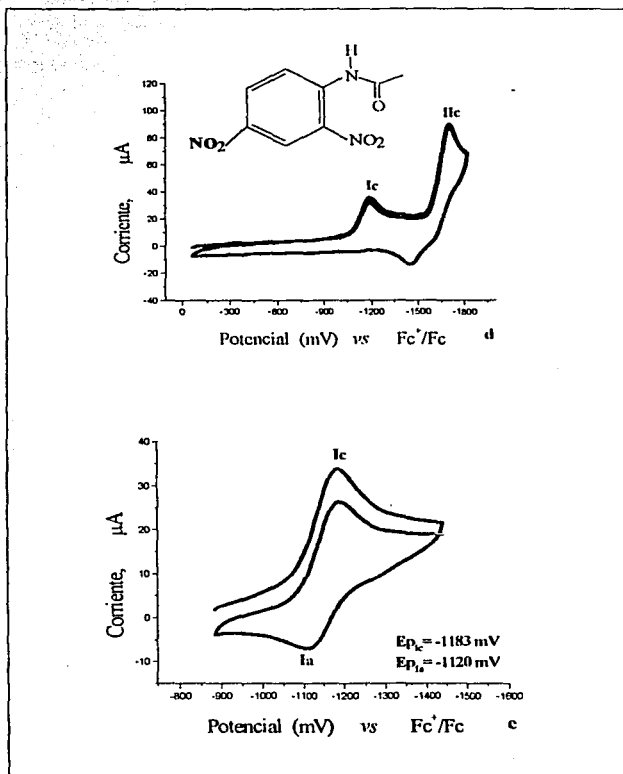
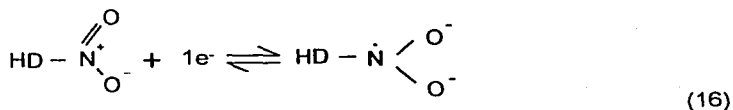


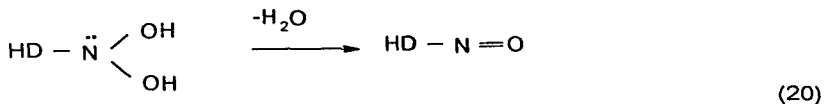
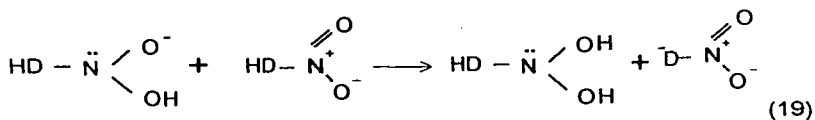
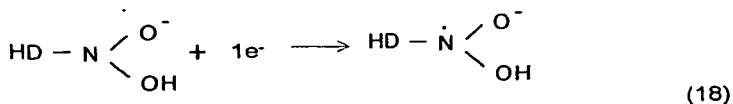
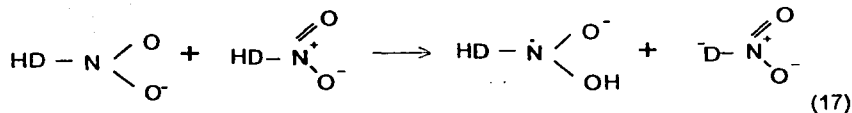
Figura 3.11 Voltamperogramas cíclicos para 2,4-dinitro acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vítreo (7.069 mm^2), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. d) $E_i = 0.1 \text{ V}$, $E_{\lambda 1} = -1.9 \text{ V}$, e) $E_i = 0.9 \text{ V}$, $E_{\lambda 1} = -1.5 \text{ V}$.

tres picos anódicos Ia, IIa y IIIa a potenciales $E_{pa1}= 604\text{mV}$, $E_{pa2}= 1013\text{mV}$ y $E_{pa3}= 1506\text{ mV}$. El VC de la figura 3.12-b muestra que iniciando de cero hasta potenciales positivos, éste VC es básicamente parecido al de la figura 3.12-a, con lo que se prueba que los picos Ia, IIa y IIIa no se deben a la transformación de los productos obtenidos de la reducción del grupo nitro. Estos picos pueden asignarse a la oxidación del grupo fenólico.

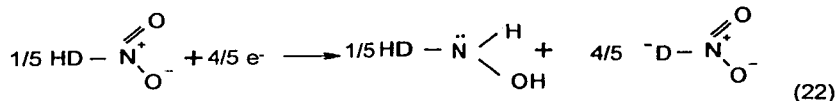
El patrón observado en el compuesto 4-OHNA, corresponde a la reducción del grupo nitro en presencia de protones ácidos. Como en este caso el VC se obtuvo en un medio aprótico de acetonitrilo consecuentemente, el mecanismo de reducción se ve influenciado por la presencia del protón fenólico en la estructura de este compuesto. Este comportamiento está de acuerdo con lo publicado en algunos trabajos en donde muestran que la electro-reducción de nitroarenos es de naturaleza multielectrónica, en donde los aniones-radicales intermediarios presentan un fuerte carácter básico y una gran reactividad hacia donadores de protones presentes ya sea en el medio de reacción, en el disolvente o aun con los protones presentes en la molécula por medio de reacciones de autoprotonación^[60].

De acuerdo a lo encontrado en los voltamperogramas de compuestos similares tales como las nitrogabacinamidas y niclosamida (figura 3.14-a y b)^[61], se puede asignar la onda Ic a la electro-reducción del grupo nitro en presencia de un donador de protones interno, en este caso el protón fenólico. Esto da lugar al mecanismo que a continuación se muestra y en donde DH denota al grupo donador de protones de la molécula:

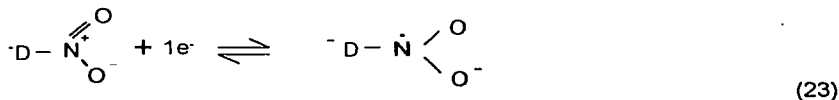




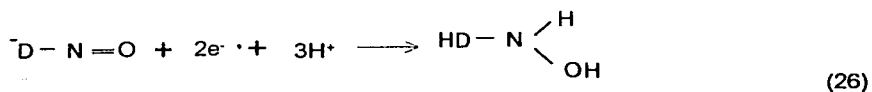
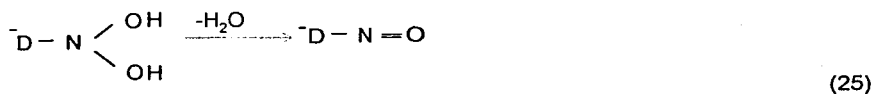
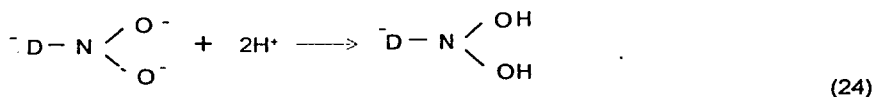
Debido a que el potencial de reducción del compuesto nitroso es menos negativo que el del correspondiente compuesto nitro^[62] la reacción (21) se lleva a cabo en la misma onda Ic. Es conveniente mencionar que los protones necesarios para la reacción de reducción (21) provienen también de las moléculas del compuesto nitro (HD-NO₂), en donde el proceso global de reducción en la onda Ic está dado por la ecuación (22):



A su vez el pico de reducción IIc corresponde a la electro-reducción de la especie desprotonada, ecuación (23):



La cual da lugar al dianión desprotonado el que puede tomar protones del medio, dando:



La relación de corriente de los picos IIc y IIIc es aproximadamente 1:3, lo cual está de acuerdo con el mecanismo propuesto, la transferencia de uno y tres electrones en los picos IIc y IIIc respectivamente para obtener finalmente hidroxilamina.

Los voltamperogramas de la figura 3.12-c y d muestran una pequeña inflexión en la zona anódica la que puede estar asociada al pico IIc, indicando la

reversibilidad de la reacción (23). En tanto que en las figuras 3.13-a y b se comprueba que la cascada de reacciones que se lleva a cabo en el pico 1c (reacciones 16-21) da lugar a un proceso irreversible.

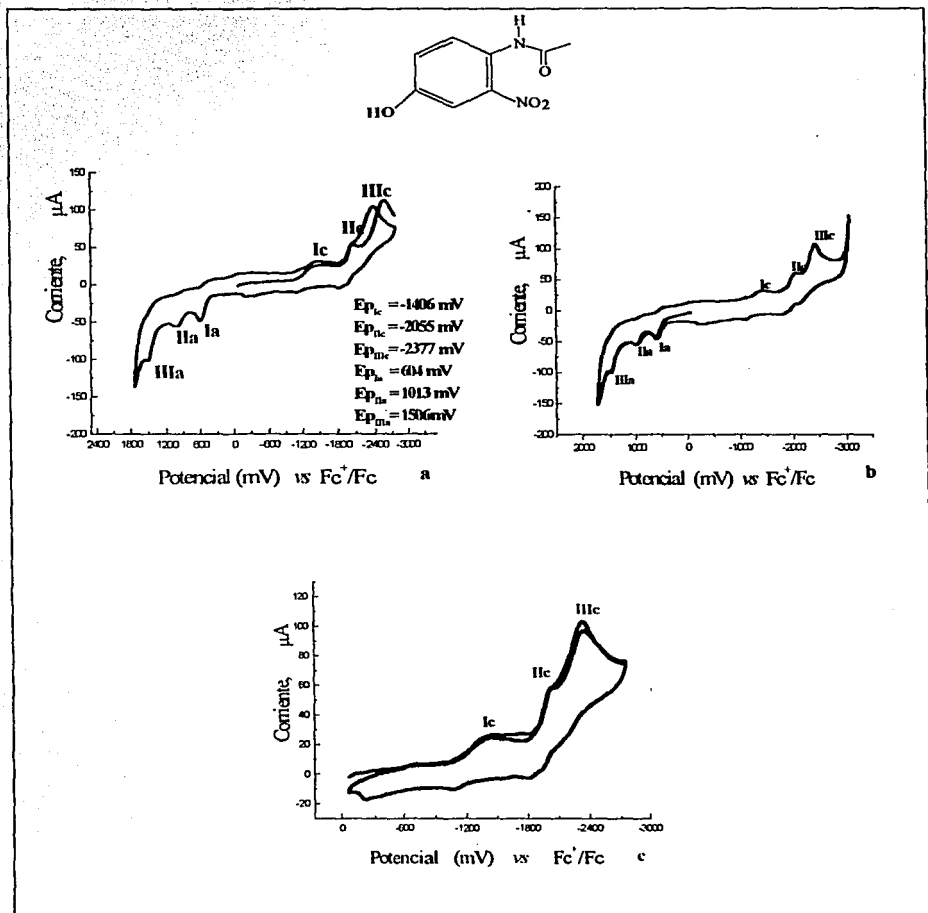


Figura 3.12 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitro,4-hidroxi acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vitreo (7.069 mm^2), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) $E_i = 0.0 \text{ V}$, $E_{\lambda_1} = -3.0 \text{ V}$, $E_{\lambda_2} = 2.0 \text{ V}$ b) $E_i = 0.0 \text{ V}$, $E_{\lambda_1} = 1.8 \text{ V}$. c) $E_i = 0.0 \text{ V}$, $E_{\lambda_1} = -2.35 \text{ V}$

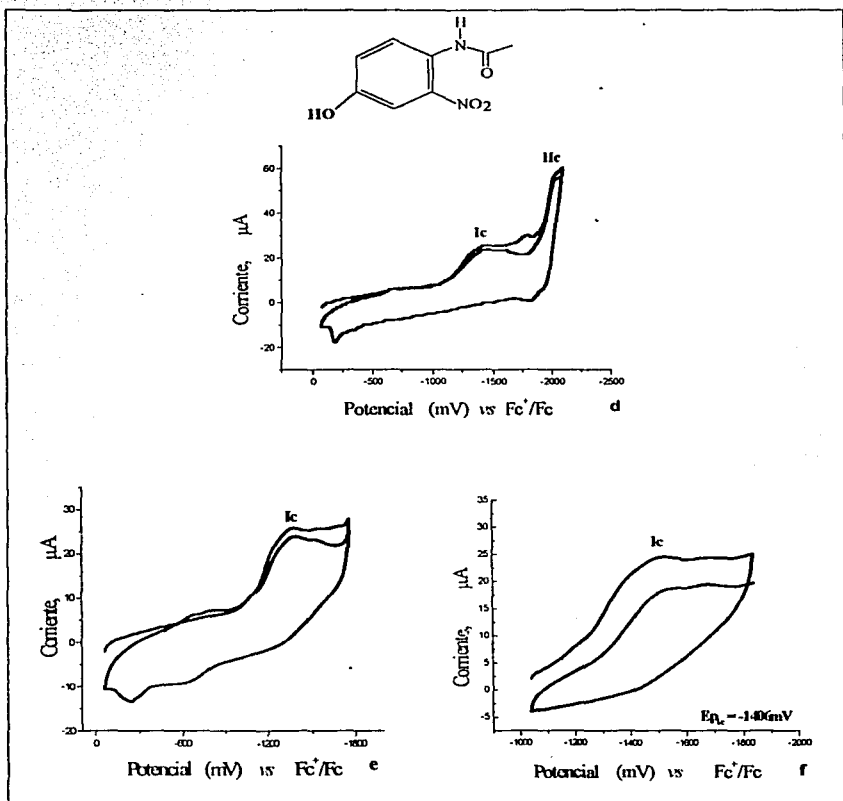
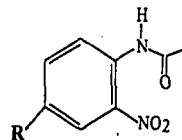


Figura 3.12 Voltamperogramas cíclicos para 2-nitro,4-hidroxi acetanilida 1mM en un medio de Et_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo carbón vitreo (7.069 mm²), electrodo de referencia $\text{Ag}^+/\text{AgNO}_3$ 5mM en CH_3CN , electrodo auxiliar de Pt. Velocidad de barrido 100 mV/s. d) $E_i = -0.2$ V, $E_{\lambda 1} = -1.9$ V e) $E_i = 1.05$ V, $E_{\lambda 1} = -1.9$ V.

III.- Resultados y Discusión

Tabla 3.1. Parámetros electroquímicos para la reducción del grupo nitro a su correspondiente radical anión y la subsecuente reducción a hidroxilamina. Para las 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas estudiadas.



| Compuesto | R | Vol. Mol. (cm ³)±3 ^c | E _{pc1} ^a (mV) | E _{pa1} ^a (mV) | E _{pc2} ^a (mV) | ΔE _p ^a (mV) | i _{pa} /i _{pc} ^a | Do x10 ⁻⁵ (cm ² s ⁻¹) ^a | k x10 ⁻² (s ⁻¹) ^a | k _s x10 ⁻² ^b (cms ⁻¹) |
|---------------------------|-------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| NITROBENCENO ^d | --- | --- | -1571 | -1505 | -2027 | 66 | 0.990 | --- | --- | --- |
| 4-OHNA | -OH | 132.7 | -1406 | --- | -2055 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2-NA | -H | 134.3 | -1394 | -1325 | -1984 | 69 | 0.830 | 2.907 | 14.954 | 2.490 |
| 4- OCH ₃ NA | -OCH ₃ | 158.3 | -1373 | -1310 | -1964 | 63 | 0.835 | 1.591 | 63.200 | 2.335 |
| 4- BrNA | -Br | 150.5 | -1269 | -1206 | -1872 | 63 | 0.733 | 1.542 | 33.294 | 2.807 |
| 4- CF ₃ NA | -CF ₃ | 183.5 | -1251 | -1186 | -1893 | 65 | 0.920 | 1.202 | 33.828 | 2.044 |
| 4- CNNA | -CN | 160.5 | -1207 | -1153 | -1855 | 54 | 0.840 | 2.569 | 15.494 | 1.992 |
| 4- NO ₂ NA | -NO ₂ | 146.1 | -1183 | -1120 | -1706 | 63 | 0.400 | 1.353 | 24.173 | 1.973 |

^a Obtenidos por voltamperometría cíclica. Velocidad de barrido 100 mV/s, ^bObtenidos por cronocoulombimetría de doble pulso, ^cObtenido por cálculo teórico en PC, ^d Datos obtenido de la bibliografía.

3.2 Análisis de los Parámetros Voltamétricos. i_{pc} , $i_{pc}/v^{1/2}$ e i_{pa}/i_{pc} .

Se llevó a cabo el estudio de los parámetros voltamperométricos, lo que permite tener un conocimiento mas completo de la naturaleza de una reacción electroquímica particular.

3.2.1 Gráficas i_{pc} vs $v^{1/2}$.

El análisis de las gráficas de corriente de pico con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en las 2-nitro acetanilidas,4-sustituídas (figura 3.13) mostró en todos los casos un comportamiento lineal en el intervalo de velocidad comprendido entre 10 y 5000 mV/s, mostrando que el transporte de masa se lleva a cabo por difusión.

Únicamente en el caso de la 4-bromo,2-nitro acetanilida se observó que la recta presenta intersección en cero, en los otros compuestos, la pendiente se desvía de ese valor, lo que indica que existen en este proceso complicaciones cinéticas. Estos resultados indican que después de la transferencia de carga asociada al proceso $ArNO_2/ ArNO_2^{\cdot-}$, se forma un puente de hidrógeno entre uno de los oxígenos del grupo nitro y el hidrógeno de la amida, causando que solo parte del anión radical pueda reoxidarse al grupo nitro.

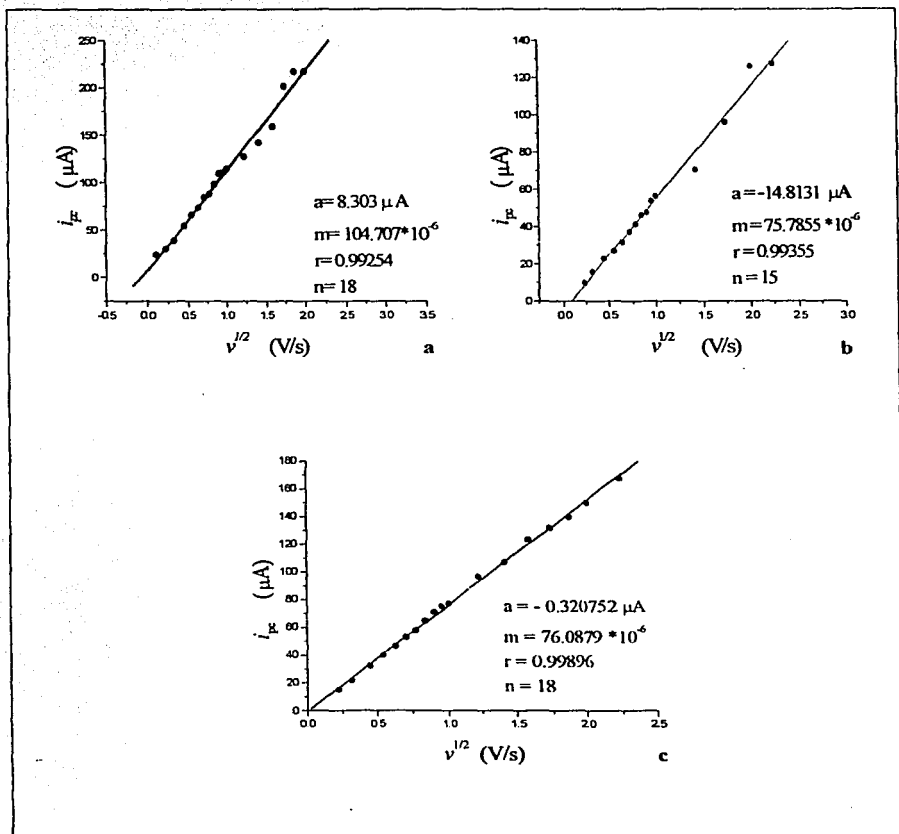


Figura 3.13 Comportamiento de la corriente de pico catódico i_{pc} con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para a) 2-nitro acetanilida, b) 4-metoxi,2-nitro acetanilida y c) 4-bromo,2-nitro acetanilida

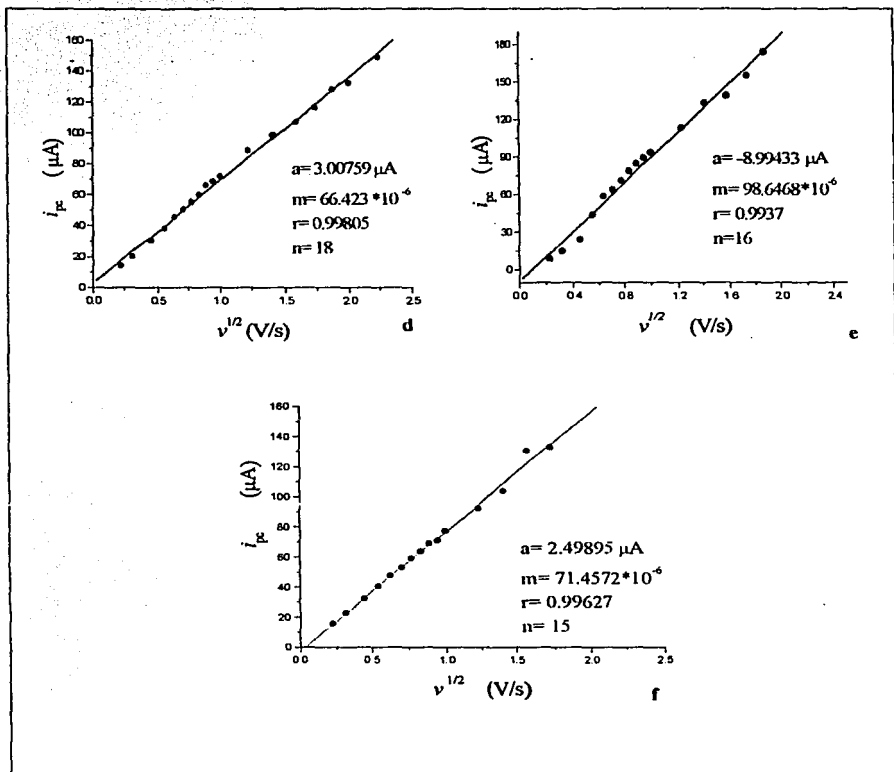


Figura 3.13 Comportamiento de la corriente de pico catódico i_{pc} con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para d) 4-trifluorometil,2-nitro acetanilida, e) 4-ciano,2-nitro acetanilida y f) 2,4-dinitro acetanilida

Un experimento que comprobó la influencia del puente de hidrógeno en la reducción de las 2-nitro acetanilidas, consistió en que después de haber hecho la VC de la 2-nitro acetanilida en acetonitrilo, se procedió a correr un segundo VC ahora en presencia de fenolato de tetrabutilamonio 48 mM. Se observó que al analizar la gráfica de i_{pa}/i_{pc} vs $\log v$, se alcanzó el valor de la unidad, el cual no cambio aún a altas velocidades de barrido de potencial. Este experimento demostró que al ser eliminado el protón amídico por el fenolato en una típica reacción ácido-base, se recuperó el comportamiento rédox normal de los grupos nitro en medio aprótico (figura 3.14).

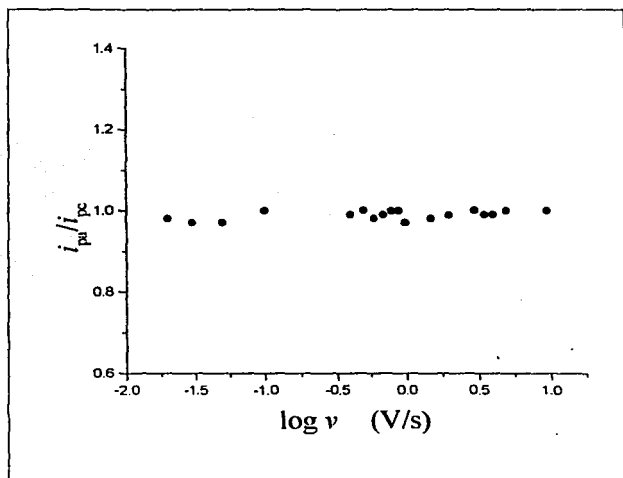


Figura 3.14 Gráfica de la relación de corriente anódica a corriente catódica (i_{pa}/i_{pc}) versus la velocidad de barrido (v) de 2-nitro acetanilida en presencia de fenolato de tetrabutilamonio 48 mM.

3.2.2 Análisis de la relación i_{pa}/i_{pc} vs v

Las gráficas de las 2-nitro acetanilidas,4-sustituídas (figura 3.15 y tabla 3.1) mostraron que la relación i_{pa}/i_{pc} vs velocidad en ninguno de los casos fue igual a la unidad y que varió considerablemente con la velocidad de barrido especialmente a altas velocidades.

El compuesto 4-NO₂NA fue el que mostró el mejor comportamiento ya que presentó una relación constante $i_{pa}/i_{pc} \cong 0.6$ de 10 mV/s hasta 5000 mV/s. La 2-nitro acetanilida,4-sustituída que mostró mayores variaciones de esta relación con la velocidad fue 4-CF₃NA (figura 3.15-d, tabla 3.1). Estos datos apoyan la idea que el mecanismo de reducción de estos compuestos es el típico mostrado por los compuestos nitro en medio aprótico, el mecanismo EEC. El que la relación de corrientes en ningún momento tuviese el valor de uno corrobora la presencia del puente de hidrógeno.

El puente de hidrógeno hace que el proceso rédox correspondiente en todas las 2-nitroacetanilidas ocurra a potenciales más positivos que en el nitrobenzeno (tabla 3.1) manteniéndose en cierta medida la reversibilidad del proceso. La relación de corrientes entre los picos I_c y II_c es aproximadamente 1:3, lo cual está de acuerdo con un mecanismo EEC.

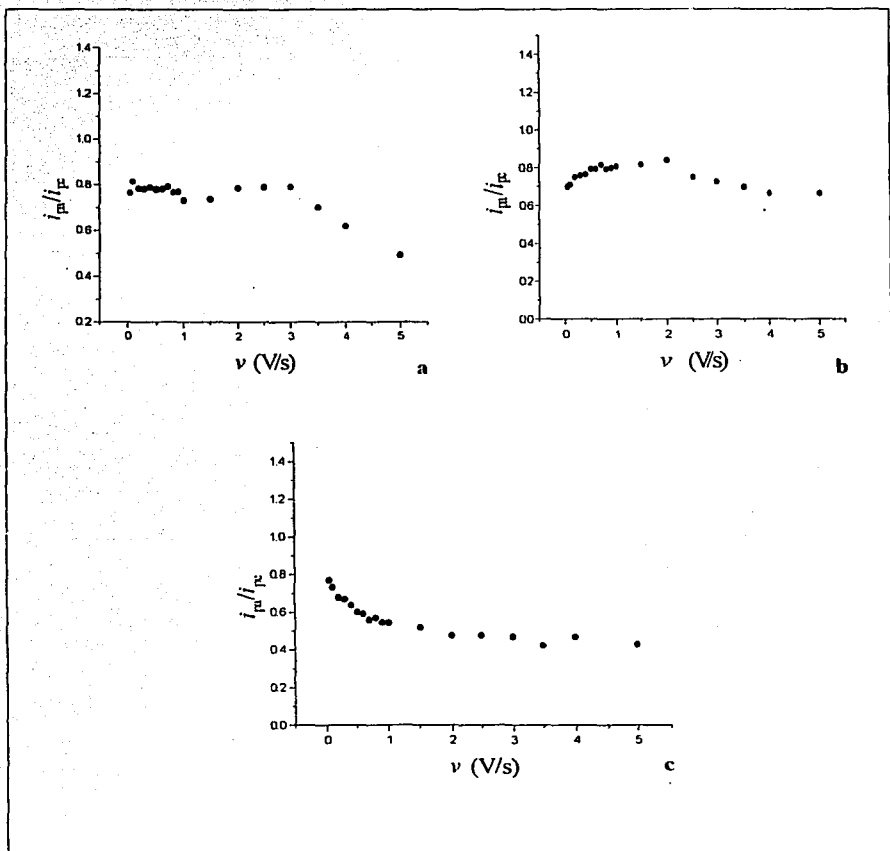


Figura 3.15 Gráfica de la relación de corriente anódica a corriente catódica (i_{pa}/i_{pc}) versus la velocidad de barrido (v). a) 2-nitro acetanilida, b) 4-metoxi,2-nitro acetanilida, c) 4-bromo,2-nitro acetanilida.

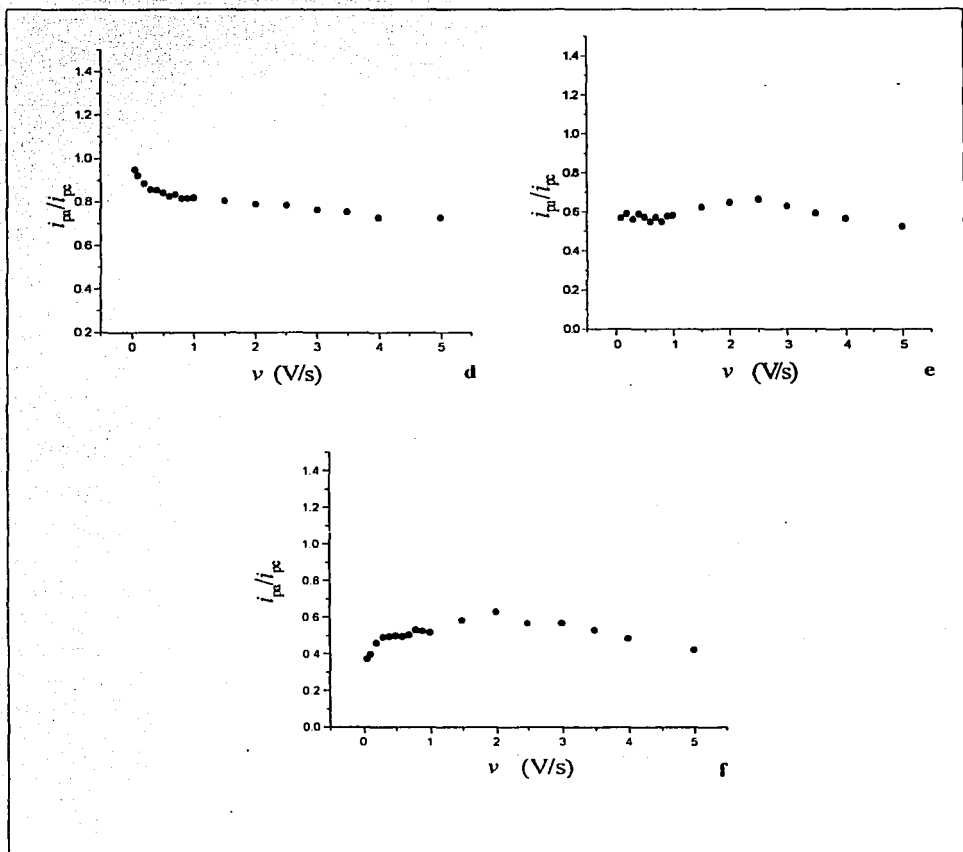


Figura 3.15 Gráfica de la relación de corriente anódica a corriente catódica (i_{pa}/i_{pc}) versus la velocidad de barrido (v). d) 4-trifluorometil,2-nitro acetanilida, e) 4-ciano,2-nitro acetanilida, f) 2,4-dinitro acetanilida.

3.2.3 Gráficas $i_{pc}/v^{1/2}$ vs $\log v$.

El análisis de las curvas de la función corriente con respecto al logaritmo de la velocidad es muy importante porque puede utilizarse como un criterio de diagnóstico del mecanismo de reacción^[63]. Las gráficas se muestran en la figura 3.16.

De acuerdo a las gráficas obtenidas se observó que el valor de la función corriente se mantiene en un valor prácticamente constante hasta 1000 mV/s, indicando el intercambio de un solo electrón en la primera transferencia de carga. Este resultado está en concordancia con el mecanismo propuesto para la reducción de compuestos nitro en medio aprótico.

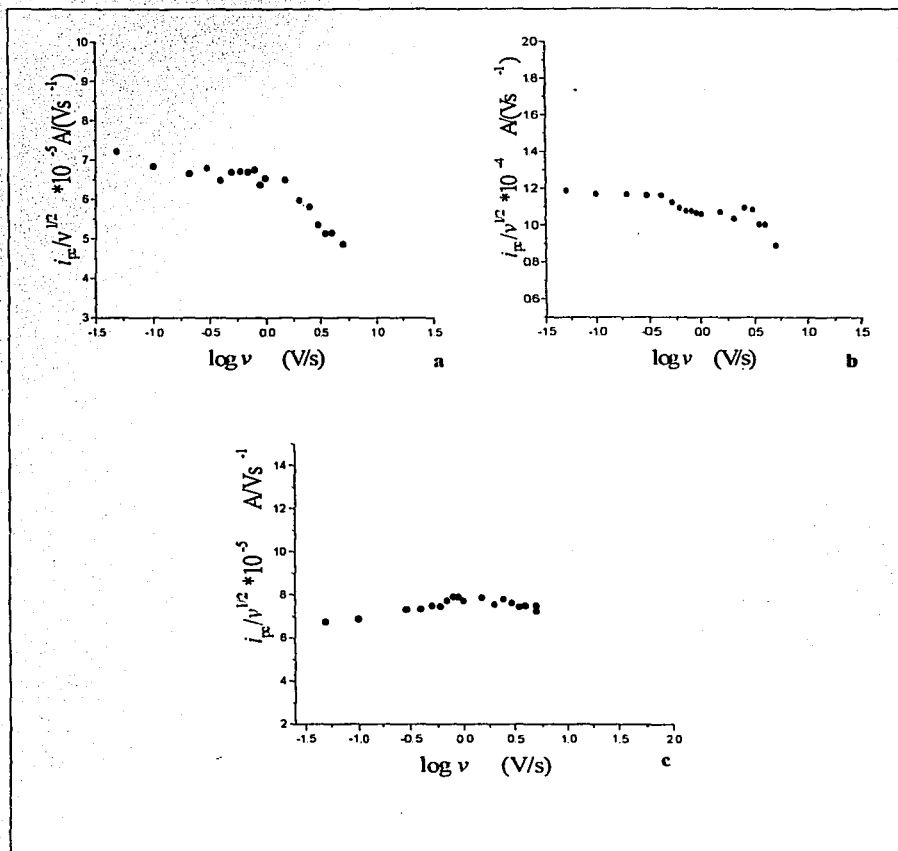


Figura 3.16 Comportamiento de la función corriente de pico para a) 2-nitro acetanilida, b) 4-metoxi,2-nitro acetanilida, c) 4-bromo,2-nitro acetanilida.

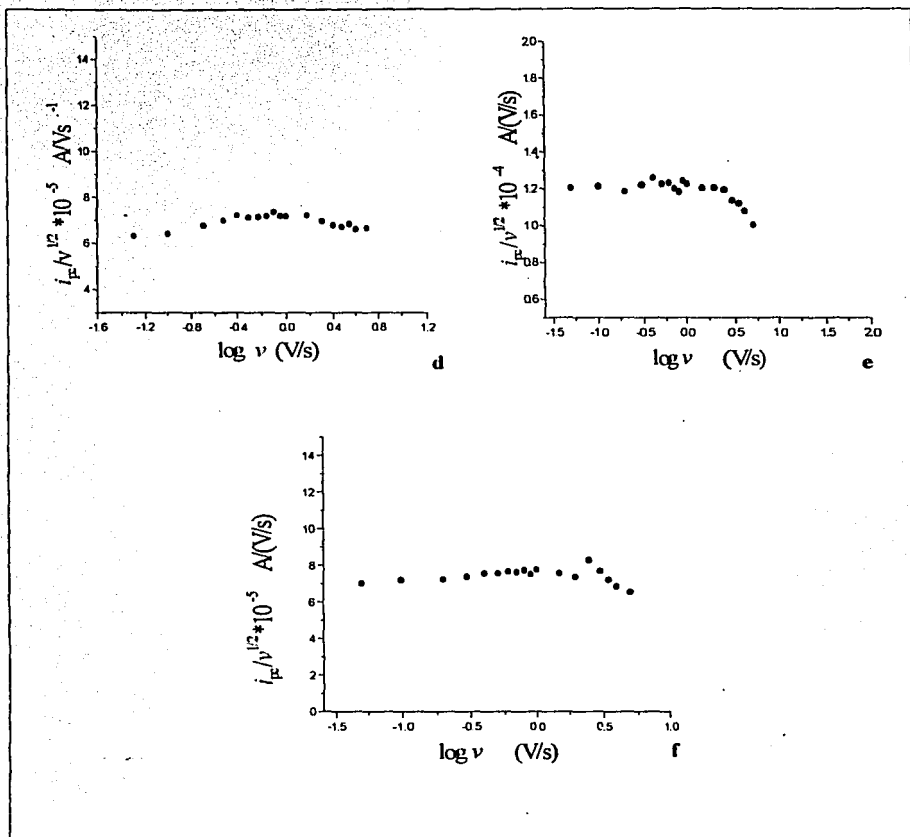


Figura 3.16 Comportamiento de la función corriente de pico para d) 4-bromo,2-nitro acetanilida, e) 4-ciano,2-nitro acetanilida, f) 2,4-dinitro acetanilida.

3.3 Obtención de la Constante de Velocidad Química Homogénea (k)

El valor de la constante química homogénea (k) para las 2,nitro acetanilidas,4-sustituídas estudiadas, se obtuvo por experimentos de cronoculombimetría de doble pulso¹⁸⁰. De las curvas de Q vs t obtenidas, se obtuvieron los datos de Qf y Qr que corresponden a la carga medida en el tiempo (τ) y la carga en el tiempo (2τ) de cada cronoculombiograma. En la figura 3.17 se ejemplifica la obtención de estos parámetros para 2-nitro acetanilida.

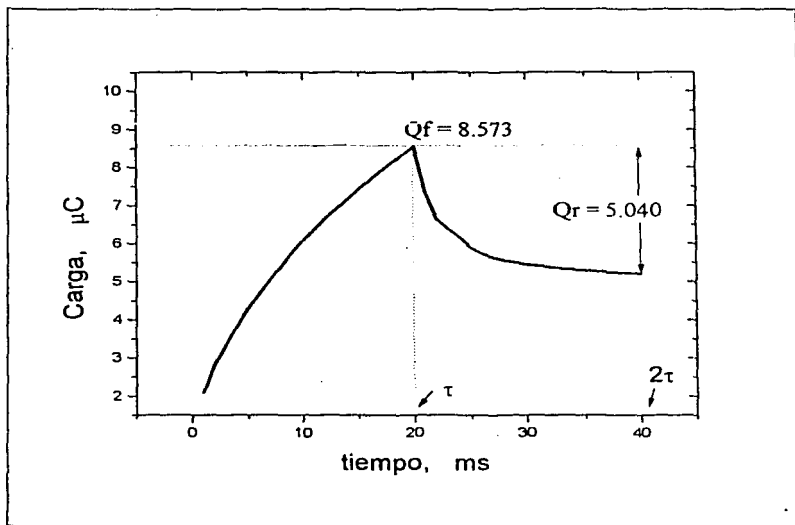


Figura 3.17 Cronoculombiograma de la 2-nitro acetanilida

Teniendo los valores experimentales de Q_r y Q_f se obtiene la relación Q_r/Q_f . Así por ejemplo, para el compuesto 2-nitro acetanilida.

$$\frac{Q_r}{Q_f} = \frac{5.040 \times 10^{-6}}{8.573 \times 10^{-6}} = 0.588 \quad (27)$$

Con el valor obtenido de la ecuación (27) para Q_r/Q_f , la constante de velocidad química homogénea (k), se obtiene extrapolando la Q_r/Q_f en la gráfica teórica descrita para el mecanismo EC^[66], la cual grafica Q_r/Q_f vs $(Kt)^{1/2}$ [66]. En la gráfica de la figura 3.18 se ejemplifica la obtención del valor de la ordenada (y) para la 2-nitro acetanilida.

De la gráfica se obtiene que:

$$y = (K\tau)^{1/2} \quad (28)$$

De donde el valor de τ es un parámetro fijado experimentalmente, solo se despeja de la ecuación (28) y se obtiene el valor de k .

$$k = \frac{(y)^2}{\tau} = 0.14954 s^{-1} \quad (29)$$

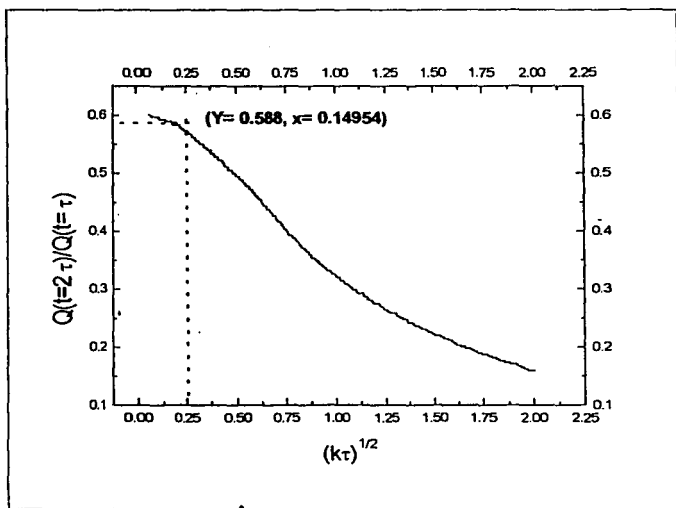


Figura 3.18 Curva teórica descrita para mecanismos EC, en la que se muestra la extrapolación del valor Q_r/Q_f obtenido para el compuesto 2-nitro acetanilida.

3.4 Obtención de la Constante de Velocidad de Transferencia de Electrones Heterogénea (k_s).

Para obtener los valores de las constantes k_s , primero se obtuvo el valor de los coeficientes de difusión para lo cual se utilizó la ecuación de Randles-Sevcik (30).

$$i_{pc} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o v^{1/2} \quad (30)$$

donde: i_{pc} = corriente de pico catódico (Amperes)

n = número de electrones transferidos.

A = área del electrodo (cm^2).

D_o = coeficiente de difusión de la especie oxidada. (cm^2/s)

C_o = concentración de la especie oxidada. (mol/cm^3)

V = velocidad de barrido. (mV/s).

y:

$$2.69 \times 10^5 = 0.446 \frac{n^{3/2} F^{3/2}}{R^{1/2} T^{1/2}} \quad (31)$$

la ecuación de Randles-Sevcik se ajusta a la ecuación de una línea recta ($y = m + bx$), en donde la abcisa (y), es igual a la corriente de pico catódico y la ordenada (x) es igual a la raíz cuadrada de la velocidad, el aumento de la i_{pc} es directamente proporcional al aumento de la velocidad, por lo que a partir de las gráficas de i_{pc} vs $v^{1/2}$ obtenidas de los experimentos de VC, (figura 3.13) se obtiene el valor de la pendiente m , el cual es igual a:

$$m = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o \quad (32)$$

De la ecuación (32) se despeja el valor de D_0 y, como se conocen todas las variables restantes, se obtuvo el valor del coeficiente de difusión.

Para obtener las mediciones de la constante de velocidad electroquímica heterogénea (k_s) por medio de la técnica de VC, se utilizó la siguiente ecuación (33):

$$\Psi = \frac{\gamma^\alpha K_s}{\sqrt{\pi a D_0}} \quad (33)$$

en donde el valor de a se calculó mediante la ecuación (34):

$$a = \frac{nFv}{RT} \quad (34)$$

donde: F = constante de Faraday, 23070 cal/Volt

R = constante de los gases, 1.987 cal/molK

n = número de electrones transferidos.

V = velocidad de barrido, mV/s

De la ecuación (33), solo el valor de la velocidad es variable, entonces para cada valor de velocidad tendremos un valor diferente de a .

Una vez que se tiene el valor de a y considerando que el valor de $\gamma^\alpha = 1$, la constante de velocidad electroquímica heterogénea (k_s) puede obtenerse despejando dicha constante de la ecuación (33).

$$k_s = \Psi \sqrt{\pi a D_0} \quad (35)$$

El valor de Ψ , se obtiene de la gráfica teórica^[71] de ΔE_p vs Ψ (figura 3.19) por extrapolación de los valores de ΔE_p dentro de un intervalo de 60 a 200 mV, obtenido para cada 2-nitro acetanilida, 4-sustituída estudiada. (tabla 3.1). Con el valor de Ψ obtenido de la curva teórica se conocen todas las variables de la ecuación (33), para obtener el valor de la constante de velocidad (k_s).

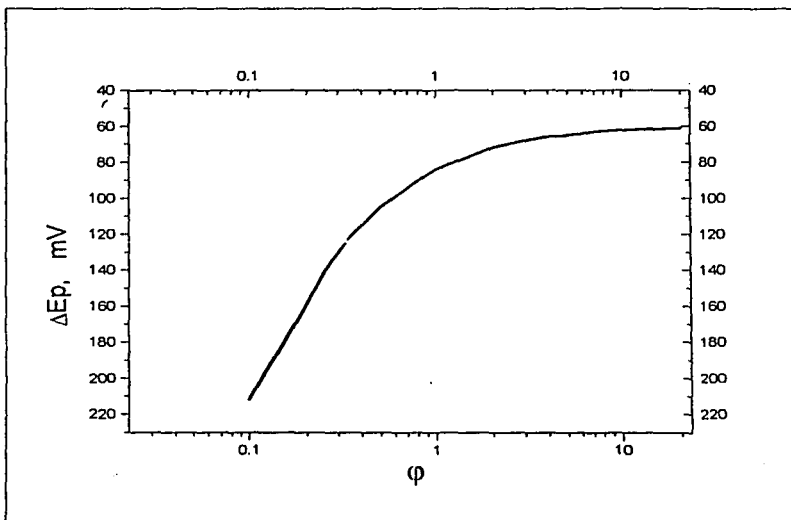


Figura 3.19 Curva teórica para obtener el valor de Ψ

3.5 Correlación Estructura Química-Potenciales Rédox.

Aplicando la ecuación de Hammett-Zuman se pudo determinar el efecto de los sustituyentes sobre los potenciales de reducción del grupo nitro en la serie de 2-nitro acetanilidas, 4-sustituídas. El efecto atractor de electrones del grupo *o*-acetanilida es común a todos los nitro derivados estudiados, por esto en el tratamiento de la ecuación de Hammett-Zuman, solo se consideró el efecto de los sustituyentes en posición *meta* al grupo nitro. Los valores de la σ_x de Hammett se obtuvieron de la bibliografía^[51]. ΔE^{red} es la diferencia de potencial de reducción entre el compuesto sustituido y el compuesto sin sustituir. (tabla 3.2).

$$\Delta E^{\text{red}} = (E^{\text{red}})_x - (E^{\text{red}})_H \quad (36)$$

De la gráfica ΔE^{red} vs σ_x se obtuvo una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.99493 (figura 3.20) lo que indica que la reducción del grupo nitro del anillo aromático se ve influenciada por el efecto de los sustituyentes y que además todas las 2-nitro acetanilidas, siguen el mismo mecanismo de reacción excepto el derivado fenólico el cual experimenta una reacción de autoprotónación previa a la reacción de electro-reducción por este motivo al calcular el valor de ρ no se incluyeron los datos correspondientes a dicho compuesto.

El que ρ tenga un valor positivo y alto de 302.86 mV indica que la reacción de electro-reducción es en mayor medida favorecida por sustituyentes atractores de electrones.

Tabla 3.2 Potenciales de reducción de las 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas y sus correspondientes σ de Hammett.^[51]

| Compuesto | E_{RED} (mV) | ΔE_{RED} (mV) | $\sigma_{Hammett}$ |
|-----------------------------------|----------------|-----------------------|--------------------|
| 4-OHNA | -1406 | -12 | 0.12 |
| 2-NA | -1394 | 0 | 0.0 |
| 4-OCH ₃ NA | -1373 | 48 | 0.12 |
| 4-BrNA | -1269 | 125 | 0.39 |
| 4-CF ₃ NA | -1251 | 143 | 0.43 |
| 4-CNNA | -1207 | 187 | 0.56 |
| 4-NO ₂ NA ¹ | -1258 | 211 | 0.71 |

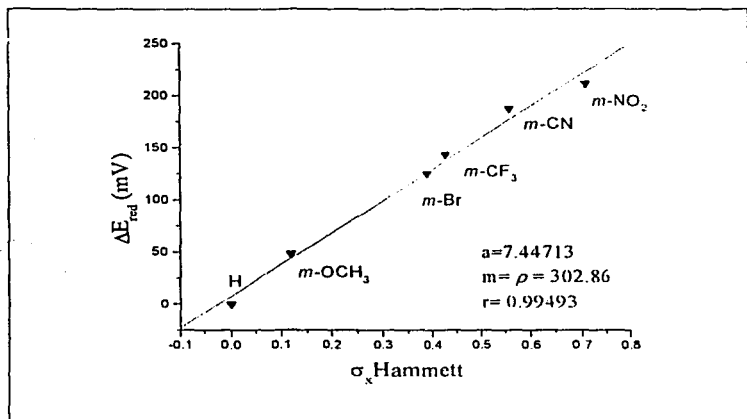


Figura 3.20 Relación de los potenciales de reducción de las 2 nitro acetanilidas, 4-sustituidas en E_tNBF_4 0.1M en CH_3CN , con las constantes de σ de Hammett.

3.6 Evaluación de la actividad antifúngica contra Postia Placenta y su comparación con los potenciales de reducción.

Como se había mencionado previamente el propósito del presente trabajo es llevar a cabo la evaluación en el laboratorio de la actividad de los derivados 2-nitro acetanilidas sobre el hongo Postia placenta y comparar estos resultados con los potenciales de reducción obtenidos por voltamperometría cíclica. Se probaron siete 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas algunas de ellas descritas por primera vez.

Tanto los potenciales de reducción como las pruebas biológicas de % de inhibición del crecimiento de Postia placenta se llevaron a cabo en disolventes orgánicos, para comparar los resultados de la primera transferencia de electrón (E_{pc1}) RNO_2/RNO_2^- con el % de inhibición en el crecimiento de Postia placenta.

En medios práticos los valores determinados por VC ó polarografía no son reacciones reversibles ya que la primera onda puede involucrar hasta cuatro electrones, pasando del grupo nitro hasta la hidroxilamina.

La tabla 3.3 muestra los valores de % de inhibición de crecimiento contra Postia placenta, junto con los potenciales de reducción de la primera onda de los compuestos nitro electroquímicamente activos.

En los ensayos biológicos aún cuando todos los compuestos mostraron una actividad importante comprendida entre 55.24 y 74.29 % de inhibición de crecimiento, algunos de ellos fueron más potentes, especialmente los derivados con los sustituyentes hidroxilo (-OH), bromo (-Br) y trifluorometilo (-CF₃), 74.29, 73.10 y 73.81% de inhibición de crecimiento respectivamente.

Los valores E_{pc1} estuvieron comprendidos entre -1183 mV a -1406 mV vs Fc^+/Fc (-495 mV a -718 mV vs NHE). Aún cuando el intervalo de los potenciales de

reducción para los compuestos activos fue amplio, no se evidenció una correlación directa con la actividad fúngica. Sin embargo, la comparación de los datos entre los potenciales de reducción y la actividad fúngica, a pesar del relativamente pequeño número de derivados, sugiere que la presencia del grupo nitro es importante para la actividad biológica estudiada.

Tabla 3.3. Relación de los potenciales de reducción y el efecto de las 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas^a en el crecimiento del hongo *Postia placenta*.

| Sustituyente | E_{pc} mV vs Fc ⁺ /Fc | E_{pc} mV vs NHE | Crecimiento* (cm) | % Inhibición |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| Control Negativo | b | b | 4.2 | 0.0 |
| Control Positivo | c | c | 1.0 | 76.19 |
| 4-OHNA | -1406 | -718 | 1.0 | 74.29 |
| 2-NA | -1394 | -706 | 1.9 | 55.24 |
| 4-OCH ₃ NA | -1373 | -685 | 1.5 | 65.24 |
| 4-BrNA | -1269 | -581 | 1.1 | 73.10 |
| 4-CF ₃ NA | -1251 | -563 | 1.1 | 73.81 |
| 4-CNNA | -1207 | -519 | 1.3 | 69.05 |
| 4-NO ₂ NA | -1183 | -495 | 1.3 | 68.10 |

- * Promedio de cinco replicas,
- a Concentración 0.25mg/ml.
- b Control tratado con acetona.
- c Control tratado con fenol.

CAPITULO IV

Conclusiones

Se llevó a cabo el estudio electroquímico en medio aprótico de las siete 2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas utilizando la técnica de voltamperometría cíclica.

Los potenciales de reducción encontrados mostraron ser sensibles al efecto de los sustituyentes. Se encontró que para los sustituyentes electrodonadores, la generación del anión-radical nitro se lleva a cabo a potenciales más positivos que para el compuesto padre y que los sustituyentes electroattractores, lo llevan a potenciales más negativos, es decir, requieren de mayor energía.

La aplicación de la ecuación de Hammett-Zuman con los potenciales E^{red} y ΔE^{red} , permitió conocer la susceptibilidad de la reducción del grupo nitro al efecto de los sustituyentes en la posición C_4 del anillo bencénico. El valor positivo de la constante de reacción (ρ) indica que la reacción es promovida por sustituyentes que disminuyen la densidad de electrones en el centro de reacción. El coeficiente de correlación indica que la habilidad aceptora de electrones del grupo nitro está en relación lineal con la perturbación electrónica de los sustituyentes.

Para el compuesto 2-nitro, 4-hidroxi acetanilida no se pudo evidenciar la reacción de oxido-reducción reversible del anión- radical nitro, pero la transferencia del electrón del grupo nitro se realizó al potencial más negativo de todos los

observados, lo cual se debe al efecto de autoprotónación, del grupo hidroxilo fenólico.

Los resultados encontrados en las pruebas biológicas realizadas pone de manifiesto que las siete 2-nitro acetanilidas, 4-sustituiddas estudiadas presentan actividad antifúngica contra el hongo Postia placenta, pero no se pudo establecer en medio aprótico, una correlación directa de su actividad antifúngica con el potencial rédox. No obstante, los resultados sugieren que la activación reductiva del grupo nitro puede contribuir a la actividad antifúngica.

CAPITULO V

Anexos

5.1 ELECTROQUÍMICA

5.1.1 Parámetros a considerar en las reacciones electroquímicas.

En las reacciones electroquímicas los parámetros experimentales que son importantes para interpretar resultados son:

- Potencial (E): Es la cantidad de energía o fuerza eléctrica en un sistema. Cuando el E aumenta más energía es disponible para hacer que una reacción suceda. El potencial se mide en Voltios.
- Corriente (i): Es la magnitud de flujo de electrones en un sistema. La unidad básica de corriente es el Ampere (A). En los experimentos electroquímicos generalmente se miden corrientes en la escala de μA (10^{-6} A). Una *i* catódica se debe a una reducción y una *i* anódica se debe a una oxidación.
- Carga (Q): Es una medida del número de electrones usado por equivalente. Su unidad básica es el Coulombio (C). Se puede medir directamente o calcularse por medio de la ecuación: $Q = i t$
- Tiempo (t): Es la medida de la duración de un evento (una reacción). Se mide en segundos (s). Los experimentos electroquímicos pueden requerir tiempos tan cortos como μs o tan grandes como días.

5.1.2 Reacciones Electroquímicas.

Para el entendimiento de las reacciones electroquímicas es importante saber que:

1. Un sistema electroquímico no es homogéneo, ya que en general en los sistemas electroquímicos el electrodo es sólido (excepto el electrodo de gota de mercurio que es líquido) y el compuesto para ser transformado se encuentra en solución y en ocasiones en suspensión.

Las reacciones de electrodo solo suceden en la interfase, entre el electrodo y el electrolito. Lo importante es que solo puede afectarse la parte del sustrato o sustancia electroactiva que está en contacto con el electrodo. Este tipo de reacciones hacen que la composición en la disolución próxima al electrodo sea diferente de la más alejada. Cuando sucede la reacción $R \rightarrow O^+ + e^-$, en la región próxima al electrodo disminuye la concentración de R. Pero el movimiento Browniano normal de las moléculas, hace que R sea atraída desde el seno de la solución a la interfase de modo que hay una difusión neta de R hacia el electrodo. Algunas de estas moléculas que se difunden experimenta la reacción descrita. De esta forma hay una tendencia del sistema a mantener la concentración de R en la región próxima al electrodo conforme la reacción electroquímica procede. La agitación es otra manera del transporte de masa y mantiene la concentración de R en la región próxima al electrodo más de lo que la mantiene la difusión, la cual se debe solo a gradientes de concentración.

Cuando el producto O^+ se forma en la interfase se acumula en la región cercana al electrodo y gradualmente se difunde desde éste hacia la disolución. La parte de la disolución próxima al electrodo donde la composición se afecta por la reacción de electrodo se llama "capa de difusión". La concentración se mantiene constante en el resto de la disolución.

La doble capa eléctrica es donde ocurre el proceso de la transferencia de los electrones, abarca una capa sobre la superficie del metal que puede considerarse bidimensional y una región de la disolución que tiene un espesor de unas cuantas decenas de angstroms.

Es importante mencionar que hay electroneutralidad en la interfase, es decir, hay una carga neta en cada una de las fases que constituyen la interfase: la líquida y la del electrodo.

El exceso o deficiencia de carga de un metal puede controlarse con una fuente de poder que actúa como una bomba de electrones. La fuente fuerza a los electrones a salir o entrar a la interfase hasta que las cargas remanentes, por fuerzas electrostáticas, impiden más movimiento de electrones. Un metal puede tenerse como positivo, neutro o negativo, esta característica es la base para el control del potencial.

2. Una reacción de electrodo se da por un mecanismo en varias etapas de diferente clase. Una de las etapas, es donde se lleva a cabo la transferencia del electrón, es de carácter heterogéneo. Existen diferentes tipos de procesos heterogéneos, como:

- Adsorción o desorción de precursores, intermediarios o productos.
- Migración de átomos a través de la superficie durante la electrocristalización de metales.
- Recombinación de átomos o radicales en la superficie.

Las reacciones del electrodo se ven afectadas por la velocidad con la que las especies electroactivas llegan al electrodo y la velocidad con la que los productos son dispersados, por lo cual es muy importante el mecanismo de transporte de masa que se lleve a cabo.

Los diferentes mecanismos de transporte de masa son tres: (figura 5.1)

- **Migración**, es el movimiento de las cargas eléctricas bajo la influencia de un campo eléctrico.
- **Difusión**, es el movimiento de una especie bajo la influencia de un gradiente de concentración.
- **Convección**, es el movimiento de la especie reactiva por agitación.

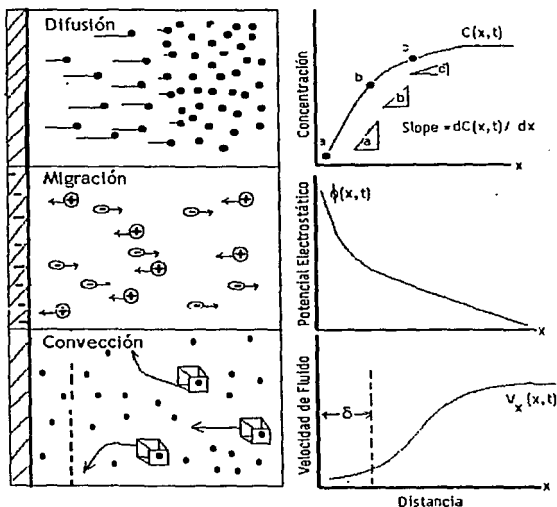


Figura 5.1 Mecanismos de transporte de masa

En términos matemáticos la difusión lineal se considera el principal fenómeno de transporte de masa, como consecuencia de un gradiente de concentración establecido entre la superficie del electrodo y el resto de la solución. Para eliminar el transporte por convección, la disolución debe mantenerse sin agitación y a

temperatura constante. La eliminación del transporte migracional es importante, puesto que, el campo eléctrico del electrodo se disipa sobre todos los iones de la solución y no sólo sobre el material electroactivo. Esto se puede lograr de manera eficaz, adicionando una sal inerte en exceso (100 veces)^[71] a la solución que contiene la especie iónica que reacciona en el electrodo polarizado. Esta sal inerte tiene la función de electrolito soporte y elimina el transporte de masa por migración del material electroactivo presente en una proporción de 1/100 con respecto al electrolito soporte, dejando así, a la difusión como el único fenómeno de transporte de masa.

3. La corriente es una expresión de la velocidad de la reacción. Por ejemplo, el reactivo R se oxida sobre el electrodo de trabajo, en donde cada molécula de R cede un electrón al electrodo, disminuyendo su concentración en la solución de la zona de interfase. Sin embargo, esta especie no puede ir saliendo permanentemente y en cualquier cantidad, por que se generaría un potencial enorme debido a la gran diferencia de carga, en este caso la solución quedaría con un exceso de carga positiva. En lugar de esto, los electrones regresan a través del circuito externo a la disolución por medio de un segundo electrodo, el electrodo auxiliar o contraelectrodo. Debido a que la fuente de poder forzará a los electrones hacia el electrodo auxiliar, la reducción sucede en un electrodo tanto como se produce la oxidación en el otro. Los electrones viajan de un electrodo a otro por un circuito externo, la corriente puede ser positiva (catódica) o negativa (anódica).

4. El potencial es una expresión de la energía del electrón. Una fuente de poder puede donar electrones extras dentro del lado del metal de la doble capa ya sea hacia adentro o hacia fuera, pero solamente lo puede hacer hasta que esta fuerza es contrabalanceada por las fuerzas de repulsión entre los excesos de cargas.

Cualquier proceso de electrodo se caracteriza por su propio potencial normal (E°). En el lado positivo de E° la forma oxidada es estable en el electrodo y la forma reducida tiende a sufrir la oxidación si alcanza al electrodo. De forma análoga, la zona de potencial más negativo que E° es una región en donde predomina la forma reducida y la forma oxidada tiende a ser reducida. Con estas aseveraciones, podemos predecir que el proceso ocurrirá dada una energía. Sin embargo, la cinética de la reacción determina si en realidad la reacción sucede.

Experimentalmente solo se pueden medir las diferencias de potencial entre dos electrodos, de manera que la palabra potencial en electroquímica significa, diferencia de voltaje entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia independiente. El electrodo de referencia se arregla de manera que no fluya corriente por el circuito entre él mismo y el electrodo de trabajo, esto es, el voltímetro colocado entre ambos electrodos tiene gran impedancia. Además de que no fluye corriente se mantiene en equilibrio. El electrodo de referencia se construye de manera que contenga las dos formas de un par rédox en composición fija. La energía de los electrones en la parte metálica del electrodo se fija en un potencial cercano al E° del par del electrodo. Este arreglo indica que siempre se está comparando el potencial en el electrodo de trabajo con el del potencial del electrodo de referencia.

5. La corriente y el potencial, no se pueden controlar de manera simultánea ya que, una vez que la energía ha sido determinada para un sistema químico, la reacción procede a una velocidad correspondiente a esa energía. En los sistemas electroquímicos se puede fijar el potencial de un electrodo y dejar que la corriente correspondiente fluya o bien, se puede fijar la corriente haciendo que el potencial varíe, en un intervalo determinado por la magnitud de la corriente.

5.2 Voltamperometría Cíclica.

La voltamperometría cíclica (VC) resulta ser un método electroquímico muy versátil para analizar especies electroactivas las cuales a un potencial específico pueden experimentar una reducción ó una oxidación, y pueden ser de origen orgánico, biológico o inorgánico; la efectividad del método resulta de su capacidad para observar rápidamente la reacción redox de la especie electroactiva a través de un amplio intervalo de potencial y poder seguir la cinética de la reacción química.

La VC es una técnica electroanalítica en la que se aplica un potencial a una celda electroquímica y se mide la corriente resultante. El desarrollo de los diversos métodos voltamperométricos como: voltamperometría cíclica, cronoamperometría y cronoculombimetría, difieren en el tipo de curva de potencial obtenida.

Actualmente la VC es el primer experimento que se realiza antes de llevar a cabo caracterizaciones subsecuentes por otros métodos electroquímicos. Esta técnica electroanalítica consiste en ciclar el potencial de un electrodo sumergido en la solución no agitada de una sustancia electroactiva y se mide la corriente resultante que puede considerarse la señal de respuesta a la señal de excitación del potencial.

El potencial de este electrodo de trabajo, se mide con respecto a un electrodo de referencia, por ejemplo un electrodo saturado de calomel (ESC), un electrodo de Ag/AgCl, o bien, de Ag/AgNO₃. El potencial aplicado entre el electrodo de trabajo y el de referencia se considera una señal de excitación.

La señal de excitación para la voltametría cíclica es un barrido de potencial lineal con una forma de onda triangular como se muestra en la figura 5.2. Esta señal de onda triangular hace el barrido entre dos valores de potencial llamados potenciales de cambio.

La señal de excitación, por ejemplo, origina que el potencial haga un barrido hacia negativo desde 0.00V a 1.00V vs Ag/AgCl actuando el electrodo como un cátodo, en este punto la dirección de barrido se invierte, potencial de cambio (E_{λ}), causando un barrido positivo de regreso al potencial original de 0.00V donde ahora el electrodo se comporta como un ánodo (figura 5.2) en un tiempo que va de 0 a 40 segundos. La velocidad de barrido se refleja por la pendiente y tiene un valor de 20 mV/s. Un segundo ciclo se indica por la línea punteada, teniendo la posibilidad de trabajar uno o varios ciclos. La instrumentación moderna permite que los cambios de potencial y las velocidades de barrido sean fácilmente modificadas. Un voltamperograma cíclico se obtiene midiendo la corriente en el electrodo de trabajo durante el barrido de potencial donde la corriente puede ser considerada como una señal de respuesta a la señal de excitación del potencial. Los electrodos de trabajo más comunes utilizados en VC son los de disco plano de platino, de gota de mercurio y pasta de carbón o carbón vítreo. El uso de los electrodos planos en el desarrollo de una VC implica que el proceso electroquímico se efectúa en condiciones de difusión lineal.

El voltamperograma nos permite conocer el comportamiento electroquímico de un compuesto, interpretando la presencia de un pico de corriente catódica como una reducción electroquímica y un pico de corriente anódica como una oxidación electroquímica. Como se muestra en el voltamperograma típico de la figura 5.3 donde se gráfica la corriente (eje vertical) vs el potencial (eje horizontal), este último varía linealmente con el tiempo, por lo que también el eje de potencial puede considerarse un eje de tiempo. Esto facilita la comprensión del hecho que la fuerza de reducción u oxidación del electrodo está controlada por el potencial aplicado. Así, un barrido de potencial en la dirección negativa hace al electrodo un reductor más fuerte, mientras que, el barrido de potencial hacia la dirección positiva lo hace un mejor oxidante. (figura 5.4)

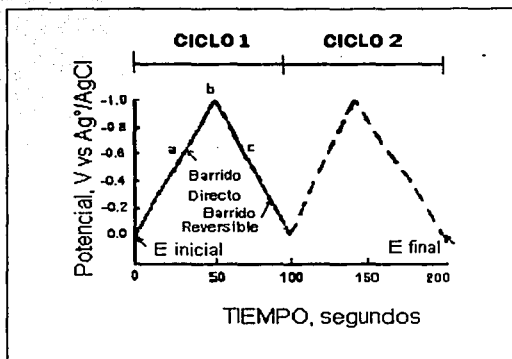


Figura 5.2 Típica señal de excitación para un V.C. Barrido de onda triangular con cambios de potencial en 0.0 y -1.0 V v.s. Ag/AgCl.

La figura 5.3, nos muestra un voltamperograma cíclico típico^[54] para un electrodo de trabajo de platino en una solución 6 mM de $K_3Fe(CN)_6$ como especie electroactiva en KNO_3 1.0 M en agua como electrólito soporte. La señal de excitación aplicada para obtener este voltamperograma es la que se muestra en la figura de onda triangular, pero con un potencial de cambio de -0.15 V. El potencial inicial (E_i) de 0.80 V aplicado en (a) se elige para evitar cualquier electrólisis de $Fe(CN)_6^{3-}$ cuando el electrodo se conecta.

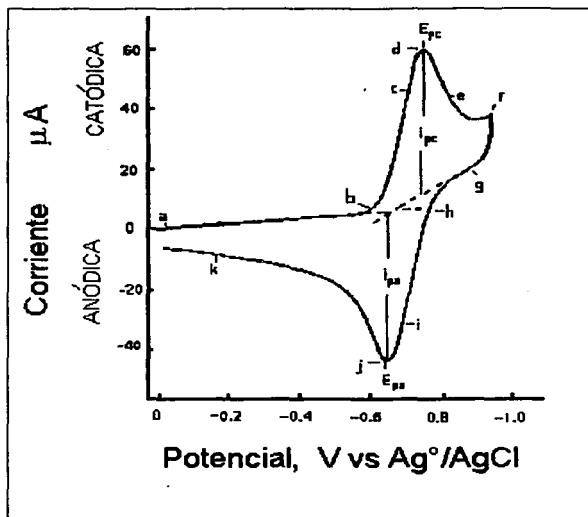
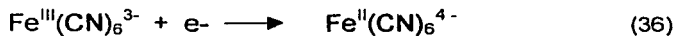


Figura 5.3 Voltamperograma cíclico típico

El barrido se inicia hacia valores negativos como se indica por la flecha. Cuando el potencial es suficientemente negativo para reducir $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$, se genera una corriente catódica que inicia en (b) y se debe al proceso en el electrodo:



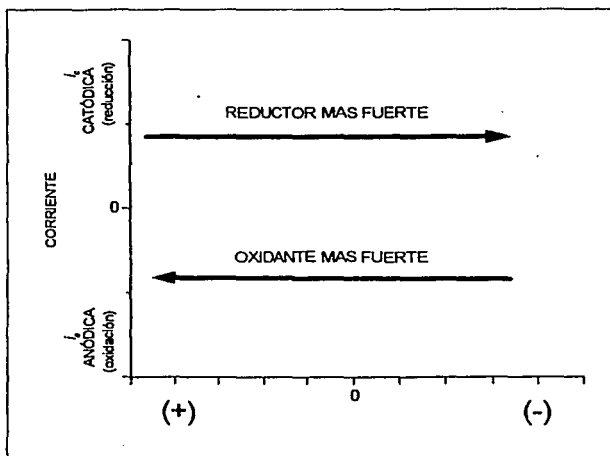
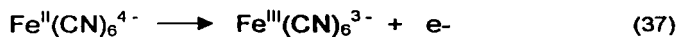


Figura 5.4. Ejes de potencial y corriente para una VC

El electrodo es ahora un reductor lo suficientemente fuerte para reducir al $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$. La corriente catódica incrementa rápidamente (b \rightarrow d) hasta que la concentración de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ en la superficie del electrodo disminuye sustancialmente, causando el pico de corriente (d). La corriente entonces decrece (d \rightarrow g) mientras que la solución circundante al electrodo se ha agotado del ión $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ debido a su conversión electrolítica a $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$. El sentido del barrido se cambia a positivo en -0.9 V (f) para el barrido de regreso. El potencial es aún suficientemente negativo para reducir $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$, así que la corriente catódica continúa aún cuando el potencial se está barriendo en sentido positivo. Cuando el electrodo llega a ser un oxidante lo suficientemente fuerte, el $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$

que se ha estado acumulando adyacente al electrodo, puede ser oxidado por el proceso en el electrodo:



Esto provoca la corriente anódica (i-► k), que se incrementa rápidamente hasta que la concentración de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ disminuye en la superficie, causando el pico de corriente (j). La corriente entonces decrece (j—► k) mientras que el $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ se agota en la solución circundante al electrodo.

El primer ciclo se completa cuando el potencial alcanza +0.80 V; ya que se obtiene el voltamperograma cíclico, es evidente que cualquier potencial positivo de aproximadamente +0.4 V sería conveniente como un potencial inicial (E_i) en la reducción de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$, la cual no ocurriría en el momento en que se aplica el potencial. Este procedimiento evita la electrólisis inadvertida como resultado de aplicar un potencial inicial en donde ya está ocurriendo la transferencia de electrones.

Se observa claramente que en el barrido negativo el $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ se genera electroquímicamente a partir del $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ como se indicó por la corriente catódica. En el barrido positivo el $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ se oxida nuevamente a $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ como lo indica la corriente anódica. Así, la voltamperometría cíclica es capaz de generar rápidamente un nuevo estado de oxidación durante el barrido negativo y después examinar su conversión a través del barrido positivo.

Para comprender mejor el proceso, consideremos una solución que contiene a la especie oxidante (O), capaz de ser reducida a la especie reductora (R) en el electrodo por efecto de la siguiente reacción electroquímica reversible:



Si por medios externos, se impone el potencial del electrodo a un valor diferente, la corriente en el circuito de electrodos alterará la composición del electrodo y/o la solución lo suficiente para que se observe este nuevo potencial.

La ecuación fundamental que relaciona el potencial que se aplica al electrodo y, las concentraciones de las especies O y R en la superficie de éste a una temperatura de 298.15 K es la ecuación de Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{C_O^S}{C_R^S} \quad (39)$$

Donde: E = es el potencial aplicado al electrodo,

E° = es el potencial formal de reducción del par oxidante/reductor

n = es el número de electrones transferidos en la reacción (38).

C_O^S y C_R^S = son las concentraciones en la superficie del electrodo de las especies oxidante (O) y reductor (R).

La variación de C_O^S/C_R^S como una función de E es la base de todos los métodos voltamperométricos. La ecuación de Nernst describe esta relación para sistemas reversibles, por ejemplo sistemas para los cuales la reacción (38) en el electrodo es rápida en ambas direcciones. Esto significa que la relación de concentraciones en la superficie responde de manera inmediata a cualquier cambio en el potencial. La concentración en la superficie puede ser esencialmente de la especie oxidante O ($C_O^S/C_R^S > 1000$) debido a que el potencial E es lo suficientemente positivo respecto a E° o esencialmente de la especie reductora R debido a que el potencial sea suficientemente negativo con respecto a E° .

La relación logarítmica entre E y C_O^S/C_R^S se refleja por un cambio rápido en la región donde $E = E^{\circ}$, es decir, $C_O^S/C_R^S = 1$, esto origina un aumento drástico en la corriente catódica (b → d) como se observó en la figura 5.3 siendo en este caso $C_O^S = \text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ y $C_R^S = \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$.

La situación física en la solución adyacente al electrodo durante el barrido de potencial se ilustra por los perfiles concentración distancia (C-x) en la figura 5.5 para potenciales seleccionados de la figura 5.3. Un perfil C-x es una ilustración gráfica de cómo la concentración (C) de la solución varía como una función de la distancia (x) a la superficie del electrodo. El comportamiento de la corriente durante el barrido de potencial se puede entender al examinar cuidadosamente los perfiles C-x en la figura 5.5.

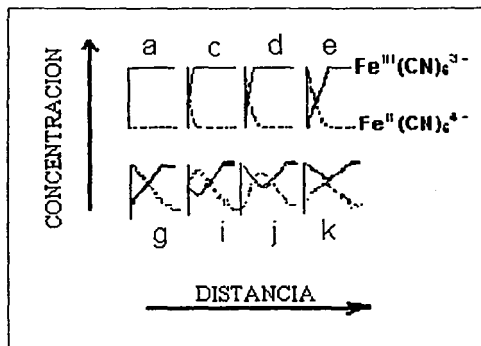


Figura 5.5 Perfiles de Concentración-distancia para el voltamperograma cíclico de la figura 5.3

La corriente es proporcional a la pendiente del perfil C-x en la superficie del electrodo como es descrito por:

$$i = nFAD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} = K \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (40)$$

Donde: i = corriente (amperes),
 n = número de electrones transferidos por ión (equivalente/mol),
 A = área del electrodo (cm^2),
 D = coeficiente de difusión (cm^2/s),

C = es la concentración (mol/cm^3),
 X = distancia al electrodo (cm).

Así, la corriente observada de un potencial particular para el voltamperograma de la figura 5.4 se puede explicar con el perfil C - x de la figura 5.5. Donde la pendiente del perfil (a) es cero y la corriente es despreciable para ese potencial, como el barrido de potencial se hace en sentido negativo, $(\delta C/\delta x)_{x=0}$ incrementa para los perfiles (c-d), y la corriente catódica en la figura 6.4 incrementa correspondientemente. Sin embargo cuando se alcanza el perfil (d), $(\delta C/\delta x)_{x=0}$ decrece como lo muestran los perfiles (e) y (g) debido al agotamiento de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ cerca del electrodo y en consecuencia la corriente baja. Así el comportamiento observado en el voltamperograma es un incremento en el pico de corriente en cuyo punto de inflexión la corriente empieza a decaer debido al agotamiento de especies electroactivas cerca del electrodo. Simplemente se afirma que en el barrido de potencial hacia negativo, la especie R se genera electroquímicamente a partir de la especie O como lo indica la corriente catódica y en el barrido de potencial de regreso, R vuelve a oxidarse a O como lo indica la corriente anódica. Ejemplificando así, como la VC es capaz de generar rápidamente un nuevo estado de oxidación durante el primer barrido de potencial y luego probar su presencia en el barrido de regreso. La reacción (3) es un caso relativamente simple para un par rédox en donde ambas formas son estables.

Los parámetros importantes de un voltamperograma cíclico son las magnitudes de la corriente de pico catódico (i_{pc}) y la corriente de pico anódico (i_{pa}), el potencial tanto del pico catódico (E_{pc}) como del anódico (E_{pa}). Figura 5.6

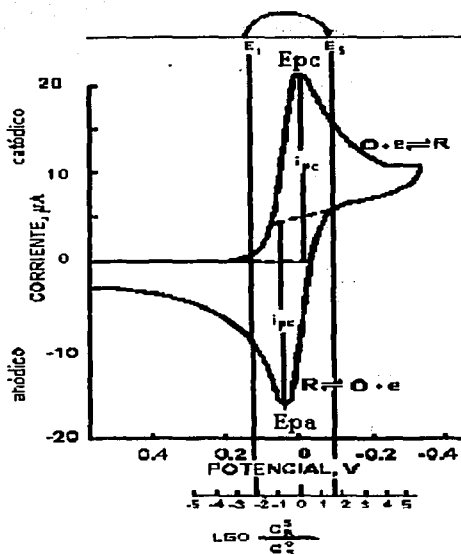


Figura 5.6 Parámetros electroquímicos en VC

Un par redox en el cual ambas especies intercambian electrones con el electrodo de trabajo se conoce como un par electroquímicamente reversible. El potencial de media onda ó potencial formal de reducción ($E_{1/2}$) para un par redox reversible está centrado entre E_{pa} y E_{pc} .

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (41)$$

El número de electrones transferidos en el electrodo de reacción (n) para un par reversible puede ser determinado de la separación entre los potenciales de pico:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{0.059}{n} \quad (42)$$

De este modo, la transferencia de un electrón, tal como sucede en la reducción de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{3-}$ a $\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_6^{4-}$ muestra de $\cong 0.056$ V. Cuando la transferencia del electrón sobre la superficie del electrodo es lenta da lugar a la irreversibilidad del proceso, lo que se evidencia por el aumento en la separación de los picos ($\Delta E_p > 0.056$ V). La corriente de pico para un sistema reversible se describe por la ecuación de Randles-Sevcik para el barrido negativo de potencial en el primer ciclo:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (43)$$

Donde:

i_p = corriente de pico (amperes).

n = número de electrones transferidos .

A = área del electrodo (cm^2)

D = coeficiente de Difusión (cm^2/s)

C = concentración (mol/cm^3)

v = velocidad de barrido (V/s).

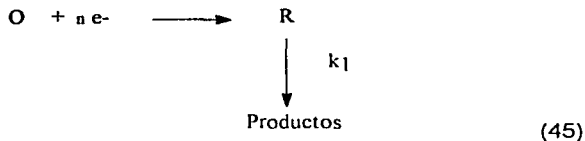
De acuerdo a la ecuación (43), la i_p aumenta con $v^{1/2}$ y es directamente proporcional a la concentración. La relación con la concentración es particularmente importante en aplicaciones analíticas y en estudios de mecanismos de electrodo. Los valores de i_{pa} e i_{pc} serán idénticos para un par reversible simple (figura 5.7-a). Eso es:

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1 \quad (44)$$

Sin embargo, la relación de corriente de pico puede verse influenciada de manera significativa por reacciones químicas acopladas al proceso del electrodo (45). La irreversibilidad electroquímica se origina por el lento intercambio del ó de los electrones de las especies rédox con el electrodo de trabajo. En este caso, las ecuaciones 41 a 44 no se aplican. La irreversibilidad electroquímica se caracteriza por una separación de potenciales de pico mayores que el indicado en la ecuación (42) ^[54, 78].

Para un proceso totalmente irreversible el voltamperograma cíclico mostrará una ausencia total de picos de corriente anódica, consistente con el bajo porcentaje de reoxidación de R, lo cual resulta ser evidencia de irreversibilidad. (figura 5.7-b).

Un tercer tipo de comportamiento para un par rédox, se muestra en la figura 5.7-c. Este comportamiento usualmente se asocia con una reacción química subsecuente a la transferencia de electrones, donde una fracción de R reacciona químicamente y no queda disponible para su reoxidación durante el barrido inverso.



Si la velocidad de barrido es muy rápida con respecto a k_1 , muy poca cantidad de R se perdería en la reacción subsecuente y los voltamperogramas parecerían los de un caso reversible (figura 5.7-a). En tanto que, si la velocidad de barrido es

lenta en comparación con k_1 , la reacción química ocurrirá antes de que el barrido de potencial sea invertido y por lo tanto la reacción electroquímica de reoxidación no se llevaría a cabo, y el voltamperograma tomaría la forma de un sistema irreversible (figura 5.7.b). Debido a que k_1 puede variar, cuando se observa un voltamperograma de un sistema reversible o irreversible (figura 5.7-a y b respectivamente) es importante realizar el voltamperograma cíclico utilizando un intervalo de velocidades de barrido tan amplio como sea posible, ya que de lo contrario no se descubriría la presencia de reacciones químicas acopladas.

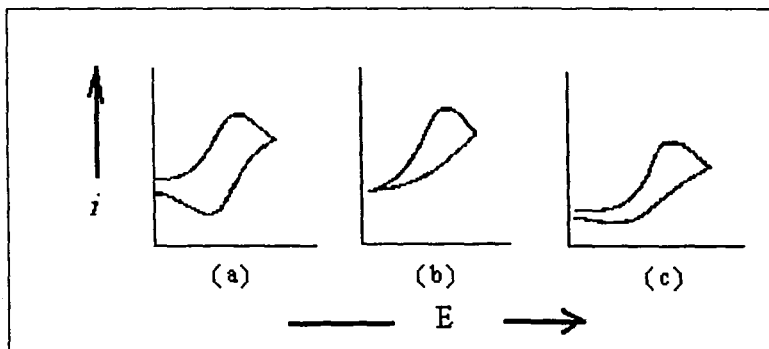


Figura 5.7 Voltamperogramas cíclicos típicos en a) proceso reversible, b) proceso irreversible, c) proceso cuasirreversible.

5.3 Cronoculombimetría.

Dentro de las técnicas electroquímicas clásicas se encuentra la cronoculombimetría, la que como su nombre lo indica, es una medida de la carga (culombios) con respecto al tiempo (cronos). Esta técnica permite medir la cinética y el mecanismo de las reacciones químicas acopladas, la cinética de la transferencia heterogénea del electrón, la adsorción y la ventana del tiempo efectiva de una celda electroquímica.

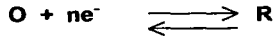
Experimentalmente la cronoculombimetría se lleva a cabo aplicando un potencial a una celda electroquímica. La señal de excitación del potencial que se aplica a la celda es un pulso de potencial^[55] (Figura 5.8-A). El potencial varía de un valor inicial E_i , (potencial inicial) a un segundo valor E_s (potencial segundo). El potencial aplicado en E_i es suficiente para causar la reducción u oxidación de la especie electroactiva en solución.

Cuando se llega al potencial E_s , como fin del experimento, se le denomina *cronoculombimetría de pulso de potencial simple*. En cambio, en la *cronoculombimetría de potencial de doble pulso*, el potencial se pulsa a un tercer valor E_f (potencial final).

Frecuentemente, E_f es idéntico a E_i . El pulso desde E_i a E_s se llama el *potencial de pulso directo*, mientras que el paso desde E_s a E_f se le conoce como *potencial de pulso inverso*. Así como E_s se elige, de manera que pueda hacer la electrólisis de la especie electroactiva en solución, E_f se elige en consecuencia para hacer la electrólisis del producto que ha sido electrogenerado en E_s .

En cronoculombimetría, la señal de excitación del pulso de potencial se ve influenciada por fenómenos interfaciales en la disolución.

La ecuación de Nernst describe la relación entre el potencial de la señal de excitación (E) y la concentración en la superficie del par rédox de un sistema reversible^[54]. Por ejemplo, para el par rédox siguiente, la ecuación de Nernst es:



Y a una temperatura de 25°C, se escribe:

$$E = E_{O,R}^{\circ} - \frac{0.059}{n} \log \frac{C_R^S}{C_O^S} \quad (46)$$

En donde: E = potencial aplicado al electrodo con respecto a un electrodo de referencia, (volts).

$E_{O,R}^{\circ}$ = potencial formal rédox, (volts).

n = número de electrones transferidos por ion o por molécula, (eq/mol).

C_O^S = concentración sobre la superficie del electrodo de la forma oxidada del compuesto electrolítico (mol/L).

C_R^S = concentración sobre la superficie del electrodo de la forma reducida del compuesto electrolítico. (mol/L).

De acuerdo a la ecuación (46), los cambios en la señal de excitación causan cambios en la relación de las concentraciones C_R^S/C_O^S sobre la superficie del electrodo. El cambio es acompañado por la reducción de O, o bien, por la oxidación de R en el electrodo, como se observa en la ecuación (46), y la electrólisis resultante causa un flujo de electrones en el circuito eléctrico, produciendo corriente.

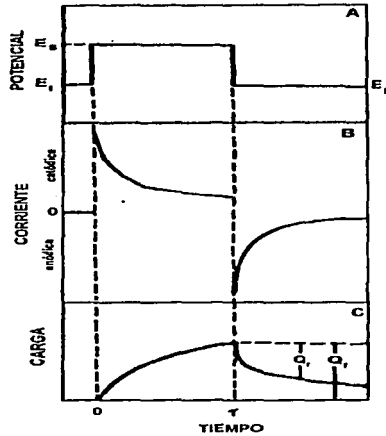


Figura 5.8 (A) señal de excitación del potencial, (B) Señal de respuesta: corriente: cronoamperograma y (C) Respuesta monitoreada de la carga; cronoculombiograma.

Tabla 5.1.- Relación de C^s_R/C^s_O con E para $E^{\circ}_{O,R}$ para un sistema reversible.

| C^s_R/C^s_O | E(mV) | | C^s_R/C^s_O | E(mV) | |
|---------------|-------|------|---------------|-------|-------|
| | n=1 | n=2 | | n=1 | n=2 |
| 1/10,000 | 236 | 118 | 10/1 | -59 | -29.5 |
| 1/1000 | 177 | 88.5 | 100/1 | -118 | -59 |
| 1/100 | 118 | 59 | 1000/1 | -177 | -88.5 |
| 1/10 | 59 | 29.5 | 10.000/1 | -236 | -118 |
| 1 | 0 | 0 | | | |

La tabla 5.1 muestra como la relación C_R^S/C_O^S cambia en respuesta a los potenciales que pueden ser positivos o negativos con respecto a $E_{O,R}^\circ$. Se nota que puede lograrse un cambio enorme en las concentraciones superficiales debidos a un cambio de potencial menores a medio voltio.

5.3.1 Perfiles de Concentración –Distancia.

Los cambios en las concentraciones superficiales vecinas al electrodo que acompañan a un pulso de potencial establecen gradientes de concentración en la disolución adyacente al electrodo. Los gradientes de concentración se ejemplifican gráficamente por medio de perfiles de concentración-distancia (C-d), como los que se muestran en la figura 5.9, dichos perfiles presentan un comportamiento similar al proceso de electrodo en VC. Por ejemplo, a una disolución que sólo contenga especies O a una concentración 1mM con algún electrolito soporte inerte, se le aplica un valor de E_i lo suficientemente positivo con respecto a $E_{O,R}^\circ$ para que no ocurra la reducción de O cuando se aplica E_i a la celda electroquímica. El perfil a, de la figura 5.9-A, muestra que la concentración de O es 1mM en la superficie del electrodo y en la disolución adyacente. Considerando el "perfil a" en la figura 5.9-B, se muestra que la concentración de R es 0 mM en la solución. Se aplica un valor de E_s lo suficientemente negativo con respecto a $E_{O,R}^\circ$, para que esencialmente todo O en la superficie del electrodo sea reducido a R en el instante en que el potencial se pulsa hasta E_s . El "perfil b" en la figura 5.9-A, muestra el gradiente de concentración resultante entre la superficie del electrodo y la disolución a una cierta distancia del electrodo. El gradiente de concentración causa difusión de O desde la región de alta concentración que existe a una distancia del electrodo, hacia una región de baja concentración que existe sobre la superficie del electrodo.

Cuando O llega a la superficie del electrodo se le transfiere un electrón y con eso se reduce a R. Los perfiles c y d de la figura 5.9-A muestran el progresivo agotamiento de O en la vecindad del electrodo que ocurre con el tiempo. Se nota como la capa de difusión (zona del agotamiento) se extiende más lejos hacia la disolución cuando el experimento continúa. La especie O que se pierde ha sido convertida a R, la cual se acumula en la vecindad de la superficie del electrodo. El comportamiento de R se describe por los perfiles C-d en la figura 5.9-B, observándose como R se difunde lejos del electrodo con el tiempo. La transferencia de masa de ambos, O y R, va desde una región de alta concentración a una región de baja concentración.

La disolución no debe estar en movimiento para que el desarrollo de estos perfiles sea controlado solamente por difusión y no sea perturbado por algo de convección. Por lo que, la cronocoulombimetría se debe llevar a cabo en una disolución sin agitación.

Si el potencial ahora se pulsara hacia E_f , el cual es un valor suficientemente positivo de E° ocasionaría que C_R^S llegue a ser esencialmente cero en el instante del pulso hacia E_f . Considerando la ecuación (46) se muestra que la relación C_R^S/C_O^S debe inmediatamente pasar a un número pequeño. En consecuencia, R que fue generado durante el pulso de potencial directo vuelve a oxidarse a O durante este pulso de potencial inverso. Los perfiles C-d en la figura 5.9-C y 5.9-D muestran la conversión de R a O, cuando R se vuelve a difundir hacia la superficie del electrodo. Se observa también que algo de R continúa difundiéndose dentro de la solución lejos del electrodo.

Para lo que, la ecuación (47) permite predecir la forma de la señal de respuesta corriente-tiempo por la simple medición de la pendiente del perfil C-d en $x=0$ (es decir, en la superficie del electrodo) para las especies que están siendo electrolizadas.

$$i = n F A C_o D_o \left(\frac{\partial C_o}{\partial x} \right)_{x=0,t} \quad (47)$$

En donde:

- i = corriente (amperes).
- n = número de electrones transferidos por ión o molécula. (eq/mol).
- F = constante de Faraday. (96485 C/eq).
- A = área del electrodo, (cm²)
- C_o = concentración de O, (mol/cm³)
- D_o = coeficiente de difusión de O, (cm²/s)
- t = tiempo (segundos,s)
- x = distancia a partir de un electrodo planar, (cm)

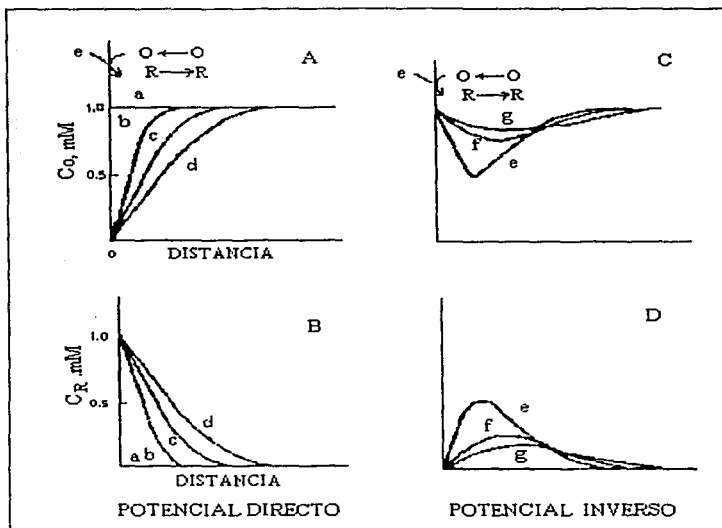


Figura 5.9 Perfiles de concentración- distancia para señales de excitación de pulso de potencial. Pulso de potencial directo para las especies O (A) y R (B). Pulso de potencial inverso para las especies O (C) y R (D). Para (a-g) ver el texto

5.3.2 Señal de Respuesta.

La corriente es una medida de la velocidad a la cual alguna especie está siendo electrolizada sobre la superficie del electrodo. Así por ejemplo, en la cronoamperometría se mide la corriente (en amperes) en función del tiempo como señal de respuesta a la señal de excitación de uno o más pulsos de potencial. (figura 5.8-B).

Cuando el potencial se pulsa desde E_i hasta E_s , la corriente inmediatamente alcanza un valor catódico grande, el cual decae lentamente coincidiendo con los perfiles C-d para O (figura 5.9-A). Al suministrar un pulso de potencial hasta E_f , de inmediato hay un aumento en la corriente anódica que decae lentamente, lo cual está de acuerdo a los perfiles C-d para R (figura 5.9-D). Así, en este experimento la electrólisis está siendo controlada por la velocidad de llegada de O (pulso directo) ó R (pulso inverso) hacia la superficie del electrodo, en donde la transferencia de masa es por difusión.

La caída en la curva $i-t$ (corriente vs tiempo) que sigue a cada pulso de potencial refleja la disminución en la velocidad de llegada de O (ó de R) al electrodo cuando la región cercana al electrodo empieza a agotarse de esa especie. Como consecuencia O ó R tienen que viajar más lejos para alcanzar al electrodo para que el experimento continúe y eso toma más tiempo. La curva corriente vs tiempo para cronoamperometría se describe mediante la ecuación de Cottrell (48).

$$i = \frac{n F A C_O^{\circ} D_o^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (48)$$

La cronocoulombimetría es esencialmente cronoamperometría que se ha tomado un paso más lejos. La respuesta $i-t$ se integra para dar una respuesta

monitoreada de la carga (Q) versus el tiempo. Así, la cronoculombimetría tiene una señal de excitación idéntica de uno o más pulsos de potencial y la señal de respuesta es la corriente como fue descrita con anterioridad. La ecuación que describe la curva Q - t resultante para el pulso directo es la integral de la ecuación (48).

$$Q = \frac{2nFAC_O^{\circ} D_O^{1/2} t^{1/2}}{\pi^{1/2}} = 2kt^{1/2} \quad (49)$$

La figura 5.8-C muestra un cronoculombimograma para una cronoculombimetría de doble pulso de potencial. Esta respuesta monitoreada es simplemente la integral matemática de la figura 5.8-B. Como se predice con la ecuación (49), Q se incrementa como una función de $t^{1/2}$ durante el pulso de potencial directo. El valor de Q en cualquier tiempo refleja la cantidad total de O que ha sido reducido a ese punto lo cual es igual a la cantidad de R producida. Así mientras que i es una medida de la velocidad de electrólisis a un tiempo dado, Q es una medida de la cantidad de materia electrolizada a ese tiempo.

El pulso del potencial inverso al tiempo τ inicia una reacción de electrodo anódica; consecuentemente la carga para la oxidación de R se subtrae del valor final de Q en el pulso directo (Q_r en la figura 5.8-C), la cual llega a ser la línea base para la medición del pulso inverso de la carga (Q_r).

La ecuación que se aplica para el pulso inverso es (50):

$$Q_r = \frac{2nFAC_O^{\circ} D_O^{1/2} t^{1/2}}{\pi^{1/2}} = \left[t^{1/2} + (t-\tau) - t^{1/2} \right] \quad (50)$$

En los experimentos de cronoculombimetría es importante la selección del E_1 y E_s , lo cual se dificulta si el sistema rédox no está caracterizado y por lo tanto E° no se conoce; Por lo que antes de hacer cronoculombimetría, se debe obtener el voltamperograma cíclico del sistema para localizar el par rédox dentro de la ventana de potencial del sistema electrodo- medio electrolítico [52, 67, 69].

Un cronoculombimograma cíclico típico se muestra en la figura 5.8.c. Se asume que la especie O está presente en disolución, que el $E^\circ_{O,R}$ está en 0.0 Volts y que el proceso rédox involucra la transferencia de un solo electrón. En la tabla 5.1 se muestra como un potencial de $E_1 = +118\text{mV}$ a $E_s = -118\text{mV}$ pueden causar que la relación C^S_R/C^S_O cambie desde 1/100 hasta 100/1, lo que es suficiente para reducir la concentración sobre la superficie del electrodo de la especie O aproximadamente a cero, dando para este caso resultados apegados a la ecuación (50) y, si es posible, se puede utilizar un pulso más grande que asegure que la relación sea adecuadamente cambiada para hacer que la concentración de O sobre la superficie sea "casi cero". Como lo sería, un pulso desde $E_1 = +177\text{mV}$ a $E_s = -177\text{mV}$ (ver Tabla 5.1), lo cual puede cambiar la relación de C^S_R/C^S_O desde 1/1000 a 1000/1.

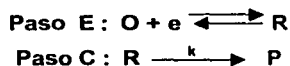
De acuerdo a la ecuación (50), $Q/t^{1/2}$ puede usarse para calcular el área (A), el coeficiente de difusión (D), número de electrones transferidos (n), o bien, la concentración (C).

La cronoculombimetría se usa comúnmente para rectificar el área del electrodo, esto se determina haciendo experimentos sobre un sistema ferri-ferrocianuro para el cual se conocen los valores de D, n, y C. Los coeficientes de difusión se miden, generalmente por cronoculombimetría con un electrodo cuya área ya ha sido medida donde n y C del sistema también son conocidos. El valor de n usualmente se obtiene por un experimento separado tal como la coulombimetría de capa fina [54], la separación de picos en VC, por la gráfica de E vs $\log i(i_{-i})$ obtenida por polarografía o por voltametría hidrodinámica. Una estimación aceptable de n puede algunas veces, obtenerse a partir de $Q/t^{1/2}$, asumiendo un valor razonable de D.

5.3.3 Cronocoulombimetría y Reacciones Acopladas.

La cronocoulombimetría es una técnica útil para estudiar a las reacciones químicas homogéneas que están acopladas a la reacción heterogénea de óxido-reducción sobre la superficie del electrodo. Estas reacciones químicas acopladas, a menudo perturban la respuesta $Q-t$ en un experimento de pulso directo o de doble pulso de potencial, en una manera tan predecible y medible que la información acerca del mecanismo y la velocidad de la reacción química acoplada puede ser fácilmente obtenida.

Un buen ejemplo de cómo la cronocoulombimetría se usa para estudiar una reacción química acoplada se da para el mecanismo EC.



R es una especie reactiva que está electrogenerándose por la reducción de O debido a un pulso de potencial que va desde E_i a E_s , la cual forma P a una velocidad caracterizada por la constante de velocidad k . Este mecanismo se nombra EC, donde E es la reacción del electrodo y C es una reacción química acoplada a la reacción del electrodo^[67]. La reacción química homogénea de R para formar P puede estudiarse por medio de cronocoulombimogramas de doble pulso de potencial para el mecanismo EC para diferentes valores de la constante de velocidad k . En la figura 5.10 se observa que el pulso directo del cronocoulombimograma no se afecta por la presencia de reacciones químicas acopladas.

Esto es lo que se espera puesto que la transferencia de masa de O a la superficie del electrodo es dependiente de C_o y D_o y no se ve afectado por el destino de la especie R electrogenerada (a menos que reaccione para formar más O, pero esto sería otro mecanismo). El pulso inverso de un cronoculombimograma es sensible al valor de k . La magnitud de k puede obtenerse a partir de una curva de trabajo adimensional que ha sido calculada teóricamente. Esta curva de trabajo, para el mecanismo EC, se muestra en la figura 5.11 ^[67,69].

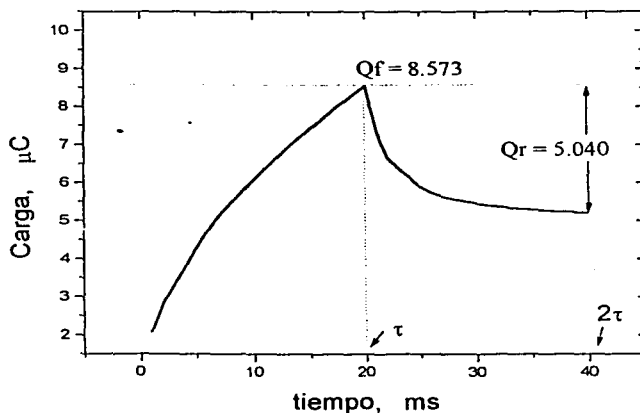


Figura 5.10 Cronoculombimograma típico de doble pulso de potencial.

La curva muestra como la relación Q_f/Q_r varía como una función de $\sqrt{k\tau}$. Una simple medida de Q_f/Q_r para un pulso de potencial de duración τ , da el valor correspondiente de $\sqrt{k\tau}$ de la curva de trabajo, a partir del cual se obtiene k . La forma de la curva de trabajo depende del mecanismo de la o las reacciones

forma de la curva de trabajo depende del mecanismo de la o las reacciones químicas acopladas. Se observa como la magnitud de Q_r disminuye conforme la constante de velocidad de la reacción aumenta R que se ha convertido en P por una reacción química acoplada R , no está disponible para su reoxidación a O durante el pulso de potencial inverso y entre más rápida sea la reacción química, menor será la cantidad de R presente y, consecuentemente, Q_r será más pequeña.

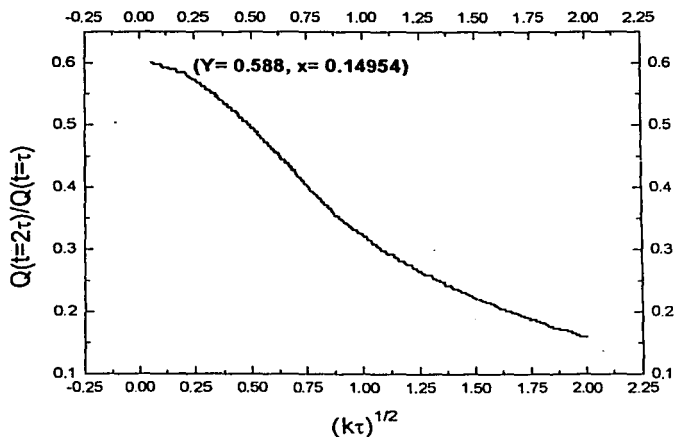


Figura 5.11 Curva teórica de $Q(t=2\tau)/Q(t=\tau)$ vs $(k\tau)^{1/2}$ para obtener la magnitud de k

Sugerencias

Como complemento de esta investigación sería conveniente llevar a cabo estudios por voltamperometría cíclica de la reducción del grupo nitro a diferentes pH's en medios acuosos para las siete acetanilidas estudiadas. Así como, sus respectivos ensayos biológicos contra *Postia placenta*.

Otra propuesta interesante sería realizar ensayos de actividad enzima sustrato a diferentes concentraciones de oxígeno con reductasas presentes en el hongo *Postia placenta*, para poder determinar el mecanismo de acción de estos compuestos. Así como, llevar a cabo un estudio de química teórica acerca de la interacción enzima-2-nitro acetanilidas, 4-sustituidas.

Bibliografía

1. V. Varkey, C.S. Ven Ratachalam and C. Kalidas, *J. Electroanal. Chem.*, 1978, 89, 191.
2. V.E. Sahini, E. Volanschi and A. Meghea., *Rev. Roumanie Chim.*, 1980, 25, 449.
3. P. Wardman, E.D. Clarke, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1988, 69, 942.
4. P. Wardmann, *Environ. Health Perspect.*, 1985, 64, 309-320.
5. J.D. Chapman, G.F Whitmore, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1984, 10, 1161.
6. P. L. Olive, *Cancer Res.*, 1979, 39, 4512-15.
7. A. Breccia, G. Berrilli, S. Sofia, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1979, 36, 85-89.
8. J.E. Biaglow, B. Jacobson, C. L. Greenstock, D. Raleigh, *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 269-282.
9. Fry A.J. Chemistry of amino, Nitroso and Nitro compounds and their derivatives. Patai, Wiley Winchester, U.K., Vol. 8 Cap. 4 pp 202-73, Cap 8 pp 319-37 (1991).
10. Zabicky J., The chemistry of functional Group. The chemistry of Amides, Patai S., The Interscience Publishers, Vol 9 pp 74-84, 299-305, 602-605, (1970).
11. A. Álvarez-Lueje, H. Pessoa, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella. Electrochemical reduction of 2,5-dimethoxy nitrobenzenes: nitro radical anion generation and biological activity. *Bioelectrochem. Bioenerg.* (1998) 46, 21-28.
12. L.J. Núñez-Vergara, S. Bollo, A.F. Alvarez and J.A. Squella. Nitro radical anion formation from nimodipine. *J. Electroanal. Chem.* (1993) 345, 121-133.
13. Allen J.B. ,Enciclopedia of Electrochemistry of the elements, Marcel Dekker Inc. U.S.A., Vol XIII, Cap.2, 1979.

14. Ralph J. Fessenden, Joan S. Fessenden, Química Orgánica, Iberoamericana, México, Cap. 13, pp 647-54, (1983).
15. Morrison R. T., Boyd R. N., Química Orgánica, 5a. Edición, Addison Wesley Iberoamericana, México, (1990).
16. Corwin Hansch, A.L., E. W. D., The Structure-Activity relationship in Amides Inhibiting Photosynthesis., *Biochimica Et Biophysica Acta.* (1966) 112, 381-391.
17. Ismail B. Shaid, Y.M.Y., Effects of two Acetanilide Herbicides on microbial Populations and their Cellulolytic activities, *Bulletin of Enviromental Contamination an Toxicology.* (1994) 52, 61-68.
18. J.C. Dearden, EricTomlinson., Bucal absorption as a parameter of analgesic activity of some *p*-substituted acetanilides, *J. Pharm. Pharmac.* (1971) 23, 73S-76S,
19. J.C. Dearden, EricTomlinson., Physico-chemical studies of analgesics. The protein binding of some *p*-substituted acetanilides, *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* (1970) 22, 53S-59S.
20. Jonathan J. Sorci, D. L: M., Quantitave Structure-Activity Relationships in Bacterial and Abiotic Alkaline Hydrolyses of para -substituted acetanilides, *J. Agric. Food. Chem.* (1993) 41,1760-66.
21. Jordan G.L. , Enviromental factors and soil relationship influencing the activity of Acetanilide Herbicides, *Dissertation Abstracts International.* (1979) 39(9), 4135B-4136B.
22. Mc Gahen L.L., Microbial transformations of Acetanilide Herbicides., *Dissertation Abstracts International.* (1982) 43(5) ,1376B-1377B
23. Qiquan Wang, Weichun Yang and Weiping Liu, Adsorption of Acetanilide Herbicides on soils and its correlation with soil properties. *Pesticide Science.* (1999) 55 ,1103-1108.
24. R.M Zablutowicz, R.R. H., S.C. Wagner, 2-nitroacetanilide as substrate for determination of Aryl Acylamidase Activity in Soils., *Soil. Biol. Biochem.* (1998) 30(6), 679-686.

25. Rao V.S., Mechanisms of action of Acetanilide Herbicides, *Dissertation Abstracts International*. (1974) 35(2), 641B.
26. Dewayne C. Torgeson, Fungicides and Advansed Treatise , Chemistry and Physiology, Academic Press, N. Y. and London, Tomo II, Cap II, 1969.
27. Baichwal R. S. , Baxter R.M., Kandel S.I., and Walker G.C., Antifungal Action of Salicylanilide II, *Can. J. Biochem. Physiol.* (1960) 38, 245-251.
28. Hammett, L. P., Physical Organic Chemistry in Retrospect, *J. Chem, Ed.* (1966) 43, 464-469.
29. M. Aguilar Martínez, I. Gonzalez, G. Cuevas, N.A. Macías Ruvalcaba, M. Jiménez and B. Lotina-Hennsen. *J.Org. Chem.* (1999) 64, 3684-3694.
30. Zuman P., Sustituent effects in Organic Polarographaphy, Ed. Plenum Press, New York, Cap. II y XII, 1967 p 43,323-332.
31. Kunz, K.R., Iyengar B.S., Dorr R. T., Alberts D. S., Remus W. A., *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2281.
32. Frank, D.M., Arrora P.K., Blumer J.L., Sayre L.M., *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 1095.
33. Kovacic P., Becrar L.E., *Curr. Pharm Des.*, 2000, 6, 143.
34. Tocher J.H., *Gen. Pharmac.*, 1977, 28, 485.
35. Knox R.J., Knight R.C., Edwards D.I., *Br. J. Cancer*, 1981, 44, 741.
36. Wilson R., Anderson R.F., Denny W., *J. Med. Chem.*, 1989, 32, 23.
37. Barcenas Pazos G., Rejón R.R., Echenique-Manrique R, La madera y sus uso en la construcción, Instituto Nacional de Investigación sobre Recursos Bióticos, (1980) p 20.
38. Herrera T y Ulloa M. , El reino de los hongos: Micología Básica y aplicada., México D.F., Fondo de Cultura Económica, (1990)p 552.
39. King T. E, King T.J and Manning L. C., The Chemistry of Extractives from Hardwoods. Part XIV, The Constitution of Jacareubin a pyranoxanthone from *Callophylum brasiliense*, The Chemistry of Organic. (1953) p 3932-4937.

40. Koenigs J. W., Hydrogen peroxide and iron: A Proposed system for decomposition of wood by brown-rot Basidiomycetes. *Wood Fiber.* (1974) 6(1), 66-79.
41. Mc Daei C. A. . Major antitermitic components of the heartwood of southern catalpa, *J. Chem. Ecol.* (1992) 18(3), 359-369.
42. Ortega-Escalona F., Castillo-Morales I and Carmona Valdovinos T., Anatomía de la Madera de veintiséis especies de la Selva Lacandona, Chiapas, Inst. de Ecología A.C. & U.A.M., México, Angiosprmas Arbóreas de México, No. 3, La Madera y su uso No. 26.
43. Perez Morales V. Castillo Morales I, Reyes Chilpa R., manual de Construcción de Estructuras Ligeras de la madera, Consejo Nacional de la Madea en la Construcción A. C. (COMACO), Quintana Roo, México. Cap. 4 Secado y protección de la madera, (1994) p 66-86.
44. Schultz T. P., Harms W.B, Fisher T.H., Mc Murtrey, K.D. Minn J. y Nicholas D.D. Durability of Angiosperm Heartwood. The importance of extractives. *Holzforschung.* (1995) 49, 29-34.
45. Echenique- Manrique R. Descripción, características y usos de 25 Maderas Tropicales Mexicanas, , Camara Nacional de la Industria de la Construcción. México, (1970).
46. Echenique- Manrique R, Francisco Robles F. Ciencia y Tecnología de la Madera I , Universidad Veracruzana ,Veracruz , México, (1993).
47. Erickson K. E. Cellulases of Fungi In: Trends in the biology of fermentations for fuels and chemical. Editado por Hollaender A., Rabson R, Rogers, Pietro. Valentine and Wolfe, New York, (1981)pp 19-32.
48. Corwin Hansch, Robert M. Muir, Toshio Fujita, Peyton P. Maloney, Fred Geiger, Margaret Streich, The correlation of Biological Activity of Plant Growth Regulators and Chloromycetin Derivatives with Hammett Constants and Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85, 2817-2824.
49. Gritzner, G and Küta, J..*Pure Appl.Chem.* (1984) 4, 462.

50. Corwin Hansch, Toshio Fujita, A Method for the Correlation of Biological Activity And Chemical Structure, *J. Amer. Chem. Soc.* (1964) 86, 1616-1626.
51. Corwin Hansch, A. Leo, R.W. Taft, A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters, *Chemical Reviews*, (1991) 91(2), 165-195.
52. Catálogo Bionalytical Systems Inc., West Lafayette, Indiana. Reprinted by permission , 1991.
53. Reyes Chilpa R, Gómez Garibay F., Moreno Torres G. Jiménez Estrada M. And Quiroz Vázquez R.I., Flavonoids and Isoflavonoids with Antifungal Properties from *Platymiscium yucatanum* Heartwood, *Holzforschung*. (1998) 52, 459-462.
54. Kissinger Peter T, Heineman William R. Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Ed.* (1983) 60(9), 702-706.
55. Bard , A.J. , Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications.*, Wiley, New York, 1980.
56. R.L Dickerson and J.W. Rogers, *Anal Chem. Acta.*,1974,71,433-441.
57. G.A. Russell and E.J. Geels, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 122.
58. R.D. Allendoerfer and D.H. Rieger, *J. Amer.Chem. Soc*, 1966, 88, 3711.
59. W. N: Greig and J. W. Rogers., *J. Amer.Chem. Soc*, 1969, 91, 5945.
60. C. Ametore, G. Capobianco, G. Farnia, G. Sandoná, J.M. Savéant, M.G: Sevenn and E. Vianello, *J. Amer.Chem. Soc*, 1985, 107, 1815.
61. J.A. Bautista, I. González, M. Aguilar. XVII Congreso de la Soc. Mexicana de Electroquímica., Monterrey N.L.,México, 29-31 de Mayo de 2002.
62. P. Zuman and Fijalek., *J. Electroanal. Chem.*, 1990, 296, 583-88.
63. Nicholson, R. S. and Shain Y., *Anal. Chem.*, 1963, 35, 1859.
64. Bard Allen J., Chemical Modification of Electrodes, *J. Chem. Ed.* (1983) 60(4), 302-304.
65. Bard Allen J. and Smith W. H. *J. Amer.Chem. Soc.* (1975) 97, 5203,

66. Yongyu Zhao, Frederick G. Bordwell, Acidities of Radical Anions pK_{HA} -Derived from Nitro-Substituted Aromatic Weak Acids and the Formation of Radical Dianions, *J. Org. Chem.* (1996) 61(7), 2530-2535.
67. Ayala Schiaffino Blanca Natalia, (tesis licenciatura) " Síntesis y estudio electroquímico de Cinamamidas Nitradas con posible Actividad Antichagásica", tesis de Licenciatura .Universidad Michoacana de san Nicolas de Hidalgo, Morelia Mich. México, (1996).
68. Geske , D. H. and Maki, A. H., *J. Amer. Chem, Soc.* (1960) 82, 2671
69. Kissinger Peter T, Heineman William R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, marcel Dekker, New York, (1984).
70. Kissinger Peter T., *Curr. Sep.* (1985)6(4), 62.
71. Shoup. R. E., *Curr. Sep.* (1982) 4(4), 31.
72. Christie, J.H., *J. Electroanal Chem.* (1967)13, 79.
73. Nicholson Richard S., Theory and Application of Cyclic Voltametry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics, *Anal. Chem.* (1965) 37(11), 1351-1355.
74. Maloy J.T., Factors Affecting the Shape of Current-Potential Curves, *J. Chem. Ed.* (1983) 60(4), 285-289.
75. Hubbard Arthur T. , Fred C. Anson, Linear Potential Sweep Voltammety in Thin Layers of Solution, *Anal. Chem.* (1966) 38(1), 58-61.
76. Evans Dennis H., Katheen M. O' Connell, Ralph A. Petersen, and Michael J. Kelly., Cyclic Voltammety, *J. Chem.Ed.* (1983) 60(4), 290-292.
77. Evans. Dennis H., Voltammety: Doing Chemistry with Electrodes, *Acc. Chem. Res.* (1977) 10(9) , 313-319.
78. Heinze Jürgen, Cyclic Voltammety-"Electrochemical Spectroscopy", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1984) 23(11), 831-918.
79. Hawley M.Dale , Stephen W. Feldberg, Nuances of the ECE Mechanism. I. development of the theoretical Relationships for Chronoamperometry, *J. Phys. Chem.* (1966) 70(11), 3459-3464.

80. Smith Donald E., Thermodynamic and Kinetic Properties of the Electrochemical Cell, *J. Chem. Ed.* (1983) 60(4), 299-301.
81. Anson C. Fred, Osteryoung Robert A., Chronocoulometry, *J. Chem. Ed.* (1983)60(4), 293-296.
82. Heineman W., Cronocoulometry, Electrochemical Notes from Bioanalytical Systems, Inc. West Lafayette, Indiana
83. Micales Jessie A. and Highley Terry L., Phisyological characteristics of a non-degradative isolate of *Postia (=PORIA) placenta*, *Mycologia.* (1989)81(2), 205-215.
84. Green III F., Clausen C. A., Kuster T. A., and Highley T.L., Induction of polygalacturonase and the formation of oxalic acid by pectin in brown rot fungi., *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, (1995) 11, 519-524.
85. Connolly Jon H., Chen Ying, and Jellison Jody, environmental scanning electron microscopic observation of the hyphal sheath and mycofibrils in *Postia placenta*, *Can. J. Microbiol.* (1995) 41, 433-437.