



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

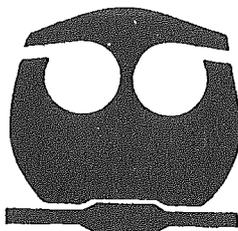
**RECONOCIMIENTO MOLECULAR CON  
CICLOFANOS NATURALES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA INORGANICA)

P R E S E N T A :  
CAROLINA      GODOY      ALCANTAR

ASESOR: DR. ANATOLY K. YATSIMIRSKY



MEXICO, D. F.

1997

M-252670



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

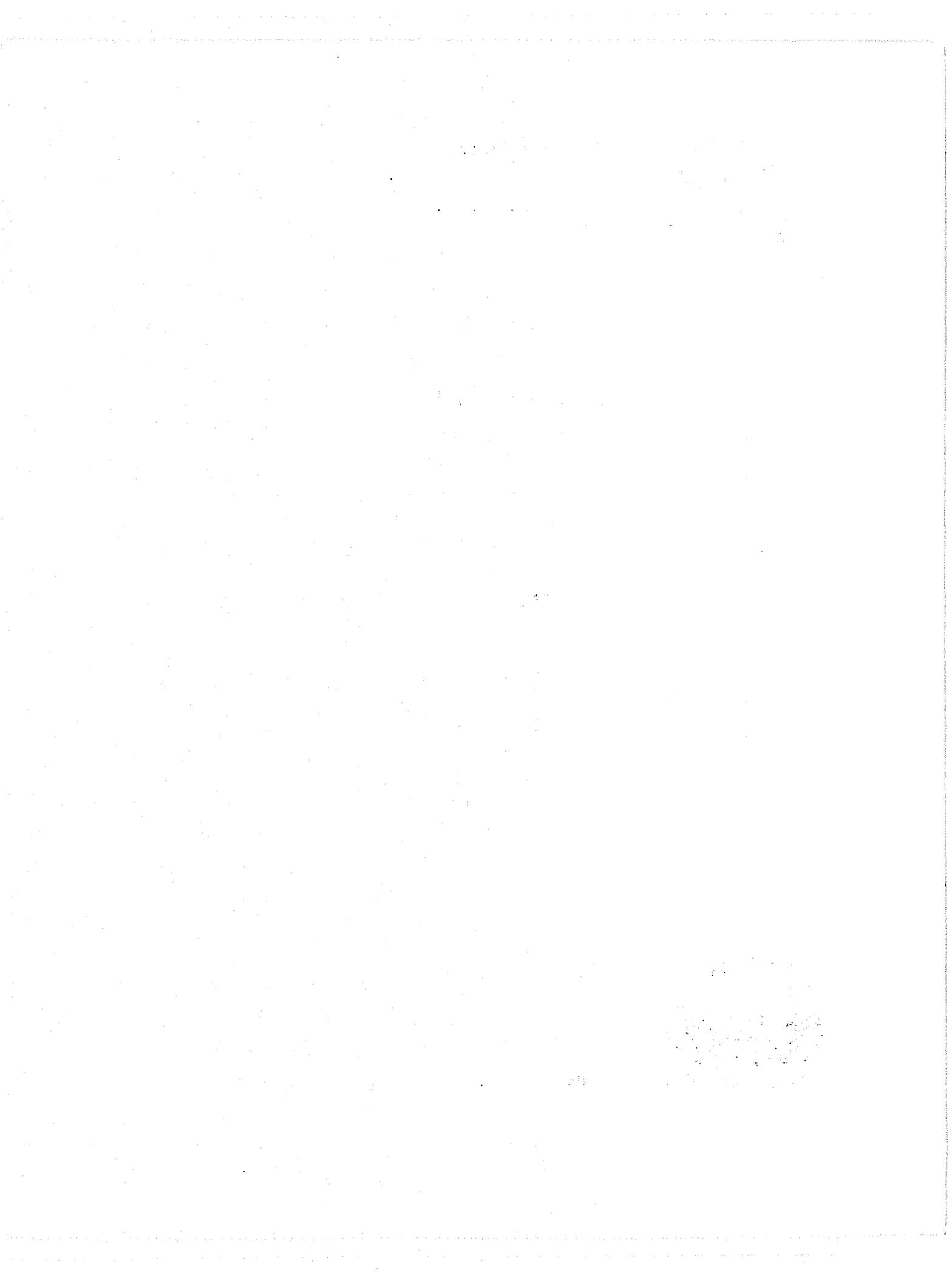


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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 según el tema:**

Presidente:	<b>Dr. Alfonso Romo de Vivar</b>
Primer Vocal:	<b>Dr. Eugene Bratoeff Titeff</b>
Segundo Vocal:	<b>Dr. Vladimir Basiuk (ICN)</b>
Tercer Vocal:	<b>Dra. Lena Ruiz Azuara</b>
Secretario:	<b>Dr. Miguel Costas Basín</b>
Primer Suplente:	<b>Dr. Ramón Garduño Juárez (IF)</b>
Segundo Suplente:	<b>Dra. Martha Sosa Torres</b>

**Sitio donde se desarrolló la tesis:**

Laboratorio 213 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la  
División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la  
Universidad Nacional Autónoma de México.

**Candidato al grado:**

  
**M. en C. Carolina Godoy Alcántar**

**Asesor:**

  
**Dr. Anatoly K. Yatsimirsky**



*A mi Madre, Carolina Alcántar M.,  
y a mis hermanos José Martín y Elizabeth Godoy A.,  
por su amor, comprensión, apoyo y paciencia.*

*A la grata memoria de mi Madre  
José Godoy G.*



## *Agradecimientos*

Le estoy profundamente agradecida al Dr. Anatoly K. Yatsimirsky, que con su confianza, paciencia, dedicación, apoyo incondicional y enseñanzas hizo posible esta tesis. Todo su esfuerzo y ejemplo constituirá un importante impulso y motivación para el desarrollo de futuros estudios.

A los miembros del jurado asignado por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Dr. Iván Ortega Blake, ahora Director de Investigación y Posgrado de la UAEM, por la confianza depositada en mí, por su apoyo e interés mostrado en que trabajara en la Facultad de Ciencias de la UAEM, y en que realizara mis estudios de doctorado.

Al Dr. Jesús Guzman García, ahora Director de la División de Estudios de Posgrado de la UNAM, porque aún sin conocerme y a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre tuvo tiempo para escucharme y ayudarme a resolver los problemas que surgieron durante el desarrollo de mis estudios de doctorado y por el interés mostrado en todo momento en el avance y conclusión de mis estudios de doctorado.

A la Dra. Edda Sciutto Conde del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la M. en C. Helgi Jung Cook del Departamento de Farmacia de UNAM por el agua purificada con el equipo *Milli-Q Water Reagent System* proporcionada para la preparación de todas las disoluciones objeto de estudio en esta tesis.

Al Dr. Alexey V. Eliseev del Departamento de Química Medicinal de la Universidad de Buffalo en Nueva York, E.U.A.; por permitirme realizar una estancia en su laboratorio en el periodo 13 de noviembre al 8 de diciembre de 1995. Por instruirme en el manejo de un espectrómetro *Varian Gemini 300 MHz* y análisis de los resultados

obtenidos para las moléculas anfitrión. Por la realización de los cálculos de acoplamiento (docking) presentados en esta tesis. Por sus comentarios y discusiones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Marina I. Nelen del Departamento de Química Medicinal de la Universidad de Buffalo en Nueva York, E.U.A., por la valiosa ayuda proporcionada durante mi estancia y por las titulaciones espectrométricas realizadas con la tubocurarina a pH 9.0.

Al Prof. F. M. Menger del Departamento de Química de la Universidad de Emory en Atlanta, Georgia, E.U.A., por sus valiosos comentarios y por facilidades otorgadas para el empleo del espectrómetro *General Electric* GN 500 MHz, para la realización de las titulaciones espectrométricas de la tubocurarina a pH 6.0.

A la Facultad de Química y en particular al Departamento de Química Inorgánica de la División de Estudios de Posgrado de UNAM por permitirme utilizar sus instalaciones (laboratorio 213, biblioteca, etc.) y equipo para la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por todas las facilidades proporcionadas y recursos económicos conseguidos a través de la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM y del Programa SUPERA para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Químicas (Química Inorgánica) en la Facultad de Química de la UNAM en el periodo febrero 1994 – agosto 1997.

A la UNAM (Proyectos PAIP 4290-12 y DGAPA IN 205393) por los recursos económicos proporcionados a través del Dr. Yatsimirsky para la realización de una estancia en la Universidad de Buffalo en Nueva York, E.U.A.

A la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM por la Beca de Intercambio Académico UNAM-UAEM para la realización de los estudios de Doctorado

en Ciencias Químicas (Química Inorgánica) en la Facultad de Química de la UNAM en el periodo marzo 1994 – febrero 1995.

Al Programa Nacional de Superación del Personal Académico (SUPERA) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) por haberme otorgado la Beca de la Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES) para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Químicas (Química Inorgánica) en la Facultad de Química de la UNAM en el periodo agosto 1994 – enero 1997.

A los proyectos PADEP 005315 (1994), 005335 (1995) y 005325 (1996), por los recursos económicos proporcionados para la adquisición de reactivos y material de laboratorio empleados para la realización de esta tesis, así como para asistir a un Congreso Nacional en el que se presentaron algunos resultados parciales de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias de la UAEM, el Dr. Federico Vázquez H. y al M. en C. Ismael León R., por el interés y apoyo que han mostrado siempre en mi desempeño dentro de la UAEM, pero especialmente durante el desarrollo de mis estudios de doctorado.

A mis compañeros del Laboratorio 213 del Departamento de Química Inorgánica: Hugo y Dea por su amistad, apoyo e interés personal. Con especial cariño a Paola y Sofía, compañeras con las compartí tantas alegrías y algunos desencantos que no hicieron más que enriquecer mi vida y a todos ellos por hacer de esta etapa de mi vida algo inolvidable.



## Resumen

En esta tesis se presenta un estudio de reconocimiento molecular de moléculas y iones orgánicos de varias estructuras por dos macrociclos: un alcaloide, *d*-(+)-tubocurarina y el antibiótico rifampicina, como representantes de dos familias de macrociclos naturales.

Se estudió la habilidad de enlace no covalente de la *d*-tubocurarina en su forma dicatiónica al sulfonato de 8-anilino naftaleno y a 15 aniones del ácido benzoico sustituido, ácidos dicarboxílicos alifáticos y N-acetil- $\alpha$ -aminoácidos en disolución acuosa por las técnicas de fluorimetría, conductimetría y resonancia magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ). Las constantes de enlace varían de ca. 50 a 3300  $\text{M}^{-1}$  dependiendo de la estructura del huésped, la carga y la hidrofobicidad. Las características espectrales de fluorescencia y RMN de las especies enlazadas junto con los resultados de cálculos de acoplamiento (docking) muestran que la complejación anfitrión-huésped de aniones de ácidos aromáticos involucra la formación de un puente salino entre el nitrógeno cuaternario del alcaloide y el grupo aniónico del huésped al igual que interacciones hidrofóbicas/van der Waals entre las partes aromáticas del anfitrión y del huésped. Sin embargo, el enlace a dianiones de ácidos dicarboxílicos alifáticos muy probablemente es sólo electrostático. El alcaloide enlaza enantioespecíficamente aniones de N-acetil- $\alpha$ -aminoácidos y discrimina entre isómeros posicionales de aniones de ácidos benzoicos hidroxi- y carboxi- sustituidos. En general, la tubocurarina posee una habilidad de enlace comparable a la de ciclofanos sintéticos.

También se estudió la habilidad de enlace de la tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica a enantiómeros de los derivados de la fenilalanina zwitteriónicos, aniónicos y catiónicos en disolución acuosa por las técnicas de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS), fluorescencia y RMN  $^1\text{H}$ . Las constantes de enlace calculadas fueron del orden de  $10^2 \text{ M}^{-1}$  y casi independientes del estado iónico del huésped. Probablemente los huéspedes no pueden formar más de un par iónico debido a impedimento estérico o a repulsiones electrostáticas entre cargas del mismo signo, de tal forma que las principales fuerzas responsables de la complejación son las

interacciones entre las superficies hidrofóbicas y la formación de un puente salino. Se encontró, que a pesar de que la tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica presenta baja discriminación enantiomérica en términos termodinámicos es capaz de generar diferentes respuestas espectrales a la presencia de diversos huéspedes enantioméricos. Así, la asociación de los enantiómeros L y D tiene un efecto opuesto en la intensidad de fluorescencia y en los desplazamientos químicos de algunos protones de la tubocurarina, lo que puede emplearse para el desarrollo de nuevos sensores enantioespecíficos para aminoácidos.

Se encontró que la tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica muestra una actividad esterolítica. La reactividad observada fue atribuida a la sustitución nucleofílica de los ésteres por los grupos fenólicos desprotonados del alcaloide. La tubocurarina muestra la cinética de Michaelis con alto grado de enantioespecificidad para los ésteres de fenilalanina N-protegidos.

En el caso de la rifampicina se estudió su habilidad de enlace en su forma zwitteriónica para discriminar aminoácidos aniónicos y zwitteriónicos y bases nucleicas en disolución acuosa por las técnicas de UV-VIS y RMN  $^1\text{H}$ . Las constantes de enlace calculadas fueron del orden de  $10^2$ - $10^3 \text{ M}^{-1}$  y mostraron de una modesta a notable (de 2 a 5 veces) enantioselectividad para los aminoácidos. En el caso de los huéspedes heterocíclicos las constantes de enlace fueron más grandes que las previamente reportadas para ciclofanos sintéticos y fueron explicadas por la combinación de interacciones  $\pi$ - $\pi$ , cation- $\pi$  y enlace de hidrógeno.

## Abstract

This thesis presents a study of molecular recognition of organic molecules and ions of diverse structures by two macrocycles: an alkaloid *d*-(+)-tubocurarine and an antibiotic rifampicin representing two families of natural macrocycles.

The binding of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate and 15 anions of substituted benzoic, aliphatic dicarboxylic, and N-acetyl- $\alpha$ -amino acids to the macrocyclic alkaloid *d*-tubocurarine in its dicationic form in aqueous solution has been studied by fluorometry, conductometry, and proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). The binding constants vary from *ca.* 50 to 3300  $\text{M}^{-1}$  depending on the guest structure, charge and hydrophobicity. The results of fluorescence and NMR studies together with docking calculations show that the host-guest complexations of the anions of aromatic acids involves the formation of a salt bridge between the quaternary nitrogen of the alkaloid and the anionic group of the guest as well as hydrophobic/van der Waals interactions between the guest and host aromatic moieties. The binding of dianions of aliphatic dicarboxylic acids most probably is purely electrostatic. The alkaloid binds to enantiospecifically anions of N-acetyl- $\alpha$ -amino acids and discriminates between positional isomers of anions of hydroxy and carboxy substituted benzoic acids. In general, *d*-tubocurarine possesses binding ability comparable to that of synthetic cyclophanes.

In addition the binding of enantiomers of phenylalanine zwitterions, anions and cations to *d*-tubocurarine in its bis-zwitterionic form has been studied by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-VIS), fluorometry and  $^1\text{H}$  NMR. The binding constants of  $10^2 \text{ M}^{-1}$  were calculated and were almost independent on the ionic state of the guest. The most probable explanation is the inability to form optimal number of ion pairs between the host and the guest due to a steric hindrance and/or electrostatic repulsions between similar charges. Thus, it appears that primary driving forces for the complexation are the surface hydrophobic interactions and formation of one salt bridge. It was found that in spite of low thermodynamic discriminative ability of the bis-zwitterionic form of *d*-tubocurarine, it produced different spectral responses to different

guest enantiomers. Thus the binding of L and D enantiomers produces opposite effects on the fluorescence intensity and chemical shifts of some tubocurarine protons. These observations can find application for development of new enantiospecific sensors for amino acid derivatives.

It was demonstrated that the tubocurarine zwitterion possesses an esterolytic activity. The observed reactivity was attributed to the nucleophilic substitution of the ester substrate by deprotonated alkaloid phenolic groups. Tubocurarine shows the Michaelis-type kinetics and possesses a high enantioselectivity in the cleavage of the esters of N-protected phenylalanine.

The ability of rifampicin in its zwitterionic form to discriminate anionic and zwitterionic forms of amino acids as well as nucleobases and caffeine derivatives in aqueous solutions was studied by UV-VIS and  $^1\text{H}$  NMR methods. The binding constants ranged from  $10^2$  to  $10^3 \text{ M}^{-1}$  and showed modest to notable (from 2 to 5 times) enantioselectivity for amino acid derivatives. In the case of heterocyclic guests the binding were stronger than previously reported for synthetic cyclophanes and generally were explicable by a combination of  $\pi$ - $\pi$ , cation- $\pi$  and H-bond interactions.

Los principales resultados de esta tesis han sido publicados en:

1. "Binding of organic anions to a macrocyclic alkaloid d-tubocurarine", Carolina Godoy Alcántar, Alexey V. Eliseev, Anatoly K. Yatsimirsky, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (1995) **5**, 2993-2998.
2. "Molecular Recognition by Natural Macrocycles. I. d-Tubocurarine as a Host Molecule for Organic Anions", Carolina Godoy Alcántar, Alexey V. Eliseev, Anatoly K. Yatsimirsky, *Journal of Molecular Recognition*, (1996) **9**, 54-64.
3. "Molecular Recognition by Natural Macrocycles. II. Chiral discrimination of amino acid derivatives by zwitterionic form of d-tubocurarine", Carolina Godoy Alcántar, Marina I. Nelen, Alexey V. Eliseev, Anatoly K. Yatsimirsky, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (enviado).

y presentados en los siguientes congresos:

1. *Reconocimiento Molecular con Tubocurarina*, Carolina Godoy y Anatoli Yatsimirsky, XXX Congreso Mexicano de Química, Cancún Q. R., México (octubre 16-20, 1994).
2. *Recognition of Organic Anions by a Natural Cyclophane d-Tubocurarine*; Anatoli K. Yatsimirsky, Carolina Godoy A., Alexey V. Eliseev, 36th Annual Buffalo Medicinal Chemistry Symposium, Buffalo, NY, USA (mayo 21-24, 1995).
3. *Reconocimiento Molecular con Macrociclos Naturales*, Carolina Godoy y Anatoli K. Yatsimirsky, Escuela de Verano en Química, Cuernavaca Mor., México (julio 22 - agosto 9, 1996).



# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Interacciones no covalentes</b>	<b>7</b>
<b>2.1.1 Interacciones electrostráticas</b>	<b>8</b>
<b>A. Asociación iónica en disolución</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2 Interacciones de van der Waals</b>	<b>21</b>
<b>A. Teoría general de las fuerzas de van der Waals entre moléculas</b>	<b>25</b>
<b>B. Fuerzas de van der Waals en sistemas anfitrión-huésped</b>	<b>26</b>
<b>2.1.3 Interacciones <math>\pi</math>-<math>\pi</math></b>	<b>27</b>
<b>A. Interacciones <math>\pi</math>-<math>\pi</math> en sistemas anfitrión-huésped</b>	<b>30</b>
<b>2.1.4 Interacciones <math>N^+</math>-<math>\pi</math></b>	<b>32</b>
<b>A. Interacciones <math>N^+</math>-<math>\pi</math> en sistemas anfitrión-huésped</b>	<b>35</b>
<b>2.1.5 Enlace de hidrógeno</b>	<b>37</b>
<b>A. El enlace de hidrógeno en sistemas anfitrión-huésped</b>	<b>38</b>
<b>2.1.6 El efecto hidrofóbico</b>	<b>40</b>
<b>A. Desarrollo del concepto de hidratación hidrofóbica</b>	<b>41</b>
<b>B. El efecto hidrofóbico en sistemas anfitrión-huésped</b>	<b>50</b>
<b>2.2 Macrociclos naturales y sintéticos</b>	<b>56</b>
<b>2.2.1 Las ciclodextrinas como anfitriones</b>	<b>57</b>
<b>A. Naturaleza de las ciclodextrinas</b>	<b>57</b>
<b>B. Comportamiento de inclusión de las ciclodextrinas</b>	<b>58</b>
<b>2.2.2 Macrociclos naturales</b>	<b>60</b>
<b>2.2.2.1 Bis(bibencilos)</b>	<b>60</b>
<b>2.2.2.2 Tricotecenas macrocíclicas</b>	<b>61</b>
<b>2.2.2.3 Alcaloides isoquinolínicos</b>	<b>62</b>
<b>A. Tubocurarina</b>	<b>63</b>
<b>2.2.2.4 Rifamicinas</b>	<b>66</b>
<b>A. Antecedentes de la rifampicina</b>	<b>69</b>
<b>B. Características y propiedades de la rifampicina</b>	<b>69</b>
<b>2.2.2.5 Otros macrociclos naturales</b>	<b>75</b>
<b>2.2.3 Macrociclos sintéticos como anfitriones</b>	<b>77</b>
<b>2.2.3.1 Los calixarenos como anfitriones</b>	<b>77</b>
<b>A. Naturaleza de los calixarenos</b>	<b>77</b>
<b>B. Complejos de inclusión de los calixarenos</b>	<b>79</b>
<b>2.2.3.2 Los ciclofanos como anfitriones</b>	<b>80</b>
<b>A. Naturaleza de los ciclofanos</b>	<b>80</b>
<b>B. Estudios preliminares de los ciclofanos</b>	<b>81</b>
<b>C. Complejos de inclusión de los ciclofanos y naturaleza del proceso de inclusión</b>	<b>83</b>
<b>2.3 Reconocimiento de sustratos aniónicos</b>	<b>86</b>
<b>2.4 Receptores ditópicos</b>	<b>90</b>

2.5 Discriminación de enantiómeros de aminoácidos en la complejación supramolecular	92
<b>3. Objetivos</b>	<b>94</b>
3.1 Objetivos generales	94
3.2 Objetivos específicos	95
<b>4. Metodología experimental</b>	<b>96</b>
4.1 Reactivos	96
4.2 pH y pD	97
4.3 Soluciones amortiguadoras y fuerza iónica	98
4.4 Métodos ópticos	99
4.4.1 Estudios por espectroscopia de absorción electrónica en la región ultravioleta-visible	99
4.4.2 Estudios por espectroscopia de emisión electrónica	100
4.5 Estudios por conductometría	101
4.6 Estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear	102
4.7 Cálculos y ajustes	103
4.7.1 Número y modelos de ajuste de los datos experimentales	103
4.7.2 Cálculo de errores asociados a las constantes de enlace reportadas	104
4.8 Procedimientos experimentales y cálculo de parámetros	106
A. Estudios de fluorescencia directa a pH 9.0	107
B. Estudios de fluorescencia por competencia a pH 9.0	110
<b>5. Estudios de la tubocurarina en forma dicatiónica</b>	<b>114</b>
5.1 Sustratos estudiados	114
5.2 Determinación de los $pK_a$ 's de la tubocurarina por espectroscopia de absorción electrónica	116
5.3 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de emisión electrónica	122
5.4 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por conductometría	127
5.5 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por resonancia magnética protónica	136
5.6 Discusión de los datos experimentales, constantes de enlace e información obtenida para las interacciones tubocurarina-huésped a pH 6.0 y 7.0	149
<b>6. Estudios de la tubocurarina en forma zwitteriónica</b>	<b>159</b>
6.1 Sustratos estudiados	159
6.2 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de emisión electrónica	161
6.2.1 Estudios de fluorescencia directa	162

6.2.2 Estudios de fluorescencia por competencia	173
6.3 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de absorción electrónica	179
6.4 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por resonancia magnética protónica	183
6.4.1 Cálculo de la constante de asociación	183
6.5 Cinética de la hidrólisis de ésteres por la tubocurarina empleando la espectroscopia de absorción electrónica	196
6.5.1 Cinética de hidrólisis del acetato de <i>para</i> -nitrofenilo	196
6.5.2 Cinética de hidrólisis de los ésteres enantioméricos del <i>para</i> -nitrofenilo-N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina	201
6.6 Discusión	204
<b>7. Estudios de la rifampicina</b>	<b>216</b>
7.1 Estudios preliminares de la rifampicina	216
7.1.1 Espectro ultravioleta-visible de la rifampicina	217
7.1.2 Determinación de los $pK_a$ 's de la rifampicina	218
7.1.3 Estabilidad de la rifampicina a diferentes pH's	222
7.2 Estudio de la interacción de RIFAM con diversos huéspedes por espectrofotometría ultravioleta-visible	226
7.2.1 Estudio de la interacción RIFAM-aminoácido a pH 6.0	226
7.2.1.1 Metodología experimental	227
7.2.1.2 Cálculo de la constante de asociación	227
7.2.1.3 Discusión	251
7.3 Estudios de la rifampicina por resonancia magnética protónica	254
7.3.1 Determinación de un $pK_a$ de la rifampicina	254
7.3.2 Interacción RIFAM-aminoácido a pD 6.44	257
7.3.3 Titulación de RIFAM con NADFA a pD 6.44	258
7.3.4 Interacciones RIFAM-NADFA y RIFAM-NALFA en $CDCl_3$	258
7.3.5 Interacciones RIFAM-aminoácido a pD 8.94	259
7.3.6 Interacción RIFAM-LFAME a pD 8.94	259
7.3.7 Discusión	261
<b>8. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>263</b>
8.1 Conclusiones	263
8.2 Perspectivas para trabajos futuros	264
<b>9. Apéndices</b>	<b>267</b>
<b>Apéndices A. Ecuaciones empleadas</b>	<b>267</b>
<b>Apéndice A.1 Ecuaciones para el cálculo de los <math>pK_a</math>'s de la tubocurarina</b>	<b>267</b>
<b>Apéndice A.2 Ecuación para calcular la constante de asociación tubocurarina-ligante por fluorescencia</b>	<b>271</b>

<b>Apéndice A.3</b> Ecuación para el cálculo de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por conductividad	274
<b>Apéndice A.4</b> Ecuación para el cálculo de las constantes de velocidad de segundo orden $k_1$ y $k_2$ de la reacción de hidrólisis del acetato del <i>para</i> -nitrofenilo por la tubocurarina	285
<b>Apéndice A.5</b> Desarrollo de la ecuación de Michaelis-Menten y su aplicación al estudio de la hidrólisis de los ésteres enantioméricos del <i>para</i> -nitrofenilo-N-carbobenciloxi-fenilalanina por la tubocurarina	289
<b>Apéndice A.6</b> Ecuación para el cálculo de dos $pK_a$ 's de la rifampicina por espectrofotometría ultravioleta-visible	294
<b>Apéndice A.7</b> Ecuación para el cálculo de la constante de enlace rifampicina-sustrato por espectrofotometría ultravioleta-visible	297
<b>Apéndice A.8</b> Ecuación para el cálculo de un $pK_a$ de la rifampicina a partir de estudios de resonancia magnética protónica	302
<b>Apéndice B.</b> Tablas que presentan los datos obtenidos por las diferentes técnicas experimentales para el cálculo de las constantes de asociación de las especies TC-huésped y de los $pK_a$ 's de la TC	307
<b>Apéndice C.</b> Tablas que presentan los datos obtenidos de las diferentes técnicas experimentales para el estudio de las interacciones TC-huésped a pH 9.0 empleados para el cálculo de las constantes de enlace correspondientes	317
<b>Apéndice D.</b> Tablas que presentan las absorbancias a diferentes $\lambda$ 's de la mezcla rifampicina-sustrato y sustrato empleadas para el cálculo de las constantes de enlace correspondientes	333
<b>10. Bibliografía</b>	<b>348</b>

## 1. Introducción

La química molecular ha manifestado su poder sobre el enlace covalente al sintetizar nuevas moléculas y materiales con nuevas propiedades, pero más allá de la química molecular está la química supramolecular cuyo objetivo es obtener el control sobre el enlace intermolecular.

El concepto y el término de química supramolecular fue introducido en 1978 [Lehn, 1978]. La química supramolecular es un campo altamente interdisciplinario de la ciencia que cubre los aspectos químicos, físicos y biológicos de las especies químicas de complejidad más grande que las moléculas mismas que se mantienen unidas y organizadas por medio de interacciones no covalentes de enlace.

El campo de la química supramolecular comenzó con el enlace selectivo de cationes metálicos alcalinos por ligantes macrocíclicos y macropolicíclicos naturales [Shemayakin *et al.*, 1963; Beck *et al.*, 1962] y sintéticos, los éteres corona [Pedersen, 1967, 1988] y los criptandos [Dietrich *et al.*, 1969, 1973a, 1973b; Lehn, 1973]. Sin embargo, su campo de acción se amplió y extendió a la identificación del reconocimiento molecular y al estudio de las interacciones intermoleculares con la participación de especies tanto orgánicas como inorgánicas. De esta forma la química del reconocimiento molecular se convirtió en la parte esencial de la química "anfitrión-huésped".

Las especies supramoleculares se caracterizan por el arreglo espacial de sus componentes, su arquitectura o superestructura y por la naturaleza de los enlaces intermoleculares que mantienen unidos a sus componentes. Existen diferentes tipos de interacciones, los cuales varían en fuerza, direccionalidad, dependencia de la distancia y ángulos: coordinación de iones metálicos, fuerzas electrostáticas, enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones donador-aceptor, etc. Sus fuerzas de unión van desde débiles o moderadas, como en los enlaces de hidrógeno, a fuertes o muy fuertes, como en el caso de la coordinación de iones metálicos. Sin embargo, las fuerzas intermoleculares, son en general, más débiles que los enlaces covalentes, de tal forma que las especies supramoleculares son termodinámicamente

menos estables, cinéticamente más lábiles y dinámicamente más flexibles que las moléculas [Lehn, 1995]. Típicamente las interacciones mencionadas se caracterizan por valores de  $\Delta G^\circ \approx -(4.2-8.4)$  kJ/mol por grupo funcional. Esto significa que para obtener energías libres de interacciones anfitrión-huésped menores de  $-(12.6-16.7)$  kJ/mol (la frontera aproximada de las interacciones específicas con constantes de asociación alrededor o mayores que  $10^2 \text{ M}^{-1}$ ), debe presentar un número máximo de sitios de interacción independientes para aumentar su afinidad.

Para obtener interacciones por pares en diversas posiciones de la molécula debe existir una complementaridad entre arreglos de sitios de enlace, lo cual trae como consecuencia la especificidad y estabilidad en la complejación.

En términos generales el reconocimiento molecular es la capacidad de discriminar (en términos cinéticos o termodinámicos o por el tipo de señal producido por la interacción) las moléculas con diversas estructuras y es una de las características más importantes de las moléculas biológicas. El reconocimiento molecular asegura la precisión del proceso de transcripción, la especificidad de las interacciones anticuerpo-antígeno, la regulación del receptor y la especificidad de las enzimas.

El reconocimiento molecular implica la antes mencionada complementaridad geométrica e interaccional entre las especies que se asocian. Para alcanzar esta afinidad deben considerarse los siguientes factores [Lehn, 1995]:

- a) estéricos (forma y tamaño), complementaridad entre el sustrato y el receptor, por ejemplo la presencia de superficies convexas y cóncavas en la posición correcta en el sustrato y receptor.
- b) complementaridad de interacciones, es decir, la complementaridad entre sitios de enlace (electrostáticos tales como carga positiva/negativa, carga/dipolo, dipolo/dipolo, donador de enlace de hidrógeno/aceptor, etc.) en la disposición correcta en el receptor y sustrato para alcanzar complementaridad electrónica y distribución nuclear (electrostática, enlace de hidrógeno y van der Waals).
- c) sitios de interacción múltiple, ya que las interacciones no covalentes son débiles comparadas con los enlaces covalentes.

d) enlace fuerte, la alta estabilidad en principio no implica necesariamente alta selectividad; sin embargo, éste es generalmente el caso. La alta eficiencia de enlace (es decir, una alta fracción de enlazada con respecto a la libre) requiere una fuerte interacción; así para alcanzar un reconocimiento eficiente, *i.e.*, alta estabilidad y alta selectividad se requiere un enlace fuerte entre el sustrato y el receptor.

En particular, la complementariedad depende de que tan bien está definida la estructura tridimensional con el arreglo correcto de sitios de enlaces. Además, el receptor y el sustrato deben estar en contacto en un área grande, el receptor debe ser capaz de envolver a su huésped de tal manera que pueda establecer numerosas interacciones de enlace no covalente y "sentir" su tamaño, forma y arquitectura. En principio las estructuras macrocíclicas, en particular las policíclicas, reúnen estos requisitos. Siendo grandes (macro) y altamente conectadas (cíclicas), son convenientes para la construcción de moléculas que contienen las cavidades, grietas y bolsas que proveen la estructura apropiada para el arreglo de sitios de enlace, grupos reactivos y especies enlazadas [Lehn, 1995].

Las subunidades de un receptor definen el tamaño, forma, rigidez o flexibilidad de su cavidad de enlace. La forma completa y su apariencia ha dado lugar a la asignación de diversos nombres llamados triviales y que se refieren al aspecto particular de la estructura. Entre los receptores macrocíclicos se pueden citar a los éteres corona, los coronandos o torandos, los clatroquelatos, coordinatoclatratos, criptandos, epelandos, esferandos, cavitandos, carcerandos, calixarenos, ciclofanos y los criptofanos, entre otros [Lehn, 1995].

Actualmente hay un gran interés en el desarrollo de sistemas químicos que presenten reconocimiento molecular para asegurar las características de selectividad, especificidad y velocidad de transformación, comparables con las biológicas [Lehn, 1990; Diederich, 1988; Schneider y Dürr, 1991; Rebek, 1987].

Uno de los problemas más difíciles en esta área es el de la síntesis química de los macrociclos. Todos los procesos de ciclización están acompañados por polimerización y para bajar la contribución de esta última la síntesis se realiza en disoluciones diluidas, lo que hace difícil el proceso de separación. En algunos casos

ayuda mucho la adición del huésped en el medio de reacción gracias al efecto plantilla; sin embargo, esto funciona bien sólo con metales como huéspedes. Un problema adicional es la preparación de los macrociclos quirales y/o con un arreglo de sitios de no simétricos. Debido a todos estos problemas no es sorprendente que para aplicaciones prácticas como anfitriones para huéspedes orgánicos se emplee un sólo grupo de los macrociclos, las ciclodextrinas [Szejtli, 1988], las cuales son macrociclos naturales. Por sus características como anfitriones (estabilidad y especificidad de complejación), las ciclodextrinas son considerablemente menos efectivas que, por ejemplo, ciclofanos y calixarenos; sin embargo, la posibilidad de obtenerlas sin síntesis química por rutas biológicas (ahora muy desarrolladas) las hace más atractivas. Cabe mencionar que la biosíntesis de las ciclodextrinas es un proceso lateral y su destino biológico no es claro. Por lo menos no hay indicaciones de que actúen como anfitriones y parecen que tienen esa capacidad "por ocasión".

Llama la atención la existencia de varias otras sustancias biológicas (algunos alcaloides, antibióticos, etc.) que por sus estructuras pueden considerarse como posibles anfitriones para moléculas orgánicas. El probar sus propiedades como anfitriones podrían llevar al descubrimiento de nuevos "receptores" con alta especificidad y afinidad, que incluyen en sus estructuras ya preparadas, sitios quirales, grupos polares y/o iónicos en combinación con sitios hidrofóbicos. Por otro lado, tal estudio tiene interés para una descripción más completa del comportamiento biológico de dichos macrociclos.

En este trabajo se presenta un estudio de reconocimiento molecular de moléculas y iones orgánicos de varias estructuras por dos macrociclos: un alcaloide *d*-(+)-tubocurarina y el antibiótico rifampicina, como representantes de dos familias de macrociclos naturales. Las razones por las que se escogieron estas moléculas en particular se presentan mas adelante (ver **Objetivos**).

La tesis esta organizada de la siguiente manera:

**Antecedentes**, presenta una breve revisión de los tipos de interacciones intermoleculares responsables del reconocimiento molecular en complejos del tipo anfitrión-huésped. Además se presentan las estructuras y propiedades de algunos

macrociclos naturales, así como el reconocimiento molecular de huéspedes aniónicos; aspectos fundamentales de este estudio.

**Objetivos generales y específicos**, presenta las razones por las que fueron seleccionadas la tubocurarina y rifampicina como macrociclos de estudio, los objetivos generales de la tesis y en forma específica los objetivos de estudio de la tubocurarina en su forma dicatiónica, bi-zwitteriónica y de la rifampicina.

**Metodología**, presenta los reactivos empleados, condiciones de pH y pD, soluciones amortiguadoras y fuerza iónica. Métodos ópticos y resonancia magnética nuclear. Para las técnicas experimentales empleadas se describe brevemente la técnica y su utilidad para el cálculo de las constantes de asociación e interacciones en los sistemas anfitrión-huésped y los aparatos empleados. También presenta algunos comentarios y consideraciones hechas para el ajuste de los datos experimentales, el cálculo de las constantes de asociación y sus errores asociados. Además describe en términos generales el procedimiento experimental y análisis de los datos obtenidos.

**Estudios de la tubocurarina en forma dicatiónica**, presenta el estudio y cálculo de las constantes de asociación de la tubocurarina en su forma dicatiónica con diversos huéspedes aniónicos, agrupados de acuerdo a las técnicas experimentales empleadas.

**Estudios de la tubocurarina en forma zwitteriónica**, presenta el estudio y cálculo de las constantes de asociación de la tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica con diversos huéspedes aniónicos, catiónicos y neutros, así el estudio de la cinética de hidrólisis de un par de ésteres enantioméricos.

**Estudios de la rifampicina**, presenta el estudio y cálculo de las constantes de asociación de la rifampicina en su forma zwitteriónica y aniónica con huéspedes cargados y neutros.

**Conclusiones y perspectivas**, presenta en forma específica las conclusiones para los estudios de la tubocurarina en forma dicatiónica y zwitteriónica y para la rifampicina, así como las perspectivas para trabajos futuros.

**Apéndices A, B, C y D**, presentan la deducción de las ecuaciones de cálculo de las constantes de asociación anfitrión-huésped, tablas de datos experimentales de cada técnica y cada par huésped-anfitrión.

**Bibliografía**, incluye libros y referencias de artículos citados en la tesis.

Es importante señalar que a lo largo de todo el texto las moléculas empleadas en este trabajo la d-tubocurarina y la rifampicina son denominadas como moléculas anfitrión o receptor, indistintamente. Mientras que las moléculas orgánicas pequeñas para las cuales se determinó su constante de asociación con las moléculas anfitrión, se denominaron en la mayor parte de los casos como moléculas huésped; sin embargo, en algunos casos se emplearon los términos sustrato o ligante, indistintamente.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Interacciones no covalentes

Muchos tipos de energías de interacción pueden citarse: si las especies involucradas tienen una carga neta entonces se trata claramente de una *interacción Coulómbica* de largo alcance. Aún si no hay una carga neta, la simetría de las distribuciones de carga positiva y negativa en cada molécula pueden dar lugar a una *energía electrostática* directa. Más aún, el campo eléctrico que resulta de la distribución de carga de una molécula puede inducir pequeños cambios en la distribución electrónica de una molécula vecina, esto da lugar a una energía de interacción llamada *energía de inducción*. Finalmente hay una fuente sutil de fuerzas atractivas debidas al *efecto de dispersión*, en la cual los dipolos instantáneos asociados con el rápido movimiento de electrones en una molécula están correlacionados con los correspondientes en un vecino. Esta interacción es frecuentemente la mayor fuente de fuerzas atractivas y esta presente en todos los tipos de moléculas.

Para ciertas moléculas, pueden surgir algunos otros tipos de energías de interacción, las cuales pueden ser de considerable importancia. Este tipo de energías incluyen las de *enlace de hidrógeno*, interacciones de *transferencia de carga* y solvofóbicas, las cuales pueden ser importantes fuerzas atractivas.

Las interacciones no covalentes constituyen la base para la transferencia de información entre moléculas en los sistemas vivos al igual que en las estructuras supramoleculares sintéticas. A pesar de las descripciones cada vez más exactas de sistemas biológicos y la creciente diversidad de complejos anfitrión-huésped el entendimiento de las fuerzas intermoleculares es aún limitado. La química orgánica hace posible la construcción de moléculas anfitrión con múltiples centros que interactúan complementariamente. La variación sistemática de las estructuras del anfitrión y del huésped y sus microambientes en disolución permite la identificación y estudio de los diferentes tipos de interacciones, las cuales han mostrado tener un alto grado de aditividad [Schneider, 1991]. El objetivo de las siguientes secciones es

presentar una revisión de la naturaleza de las principales interacciones que se han encontrado en diversos complejos orgánicos anfitrión-huésped, resaltando particularmente la contribución de estas interacciones a la constante de asociación.

### 2.1.1 Interacciones electrostáticas

La atracción entre cargas de signo opuesto puede considerarse como el mayor componente de las fuerzas intermoleculares. Las atracciones más fuertes de este tipo surgen entre iones cargados opuestamente. Sin embargo, las contribuciones electrostáticas directas a la energía de interacción de un par de moléculas sin carga ocurre cuando ellas tienen momentos dipolares. Entonces las interacciones coulómbicas entre los núcleos positivamente cargados y los electrones negativamente cargados de una molécula con las cargas correspondientes de la otra molécula se sumaran para dar una energía total que es generalmente diferente de cero, y que depende fuertemente de la separación y orientación relativa de las moléculas. La distribución de cargas dentro de una molécula se describe generalmente en términos de los momentos multipolares de la especie. El momento de orden más bajo es la carga neta total de una partícula, el monopolo, el cual es cero para moléculas neutras. El momento de primer orden, el dipolo, surge cuando los centros de carga positiva y negativa de la molécula no coinciden. Estos pueden ser representados en términos de cargas parciales,  $\delta_{\pm}$ , separados por una distancia,  $r$ , y la magnitud del momento dipolar esta dado por el producto  $r\delta$ . En muchos casos las moléculas tienen momentos dipolares cero, debido a su simetría (p. ej.  $\text{CO}_2$ ). El siguiente momento es el cuadrupolo, momentos aún más grandes, de órdenes  $2^n$ , con  $n > 2$ , pueden ser generados por distribuciones convenientes de cargas  $2^n$ ; por ejemplo con  $n = 3$  se tiene el octupolo, el cual es el multipolo más bajo diferente de cero. En general una molécula puede poseer una serie de momentos multipolares, y aunque hay una tendencia a enfatizar la importancia de los momentos más bajos diferentes de cero, la

representación completa de la distribución de carga requiere la inclusión de todos los momentos.

Para pares de moléculas separadas por una distancia que es mayor comparada con las dimensiones moleculares, la energía electrostática directa, puede expresarse en términos de la separación, la orientación relativa y los momentos multipolares.

La energía electrostática puede ser escrita como una suma de interacciones entre los multipolos de dos moléculas:

$$W = \sum_i \sum_j W_{ij}$$

donde los primeros nueve términos de la sumatoria corresponden a las interacciones: 1) monopolo-monopolo (carga-carga), 2) monopolo-dipolo (carga-dipolo), 3) dipolo-monopolo (dipolo-carga), 4) dipolo-dipolo, 5) monopolo-cuadrupolo (carga-cuadrupolo), 6) cuadrupolo-monopolo (cuadrupolo-carga), 7) dipolo-cuadrupolo, 8) cuadrupolo-dipolo y 9) cuadrupolo-cuadrupolo.

**Interacciones carga-carga.** La energía potencial de interacción entre dos cargas eléctricas  $q_1$  y  $q_2$  separadas por una distancia  $r$  en un medio homogéneo de constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) esta dado por la ley de Coulomb y puede escribirse como:

$$V \propto \frac{q_1 q_2}{\epsilon r}$$

Interacciones más débiles son también posibles a separaciones de carga muy grandes debido a que la fuerza de interacción de Coulomb varia como  $1/r$  y tiene el intervalo más grande de cualquier interacción electrostática. La dependencia de las interacciones carga-carga varia como  $1/r$  y es espacialmente isotrópica.

**Polarizabilidad.** La polarizabilidad está definida como la tendencia de una distribución de electrones dada a ser espacialmente distorsionada, y esta propiedad está inversamente relacionada a la electronegatividad de un átomo dado. Tiene unidades de volumen. La polarizabilidad se incrementa con el radio atómico, debido a que los electrones están menos fuertemente enlazados.

La energía potencial debida a la inducción de un dipolo de polarizabilidad  $\alpha$  por una carga puntual de magnitud  $q$  a la distancia  $r$  esta dada por:

$$V \propto \frac{-0.5\alpha q^2}{r^4}$$

La dependencia de la distancia de los efectos de polarizabilidad varia como  $1/r^4$ , y es espacialmente isotrópica.

**Interacciones carga-dipolo.** Un dipolo eléctrico se forma cuando dos cargas vecinas de signo opuesto se unen, y el momento dipolar eléctrico resultante (una cantidad vectorial, con unidades Debye, D) es una función de las magnitudes de carga y su distancia de separación.

La energía potencial debida a la interacción carga-dipolo es

$$V \propto qq_1 \left( \frac{1}{r_+} - \frac{1}{r_-} \right)$$

donde  $q_1$  es la carga que interactúa con el dipolo,  $q$  es la magnitud de la carga en cualquier extremo del dipolo,  $r_+$  es la distancia entre la carga  $q_1$  y  $+q$ , y  $r_-$  es la distancia entre la carga  $q_1$  y  $-q$ . Las interacciones carga-dipolo son necesariamente más débiles que las interacciones carga-carga debido a la cancelación de los efectos de las cargas opuestas que constituyen el momento dipolar electrónico. Cuando la carga  $q_1$  está a una distancia lejos del dipolo electrónico ( $\mu$ ), la energía potencial de la interacción varia de acuerdo a  $1/r^2$ , y está dada por:

$$V \propto \frac{q\mu \cos\theta}{r^2}$$

donde el ángulo  $\theta$  es el ángulo formado entre el momento dipolar del dipolo y la carga. Por lo tanto, la interacción carga-dipolo está en un intervalo más corto que la interacción carga-carga, la cual varia de acuerdo a  $1/r$ . La interacción carga-dipolo también difiere de la interacción carga-carga, debido a que la energía potencial de la primera interacción depende de la orientación precisa del momento dipolar con respecto a la carga vecina. Esta dependencia de la orientación espacial es característica de todas las interacciones que involucran al menos un dipolo o un

momento multipolar eléctrico de orden más alto. La dependencia de la distancia de la interacción carga-dipolo esta dada por  $1/r^2$  y es espacialmente anisotrópica.

**Interacciones dipolo-dipolo.** Las interacciones dipolo-dipolo son aún más débiles y de intervalo más corto que la interacción carga-dipolo. La fuerza de la interacción depende de la distancia  $r$  entre los centros de los dos dipolos, sus momentos dipolares  $\mu_1$  y  $\mu_2$ , y los ángulo  $\theta_1$  y  $\theta_2$  entre cada momento dipolar eléctrico y el vector  $r$ , y esta dado por:

$$V \propto \frac{-\mu_1\mu_2(2 \cos\theta_1 \cos\theta_2 - \text{sen}\theta_1 \text{sen}\theta_2)}{r^3}$$

donde  $\theta_1$  y  $\theta_2$  están definidos como los ángulos entre los dos momentos dipolares y el vector que conecta sus centros (Figura 2.1a) El arreglo óptimo ocurre cuando los dos dipolos eléctricos son colineares y el extremo cargado positivamente de un momento dipolar es adyacente al extremo cargado negativamente del otro (Figura 2.1b). En este arreglo, la energía potencial de interacción esta dada por:

$$V \propto \frac{-2\mu_1\mu_2}{r^3}$$

En contraste, si los momentos dipolares son antiparalelos uno al otro (Figura 2.1c), la energía potencial de interacción se reduce a:

$$V \propto \frac{-\mu_1\mu_2}{r^3}$$

y comienza a ser repulsiva,

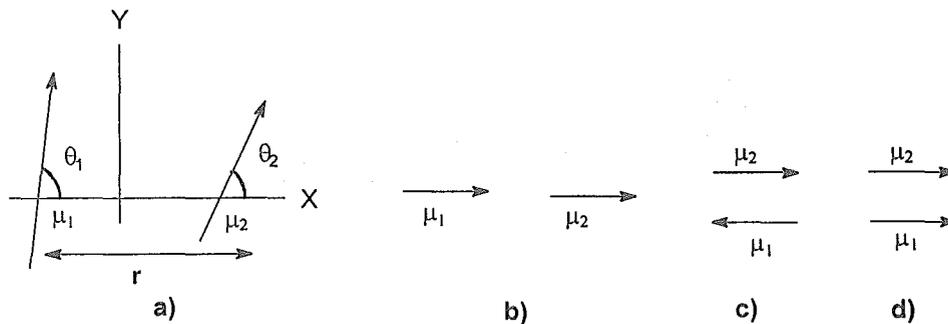
$$V \propto \frac{\mu_1\mu_2}{r^3}$$

si los momentos dipolares están orientados paralelos uno al otro (Figura 2.1d). Por lo tanto, la fuerza y el signo de la interacción dipolo-dipolo depende críticamente del arreglo espacial de los momentos dipolares eléctricos.

**Interacciones con cuadrupolos eléctricos.** El cuadrupolo eléctrico más simple se forma cuando tres cargas, dos iguales con una carga unitaria y una diferente con el doble de la carga unitaria se alinean:

$$+q \quad -2q \quad +q$$

Este grupo de cargas es eléctricamente neutro, y su arreglo no tiene un momento dipolar neto; pero tiene un momento cuadrupolar diferente de cero, el cual es una cantidad de seis términos llamado un tensor.



**Figura 2.1.** a) Caso general de la interacción dipolo-dipolo. Los ángulos  $\theta_1$  y  $\theta_2$  definen la orientación de los dos momentos dipolares  $\mu_1$  y  $\mu_2$  con respecto al vector  $r$ , el cual pasa del centro de un dipolo al centro del otro dipolo. La magnitud del vector es la separación de los dos dipolos. b) Interacción dipolo-dipolo colineal. c) Interacción dipolo-dipolo antiparalelo. d) Interacción dipolo-dipolo paralelo.

Un momento dipolar de una distribución de carga  $[\rho(x, y, z)]$  está formalmente definido como una matriz simétrica 3 x 3, o tensor, los términos del cual ( $Q_{ij}$ ) están dados por integrales donde  $V$  es el volumen ocupado por la función de distribución de carga  $\rho(x, y, z)$ , y  $dV$  es el elemento diferencial de volumen,

$$Q_{x,x} = \int_V x^2 \rho(x, y, z) dV$$

etc. con  $y,y; z,z; x,y; x,z; y,z$ .

La dependencia de la distancia de tres tipos de interacciones con momentos cuadrupolares puede calcularse a partir de:

Tipo de interacción	Potencial
Carga-cuadrupolo	$V \propto 1/r^3$
Dipolo-cuadrupolo	$V \propto 1/r^4$
Cuadrupolo-cuadrupolo	$V \propto 1/r^5$

Las magnitudes y signos de estas interacciones dependen también del arreglo espacial de las cargas, con arreglos entálpicos óptimos que aproximan dos cargas diferentes una a otra y separan cargas iguales.

## Jerarquía de las interacciones electrostáticas

En la Tabla 2.1 se presenta una clasificación de las interacciones electrostáticas en función de su dependencia de la distancia (el símbolo  $\ominus$  se incluye para indicar la dependencia en el arreglo espacial, y el símbolo D se incluye para denotar la dependencia de la orientación relativa de los dos momentos cuadrupolares). Esta clasificación demuestra que las interacciones electrostáticas se expanden en un amplio intervalo de dependencias de distancias y geometrías. Esta clasificación provee un medio de determinar la importancia relativa de cada posible interacción a separaciones atómicas y geometrías de interacción.

**Tabla 2.1.** Dependencia espacial y de distancia de las interacciones electrostáticas.

	Carga	Dipolo	Cuadrupolo	London	Repulsión electrónica
Carga	$\pm 1/r$	$\pm \ominus/r^2$	$\pm \ominus/r^3$		
Dipolo		$\pm \ominus/r^3$	$\pm \ominus/r^4$		
Cuadrupolo			$\pm \ominus D/r^5$		
London				$-\ominus/r^6$	
Repulsión electrónica					$+\ominus/r^{12}$

### A. Asociación iónica en disolución

El concepto de asociación iónica provee un método relativamente simple y autoconsistente para estudiar la situación que surge cuando iones de signo opuesto se mantienen juntos. En este caso la energía de su atracción eléctrica mutua puede ser considerablemente más grande que su energía térmica, así que ellos forman virtualmente una nueva entidad en disolución, de suficiente estabilidad para mantenerse a pesar de las colisiones con las moléculas del disolvente [Robinson y Stokes, 1968].

Investigaciones detalladas, particularmente en pares iónicos inorgánicos han demostrado que su formación en agua esta dominada entrópicamente por la

solvatación, y de esta forma por la liberación de agua, y que las fuerzas de van der Waals pueden contribuir significativamente a la asociación. La ecuación de Bjerrum [Bockris y Reddy, 1970], derivada de potenciales de carga puntuales y que no considera las diferencias entre pares iónicos internos y separados por la solvatación, describe la constante de asociación  $K$  como función de las cargas  $z$ , la constante dieléctrica  $\varepsilon$  y de un factor  $Q(b)$ , el cual contiene la distancia mínima  $a$  (ver abajo) y la distancia media efectiva entre los centros iónicos A y B, de cargas opuestas.

$$K = \frac{4\pi N}{1000} \left[ \frac{|z_+ \cdot z_-|}{\varepsilon kT} \right]^3 Q(b) \quad (2.1)$$

A pesar del considerable acuerdo con el experimento, hay varios aspectos poco satisfactorios en el esquema de Bjerrum de la formación de pares iónicos. El primero y el más importante es que identifica como pares iónicos a iones que no están físicamente en contacto. Con esta y otras consideraciones Fuoss [Fuoss, 1958] presentó un esquema alternativo para la formación de pares iónicos de contacto y deriva una constante para la asociación iónica.

De acuerdo a la aproximación de Fuoss [Fuoss, 1958] la constante de asociación iónica está dada por:

$$K = \frac{4\pi N}{3000} a^3 e^b \quad (2.2)$$

Donde  $a$  es la distancia de aproximación más cercana y  $b$  está dada por

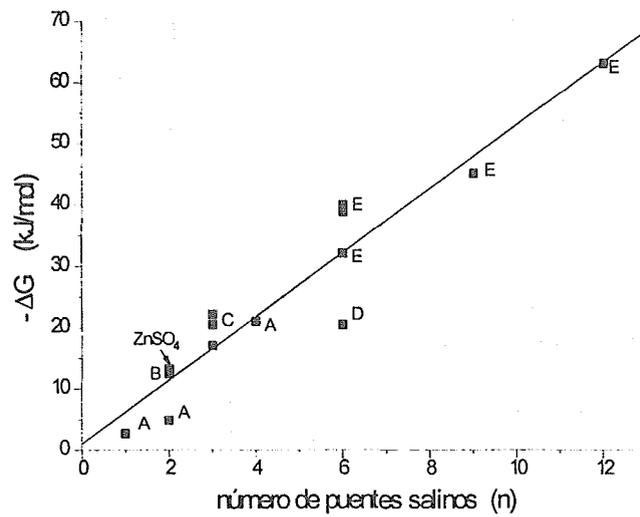
$$b = \frac{z_+ z_- e_0^2}{\varepsilon a k T}$$

Si se prueba la ecuación de Bjerrum en disoluciones con constantes dieléctricas mayores de 2, la función  $Q(b)$  de su ecuación (ecuación 2.1) se reduce a una dependencia de  $K$  en  $e^b/b$  en contraste a la de Fuoss cuya dependencia es sólo  $e^b$ . A pesar de esta diferencia, los resultados experimentales no permiten una distinción entre la dependencia de Fuoss de  $K$  en  $e^b$  (ecuación 2.2) y la dependencia de Bjerrum de  $K$  en  $e^b/b$  (ecuación 2.1). Sin embargo, la aproximación de Fuoss debe preferirse debido a sus bases conceptuales más simples y menos arbitrarias [Bockris y Reddy, 1970].

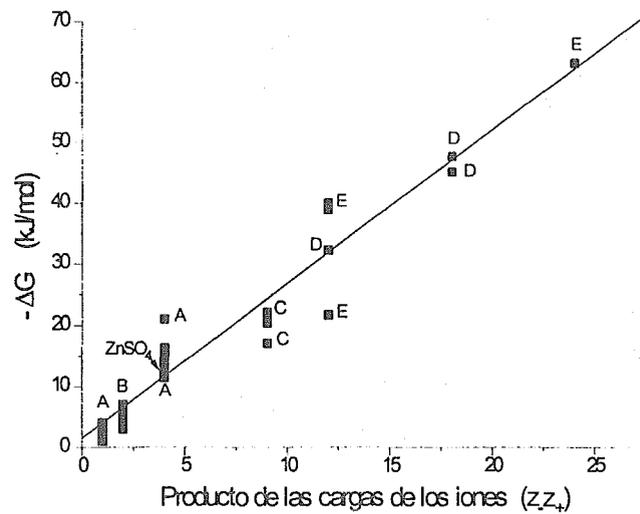
Las fuerzas electrostáticas juegan un papel decisivo en muchos complejos sintéticos anfitrión-huésped al igual que en sistemas biológicos.

A pesar de sus limitaciones, la ecuación de Bjerrum predice la estabilidad de pares iónicos esféricos más pequeños y menos polarizables bastante bien con distancias realistas de  $5 < a < 7 \text{ \AA}$ , se encuentran desviaciones más grandes en el caso de distancias diferentes, por ejemplo entre dicarboxilatos y cationes inorgánicos. Si se analizan los valores de  $\Delta G$  de muchos pares iónicos en agua en función del número posible de puentes salinos  $n$  entre iones en contacto, se observa una correlación lineal que da un incremento promedio de  $\Delta G = (5 \pm 1) \text{ kJ/mol}$  por puente salino (Figura 2.2a). El incremento observado corresponde a la predicción de Bjerrum,  $K \approx 100$  para  $z_A = z_B = 2$  con  $a \approx 6 \text{ \AA}$ , pero es inesperadamente uniforme a pesar de las grandes diferencias en tamaño y particularmente en polarizabilidad de los iones participantes ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$ ,  $\text{OPOO}_2^{2-}$ , fenolato- $\text{O}^-$ ,  $\text{R}_2\text{NH}_2^{2+}$ ,  $\text{R}_4\text{N}^+$ , piridinium  $\text{N}^+$ ,  $\text{R}_4\text{P}^+$ ). Los valores reportados por Tam y Williams [1985] para diversos pares iónicos orgánicos también quedan dentro de la correlación, con desviaciones más pequeñas que el error experimental [Schneider *et al.*, 1992a].

Es importante señalar que en la correlación presentada por Schneider y colaboradores en sus artículos, no es clara la forma en la cual calcula el número de puentes salinos formados entre el anfitrión y el huésped; por ejemplo, sería más lógico poner  $\text{Zn}^{2+} \cdot \text{SO}_4^{2-}$  en  $n = 4$  en lugar de  $n = 2$  ya que es prácticamente imposible calcular  $n$  para sistemas como E (ver tabla anexa de la Figura 2.2) donde son desconocidas las estructuras de los asociados iónicos. Por lo antes mencionado se presenta otra correlación lineal (Figura 2.2b)  $-\Delta G$  vs el producto de las cargas de los iones ( $z_+z_-$ ) empleando los mismos datos que los presentados por Schneider y colaboradores. En este último caso evitamos toda la incertidumbre en la evaluación de  $n$  y la correlación de hecho es mejor (compare  $r$  en la Figura 2.2). Una buena correlación con  $z_+z_-$  significa que la distribución de cargas en estos sistemas es de menor importancia y el factor principal es simplemente la carga total de cada componente. Evidentemente, las interacciones coulómbicas por sí mismas no llevan a un reconocimiento estructural; sin



a)



b)

**Figura 2.2.** Energías libres de complejación  $-\Delta G$  en agua graficadas a) vs el número de pares iónicos [Schneider y Theis, 1989], b) vs el producto de las cargas del anfitrión y huésped. El ajuste lineal de los datos mostrados en las gráficas es: a)  $-\Delta G = 1.02 + 5.2 n$  ( $r = 0.948$ , 12 puntos) y para b)  $-\Delta G = 2.82 + 2.67 z_+ \cdot z_-$  ( $r = 0.966$ , 33 puntos). La siguiente tabla presenta los sistemas considerados en el ajuste lineal de las gráficas a) y b).

Clave	Sistema	Referencia
A	<p><math>n=1</math> Azoniaciclofano (4+) y derivados monosustituidos de naftaleno (1-)</p> <p><math>n=2</math> Azoniaciclofano (4+) y derivados disustituidos de naftaleno (2-)</p> <p><math>n=2</math> Azoniaciclofano (4+) y derivados de naftaleno monosustituidos con P (2-)</p> <p><math>n=4</math> Tetrafenolato (4-) y tetrametil amonio (1+)</p>	Schneider y Theis [1989]
B	$n=2$ 4,4' bipyridinio (2+) y tereftalato (2-)	Tam y Williams [1984]
C	<p><math>n=3</math> 1,3,5-trifenil(<i>para</i>-sulfonato) benceno (3-) y trifenil(<i>para</i>-amonio) metano (3+)</p> <p><math>n=3</math> 1,3,5-tri(carboxilato) benceno (3-) y trifenil(<i>para</i>-amonio) metano (3+)</p> <p><math>n=3</math> trifenilo(<i>para</i>-sulfonato)metano (3-) y trifenil(<i>para</i>-amonio) metano (3+)</p>	Schneider <i>et al.</i> [1992a]
D	$n=6$ Hexamina cíclica (6+) y dicarboxilatos alifáticos (2-)	Hosseini y Lehn [1982]
E	<p><math>n=6</math> Eter aza corona (6+) y adenosin trifosfato (2-), adenosin difosfato (2-) y adenosin monofosfato (2-)</p> <p><math>n=9</math> Eter aza corona (6+) y adenosin trifosfato (3-)</p> <p><math>n=12</math> Eter aza corona (6+) y adenosin trifosfato (4-)</p>	Hosseini <i>et al.</i> [1983]

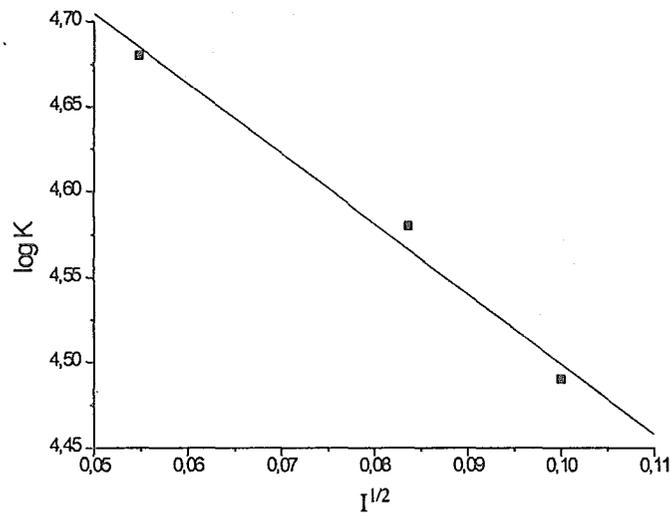
embargo, generan una alta afinidad: para los sistemas con  $n \geq 3$  (o  $z_+z_- \geq 9$ ) las constantes de asociación son mayores que  $10^3 \text{ M}^{-1}$  y alcanzan valores del orden de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  para  $n = 12$ .

Es interesante comparar los parámetros de correlación de la Figura 2.2b con las predicciones de la ecuación de Fuoss (ecuación 2.2), que en su forma logarítmica es:

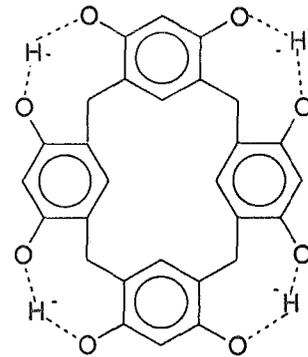
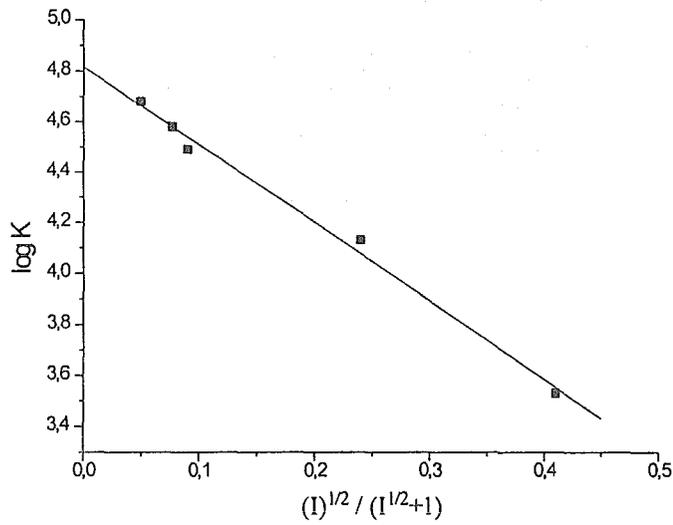
$$\log K = -2.6 + 3 \log a + \frac{243 \cdot z_+ z_-}{\epsilon \cdot a} \quad (2.2a)$$

Si el valor de la pendiente del ajuste lineal de la Figura 2.2b del cambio de energía libre como función del producto de las cargas se expresa como el  $\log K$  empleando la ecuación

$$\Delta G = -RT \ln K$$



a)



tetrafenolato

b)

**Figura. 2.3.** Efectos salinos: a) constantes de asociación ( $\log K$ ) vs la raíz cuadrática de la fuerza iónica ( $\sqrt{I}$ ) de Debye-Hückel y b) constantes de asociación ( $\log K$ ) vs  $\sqrt{I} / (\sqrt{I} + 1)$  para el tetrafenolato y  $\text{Et}_4\text{N}^+$  [Schneider *et al.*, 1988].

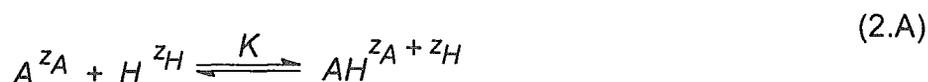
se obtiene  $\log K = 0.466$ . Aproximando la ecuación (2.2a) como:

$$\log K = \frac{243 \cdot z_+ \cdot z_-}{\epsilon \cdot a} \quad (2.2b)$$

Sustituyendo en la ecuación 2.2b el valor de  $\log K = 0.446$  y tomando la constante dieléctrica del agua como  $\epsilon = 80 \text{ J}^{-1} \text{C}^2 \text{m}^{-1}$  y despejando  $a$ , la distancia mínima entre los centros iónicos, se obtiene  $a = 6.5 \text{ \AA}$ , la cual esta en acuerdo con las distancias típicas reportadas en la literatura [Schneider, *et al.* 1992a].

El decremento en la polaridad del disolvente causa un considerable incremento en las constantes de asociación iónica debido a la reducción de la constante dieléctrica del disolvente [Meyer, 1976; Marcus, 1988]. Los efectos salinos en complejos iónicos supramoleculares muestran tendencias inversas en las cuales  $\Delta G$  se incrementa con la disminución de la fuerza iónica, Figura 2.3 [Schneider *et al.*, 1988; Schneider y Theis, 1992].

Se ha encontrado que para asociaciones  $AH$ , anfitrión  $A$  y huésped  $H$  con cargas  $z_A$  y  $z_H$ , respectivamente,



la constante de asociación  $K$  decrece y que es independiente de la naturaleza de los iones de las sales añadidas con carga  $z = 1$ , lo cual les sugirió [Schneider *et al.*, 1988] un tratamiento de los efectos salinos de acuerdo a la descripción de Debye-Hückel de los cambios de los coeficientes de actividad  $f_i$  como función de la fuerza iónica  $I$ :

$$\log f_i = -A \cdot |z_1 \cdot z_2| \cdot \sqrt{I}$$

Donde  $A$  ( $\text{mol}^{-1/2} \text{L}^{1/2} \text{K}^{3/2}$ ) es una constante que involucra la temperatura absoluta y la constante dieléctrica del disolvente de acuerdo a:

$$A = \sqrt{\frac{2\pi \cdot N}{1000}} \cdot \frac{e^3}{2.303 \cdot k^{3/2}} \cdot \frac{1}{(\varepsilon \cdot T)^{3/2}} = \frac{1.8246 \times 10^5}{(\varepsilon \cdot T)^{3/2}}$$

$e$  = carga del electrón,  $N$  = número de Avogadro,  $k$  = constante de Boltzman y  $\varepsilon$  = constante dieléctrica. Los valores de  $A$  para el agua a varias temperaturas se reportan ya tabulados [Robinson y Stokes, 1968].

Sustituyendo en la ecuación de Debye-Hückel el valor de la constante  $A$  se obtiene:

$$\log f_i = -0.5091 \cdot z^2 \cdot \sqrt{I} \quad (2.3)$$

y considerando que:

$$\log K = \log K^0 - \log \left( \frac{f_{AH}}{f_A \cdot f_H} \right) \quad (2.4)$$

Sustituyendo la expresión (2.3) en la ecuación (2.4) se tiene:

$$\log K = \log K^0 - 0.5091 \cdot |z_{AH}^2 - z_A^2 - z_H^2| \cdot \sqrt{I} \quad (2.5)$$

Para el sistema tetrafenolato- $\text{Et}_4\text{N}^+$



Aplicando la ecuación (2.5) al sistema del tetrafenolato se obtiene:

$$\log K = \log K^0 - 4.072 \cdot \sqrt{I} \quad (2.6)$$

Es sorprendente que para una gráfica de  $\log K$  vs  $\sqrt{I}$  se obtenga una correlación lineal con pendiente de -4.12 (Figura 2.3a), muy cercana al valor teórico, si se considera que el límite para el cual se mantiene la ecuación (2.4) es  $I < 10^{-2}$  M

[Schneider *et al.*, 1988]. Aún para concentraciones más altas de sal se observa una dependencia lineal de acuerdo a la ecuación modificada:

$$\log f_i = -0.5091 \cdot z^2 \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (2.7)$$

Sustituyendo la ecuación (2.7) en la ecuación (2.4) se obtiene:

$$\log K = \log K^0 - 0.5091 \cdot |z_{AH}^2 - z_A^2 - z_H^2| \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (2.8)$$

Aplicando la ecuación (2.8) al sistema tetrafenolato se obtiene:

$$\log K = \log K^0 - 4.072 \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (2.9)$$

La gráfica correspondiente (Figura 2.3b), muestra linealidad hasta una concentración de sal 0.5 M y una pendiente de -3.08, valor no muy alejado de la pendiente esperada [Schneider *et al.*, 1988].

### 2.1.2 Interacciones de van der Waals

Tres tipos distintos de fuerza contribuyen a la interacción total de largo alcance entre moléculas polares, colectivamente conocidas como fuerzas de van der Waals: estas son la fuerza de inducción (Debye), la fuerza de orientación (Keesom) y las fuerzas de dispersión (London) cada una de las cuales da una energía de interacción que varía con el inverso de la sexta potencia de la distancia. Así para dos moléculas polares diferentes, se tiene [Israelachvili, 1985]:

$$w_{VDW}(r) = -\frac{C_{VDW}}{r^6} = -\left[ \frac{C_{ind} + C_{orient} + C_{disp}}{r^6} \right]$$

$$w_{VDW}(r) = \frac{\left[ (\mu_1^2 \alpha_{02} + \mu_2^2 \alpha_{01}) + \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3kT} + \frac{3 \cdot \alpha_{01} \cdot \alpha_{02} \cdot I_1 \cdot I_2}{2(I_1 + I_2)} \right]}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6}$$

donde  $C$  es un coeficiente de fuerza,  $\mu$  es el momento dipolar permanente,  $\alpha$  polarizabilidades e  $I$  es el potencial de ionización.

Las fuerzas de dispersión generalmente exceden la fuerza de inducción dependiente del dipolo y las fuerzas de orientación, excepto para moléculas pequeñas altamente polares, tales como el agua. En la interacción de dos moléculas diferentes de las cuales una es no polar, la energía de van der Waals esta dominada casi completamente por la contribución de dispersión ya que estas fuerzas están siempre presentes (en contraste a los otros tipos de fuerzas que pueden o no estar presentes dependiendo de las propiedades de las moléculas).

Los principales aspectos de las fuerzas de dispersión pueden ser resumidos como [Israelachvili, 1985]: a) son fuerzas de largo alcance y, dependiendo de la situación, pueden ser efectivas desde distancias largas (mayores de 10 nm) hasta distancias interatómicas (aproximadamente 0.2 nm) b) pueden ser repulsivas o atractivas, y en general entre dos moléculas o partículas grandes no siguen una ley de potencias simple, c) las fuerzas de dispersión no sólo llevan a las moléculas a unirse sino que también tienden a alinearse mutuamente o a orientarse, aunque su efecto de orientación es generalmente débil, y d) esta interacción se afecta por la presencia de otros cuerpos cercanos.

La energía de dispersión no puede ser descrita completamente en términos clásicos, debido a que su origen es mecánico-cuántico, mientras que la interacción resultante es esencialmente electrostática, pero se puede conocer un poco de su naturaleza del siguiente análisis.

Las fuerzas de dispersión surgen de la interacción de dipolos instantáneos en las moléculas. Los electrones en un átomo o molécula están en movimiento continuo, aún

en su estado fundamental. Así, aunque en promedio el momento dipolar de un átomo simétricamente esférico es cero, en cualquier instante puede presentarse un momento dipolar temporal. Este dipolo puede inducir un momento dipolar en el átomo vecino y, como en las fuerzas de inducción clásicas, el efecto neto será de atracción. Tal fuerza que surge de la correlación entre las fluctuaciones de carga, puede esperarse que sea muy pequeña. Sin embargo, los cálculos de London mostraron que su magnitud era suficientemente grande para ser el origen de la atracción entre átomos y moléculas simétricamente esféricos, y ser la mayor contribución atractiva para muchas moléculas polares [Rigby *et al.*, 1986].

Las expresiones de London para la energía de interacción de dispersión [Israelachvili, 1985] entre dos átomos o moléculas idénticas es [London, 1937]:

$$w(r) = -\frac{3}{4} \alpha_0^2 I / (4\pi\epsilon_0)^2 r^6$$

y para dos átomos diferentes,

$$w(r) = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \frac{I_1 I_2}{(I_1 + I_2)}$$

donde  $I$  es el potencial de ionización.

La ecuación de London ha sido remplazada por expresiones más complicadas aunque también más exactas. La expresión más simple de la ecuación de London proporciona valores más bajos que los determinados más rigurosamente.

El término de interacción de van der Waals se refiere tradicionalmente a la combinación de interacciones atractivas que involucran multipolos electrónicos inducidos e interacciones repulsivas de corto alcance debidas al traslape desfavorable de los orbitales electrónicos [Burley y Petsko, 1988]. Las interacciones multipolo-multipolo pueden existir entre moléculas neutras que no poseen multipolos electrónicos permanentes, porque rápidamente ocurren fluctuaciones espaciales azarosas de electrones en una molécula que dan lugar a una serie de momentos multipolo instantáneos en esa molécula, la cual a su vez induce una serie de momentos multipolo en una molécula vecina. Tales interacciones entre multipolos que fluctúan y multipolos inducidos son siempre atractivas, debido a que los momentos multipolo están alineados

antiparalelamente uno a otro y son llamadas interacciones de dispersión o de London. Así, en adición al primer término de las fuerzas de dispersión hay contribuciones adicionales:

$$V \propto -\left(B/r^6\right) - \left(B_1/r^8\right) - \left(B_2/r^{10}\right) - \dots$$

donde cada uno de los exponentes se refiere a interacciones inducidas dipolo-dipolo ( $1/r^6$ ), interacciones inducidas dipolo-cuadrupolo ( $1/r^8$ ) e interacciones inducidas dipolo-octupolo y cuadrupolo-cuadrupolo ( $1/r^{10}$ ), etc. [London, 1937]. El término inverso a la sexta potencia ( $1/r^6$ ) domina en muchos cálculos, y los términos de orden más alto son ignorados para simplicidad de cálculo. Sin embargo, se ha encontrado que los términos de más alto orden pueden contribuir tanto como un 20 % a la energía de dispersión total [Rigby *et al.*, 1986]. Estas fuerzas de dispersión atractivas están balanceadas por la repulsión de las capas electrónicas conforme los átomos que interactúan se aproximan uno a otro, y esta repulsión de corto alcance es generalmente modelada con una dependencia de la distancia de  $1/r^{12}$ , debido a conveniencia de cálculo.

La función de potencial 6-12 de Lennard-Jones [Jones, 1924],

$$V \propto A/r^{12} - B/r^6$$

la cual combina el inverso de la distancia en potencia doce como el término repulsivo con el inverso de la distancia en potencia seis como el término atractivo, constituye un método simple de cálculo para estimar el efecto de la combinación de las dos interacciones; los parámetros  $A$  y  $B$  han sido evaluados de varios datos experimentales.

Puede esperarse una forma del potencial mejorada cuando el término repulsivo  $r^{-12}$  se sustituye por un término exponencial teórico, constituyendo tal potencial el modelo exponencial-6, el cual también ha sido extensivamente empleado:

$$\begin{aligned} V &= \left( A \exp(-Br) - C/r^6 \right) \\ &= \frac{\epsilon}{(1-6/\alpha)} \left[ \exp\alpha(1-r/r_m) - (r/r_m)^6 \right] \end{aligned}$$

Este potencial tiene tres parámetros: la profundidad del pozo de potencial  $\epsilon$ , la separación  $r$ , la separación en el punto mínimo de  $\epsilon$ ,  $r_m$  y un parámetro adicional  $\alpha$ , el cual determina la agudeza de la interacción repulsiva. La inclusión de este tercer parámetro permite un poco más de flexibilidad en la forma de este potencial. Sin embargo recientemente las investigaciones se han concentrado especialmente en funciones con muchos más parámetros [Rigby *et al.*, 1986].

### A. Teoría general de las fuerzas de van der Waals entre moléculas

La teoría de London de las fuerzas de dispersión tiene dos serios inconvenientes [Israelachvili, 1985]. Supone que los átomos y moléculas tienen sólo un potencial de ionización (una frecuencia de absorción), y no puede manejar las interacciones de las moléculas en el disolvente. En 1963 McLachlan presentó una teoría generalizada de las fuerzas de van der Waals que incluye en una ecuación la inducción, la orientación y la fuerza de dispersión, su ecuación puede también ser fácilmente aplicada para considerar las interacciones con el disolvente. La expresión de McLachlan para la energía de interacción de van der Waals de dos moléculas o partículas pequeñas 1 y 2 en un medio 3 esta dada por la serie [ McLachlan, 1963a,b]

$$w(r) = -\frac{6kT}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \sum_{n=0,1,2,\dots}^{\infty} \frac{\alpha_1(iv_n)\alpha_2(iv_n)}{\epsilon_3^2(iv_n)}$$

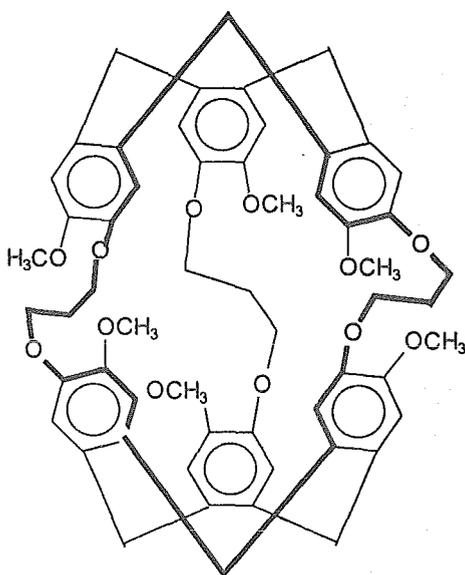
donde  $\alpha_1(iv_n)$  y  $\alpha_2(iv_n)$  son las polarizabilidades de las moléculas 1 y 2 y  $\epsilon_3(iv_n)$  son la permitividad dieléctrica del medio 3 a frecuencias *imaginarias*  $iv_n$  donde

$$\nu_n = (2\pi kT / h) \approx 4 \times 10^{13} n \quad s^{-1}$$

a 300 K. En la sumatoria para la frecuencia cero el termino  $n = 0$  es multiplicado por 1/2.

## B. Fuerzas de van der Waals en sistemas anfitrión-huésped

Si la formación de una entidad supramolecular fuera debida esencialmente a interacciones entre superficies lipofílicas de moléculas anfitrión-huésped, se podría esperar que se aplicara el esquema general llave-cerradura, el cual demanda un ajuste óptimo que va más allá de simplemente unos cuantos puntos o ciertas funciones [Schneider y Dürr, 1991]. Los criptofanos estudiados por Collet y colaboradores [Canceilli *et al.*, 1989] (ver por ejemplo la Figura 2.4) proveen la prueba más clara de esta hipótesis, debido a que la formación de muchos sustratos lipofílicos pequeños puede ser investigada en disolventes lipofílicos sin interferencia de efectos grandes de solvatación / desolvatación, los cuales frecuentemente dominan en las asociaciones supramoleculares en agua. La diferente dependencia de la energía de complejación con el tamaño de la molécula huésped es muy reminiscente de las dependencias similares cavidad-tamaño observadas entre iones metálicos y criptandos. Los estudios de Collet y colaboradores dan una evidencia numérica para el modelo llave-cerradura con sustratos orgánicos.



**Figura 2.4.** Anfitrión de Collet y colaboradores [Canceilli *et al.*, 1989] empleado para el estudio de las interacciones de van der Waals.

La suave relación observada (Figura 2.5) dependiente del tamaño implica otra limitante al mecanismo llave-cerradura: tanto los sustratos más pequeños del tamaño óptimo como los más grandes son enlazados. Collet y colaboradores señalan que los largos desplazamientos en RMN inducidos por complejación indican la encapsulación completa de los sustratos aún los más grandes. Esto podría explicarse si dichos sustratos se acomodan en la cavidad a expensas de la tensión originada por el ensanchamiento del anfitrión, lo cual a su vez resulta en un enlace más débil.

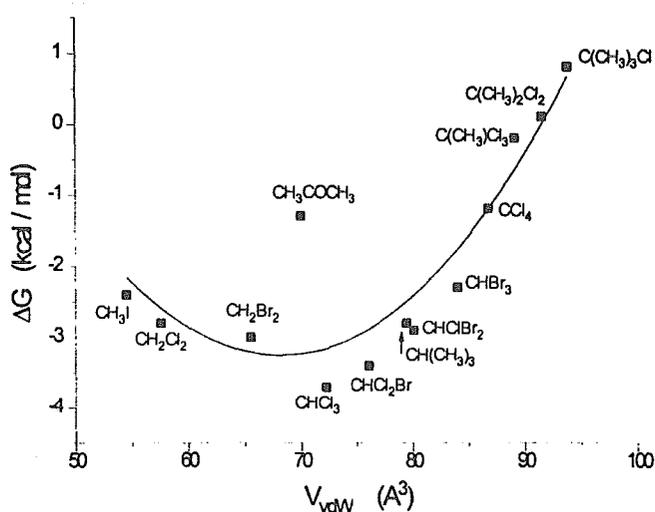


Figura 2.5. Energías libres de complejación  $\Delta G$  (kcal/mol) como función del volumen de van der Waals de las moléculas huésped con el criptofano de Collet y colaboradores [Canceilli *et al.*, 1989].

### 2.1.3 Interacciones $\pi$ - $\pi$

Las fuertes interacciones atractivas entre los sistemas  $\pi$  han sido conocidas por más de medio siglo. Este tipo de interacciones controlan diversos fenómenos tales como las interacciones base-base que estabilizan la estructura de doble hélice del ADN, la intercalación de drogas dentro del ADN, el empacamiento de moléculas aromáticas en cristales, la estructura terciaria de las proteínas, las preferencias

conformacionales y las propiedades de enlace de macrociclos poliaromáticos, la complejación en muchos sistemas anfitrión-huésped y la agregación de porfirinas [Hunter y Sanders, 1990; y referencias citadas allí].

Los primeros modelos empleados para explicar las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , conocidas también como interacciones de apilamiento fueron: el modelo solvofóbico, el modelo electrón donador-aceptor y el modelo de cargas atómicas [Hunter y Sanders, 1990; y referencias citadas allí].

En el modelo solvofóbico, el apilamiento  $\pi$  se atribuyó a efectos solvofóbicos, los cuales son esencialmente de origen entrópico. Sin embargo, dicha observación fue hecha en disolventes orgánicos, donde los efectos solvofóbicos no son importantes [Hunter y Sanders, 1990; y referencias citadas allí]. Aún en agua, los efectos entálpicos pueden ser una importante fuerza directriz que favorece las interacciones  $\pi$ - $\pi$  [Smithrud y Diederich, 1990; Smithrud *et al.*, 1991]. Además los efectos solvofóbicos favorecen la geometría del máximo traslape  $\pi$ , una situación que raramente se observa.

En el modelo electrón donador-aceptor (EDA) se sugiere que la fuerte atracción se debe a una interacción electrónica entre un donador electrónico y un aceptor electrónico. Los complejos  $\pi$ - $\pi^*$  o de transferencia de carga son bien conocidos; sin embargo, la interacción de transferencia de carga es sólo importante en el estado excitado y contribuye relativamente poco a la estabilidad energética completa del complejo. El modelo EDA involucra un concepto poco claro, debido a que dentro de cualquier molécula pueden existir ambas regiones ricas o donadoras de electrones y pobres oceptoras de electrones y la interacción intermolecular depende críticamente de como tales regiones están alineadas. Además, son las propiedades de los átomos en los puntos de contacto intermolecular más que las propiedades completas de óxido-reducción de las moléculas las que determinan como interactúan los sistemas  $\pi$ . Aún cuando existen las interacciones EDA, indudablemente ellas no son predecibles debido a que son un caso especial de la interacción  $\pi$ - $\pi$  más general. Las transiciones de transferencia de carga observadas para tales complejos son una consecuencia y no una causa de la interacción  $\pi$ - $\pi$ .

En el modelo de carga atómica se sugiere que la atracción surge de distribuciones de carga impares a través de los sistemas  $\pi$ . Así para una orientación particular de dos sistemas  $\pi$ , los átomos cargados positivamente en una molécula pueden ser alineados con los átomos cargados negativamente en la otra, de tal manera que surge una interacción electrostática atractiva entre ellas.

Hunter y Sanders [1990] propusieron un nuevo modelo de distribución de carga para explicar los importantes requerimientos geométricos para las interacciones entre moléculas aromáticas. El aspecto clave de su modelo es que consideran por separado una estructura  $\sigma$  y los electrones  $\pi$  y demuestran que las interacciones netas favorables  $\pi$ - $\pi$  son resultado de atracciones  $\pi$ - $\sigma$  que compensan las repulsiones  $\pi$ - $\pi$ . Estos autores establecieron una serie de requerimientos geométricos y electrónicos. Sus reglas predicen la geometría de interacciones intermoleculares en estructuras cristalinas de moléculas aromáticas y explican algunas interacciones anfitrión-huésped.

Hunter y Sanders [1990] concluyen que es la atracción  $\pi$ - $\sigma$  más que la interacción electrónica  $\pi$ - $\pi$  la que da lugar a interacciones  $\pi$ - $\pi$  electrónicas favorables. Además que son los efectos electrostáticos los que determinan la geometría de interacción mientras que las interacciones de van der Waals (y efectos solvofóbicos) hacen la contribución más importante a la magnitud de la interacción observada en medios acuosos.

Las interacciones aromáticas-aromáticas en proteínas fueron examinadas por primera vez por Burley y Petsko [1985]. Los análisis geométricos de una base de datos cristalográficos con las estructuras de 33 proteínas indican que los grupos aromáticos en pares de proteínas se encuentran con separaciones entre sus centros de 3.4 y 6.5 Å. Además estos análisis mostraron que hay arreglos geométricos preferidos de los dos anillos aromáticos que no reflejan un empaquetamiento azaroso cerrado de moléculas planas en el interior de una proteína. El análisis del patrón de geometrías de interacción y su comparación con la superficie de energía potencial del dibenceno demostraron que los residuos aromáticos simples prefieren asociarse vía entálpicamente favorable, borde-a-cara por interacciones débilmente polares, en las cuales un átomo de hidrógeno  $\delta^+$  de un anillo aromático hace un contacto cercano con la  $\delta^-$  de la nube

electrónica  $\pi$  de otro anillo. Esta interacción equivale aproximadamente a  $-1.5$  kcal/mol de la energía de estabilización, en contraste a un apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , el cual contribuye muy poco cuando los dos anillos son monocíclicos [Burley y Petsko, 1988].

El análisis de dos bases de datos cristalográficas muestra que la distribución característica de cargas parciales positivas y negativas en grupos aromáticos influye el patrón de interacciones entre los grupos aromáticos de las proteínas. Cálculos de superficies de energía potencial, basados en métodos *ab initio* mecánico cuánticos de Karlström *et al.* [1983], proveen una estimación de aproximadamente  $-1$  a  $-2.5$  kcal/mol para la contribución entálpica de cada interacción aromática-aromática. La interacción aromática-aromática puede ser primordialmente atribuida a una interacción entálpicamente favorable entre dos momentos cuadrupolares moleculares, cálculos de expansión multipolar para dibencenos reproducen la forma de la superficie de energía potencial de dibencenos. Así, las interacciones aromáticas tienen una dependencia de la distancia que varía de acuerdo a  $1/r^5$  y es espacialmente anisotrópica. Además la distribución espacial de tales pares aromáticos entálpicamente favorables en proteínas sugiere que ellos están involucrados en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas [Burley y Petsko, 1988].

#### A. Interacciones $\pi$ - $\pi$ en sistemas anfitrión-huésped

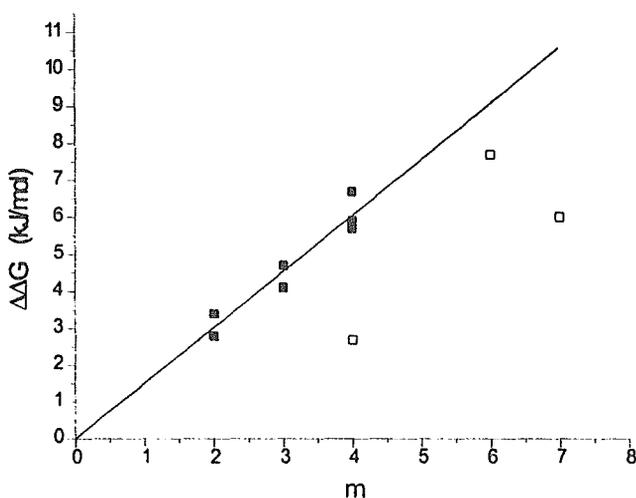
Se ha observado [Schneider, 1991] que los valores de  $K$  para la asociación de moléculas aromáticas con sustituyentes cargados se incrementan con el número de anillos de fenilo  $m$  que son parte de un anion, catión o de ambos. En la descripción más simple se considera que la energía libre total de la complejación  $\Delta G$  es la suma de dos términos independientes, el primero que describe una atracción del tipo coulombica como función del número de puentes salinos  $n$  y el segundo que describe interacciones de van der Waals (hidrofóbicas) como función del número de anillos fenílicos en contacto,  $m$  y también un incremento constante  $\Delta G_p$ , el cual contiene la contribución

estabilizante de una sola unidad de arilo en contacto con otro. Si se considera un incremento coulombico de 4.8 kJ/mol por puente salino se tiene:

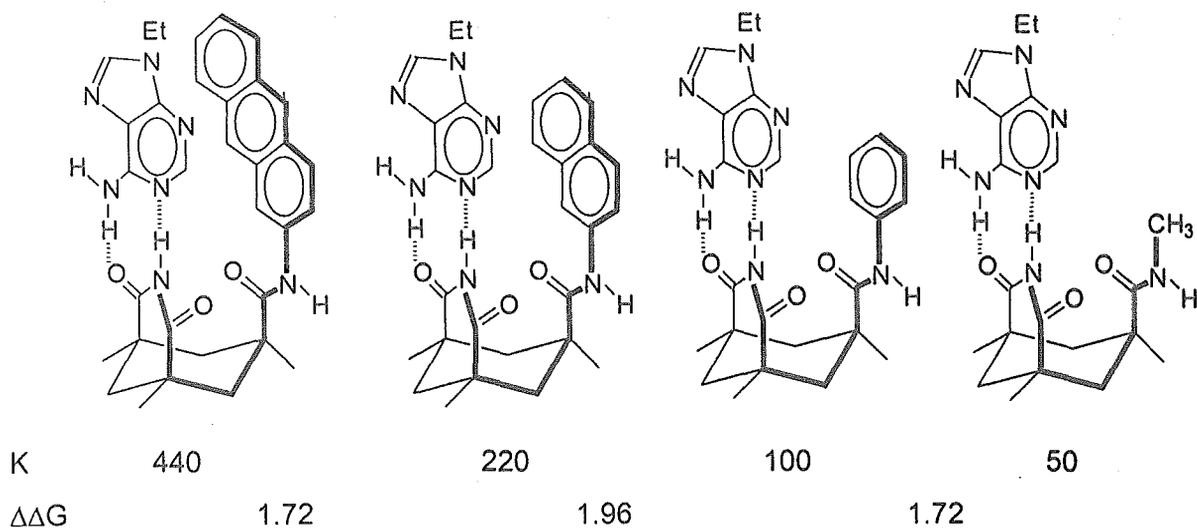
$$\Delta G_t = n4.8 + m\Delta G_v \quad (2.10)$$

Una gráfica de  $\Delta G_t$  vs  $m$  empleando  $n4.8$  como corrección de la atracción coulombica da una correlación lineal donde la pendiente da el incremento de van der Waals  $\Delta G_v \approx 1.5$  kJ/mol, valor que está en el intervalo de interacciones de van der Waals observadas independientemente en otros modelos (Figura 2.6).

Rebek [1990c] también encontró en sus sistemas que el incremento por cada unidad de benceno a la energía libre total del complejo es de 1.8 kJ / mol (Figura 2.7). Sin embargo, es importante señalar que en los sistemas de Rebek la interacción entre anillos aromáticos podría ser más efectiva que en los sistemas de Schneider *et al.* [1992a] debido a que se trata de una interacción intramolecular.



**Figura 2.6.** Interacciones aromáticas en función del número  $m$  de anillos aromáticos,  $\Delta G = 1.5$  kJ/mol por anillo aromático, los puntos fuera de la recta (puntos abiertos) se desvían por razones estructurales. Ver estructuras de los sistemas anfitrión-huésped en Schneider *et al.* [1992a].



**Figura 2.7.** Constantes de complejación  $K$  ( $M^{-1}$ ) y valores  $\Delta\Delta G$  (kJ/mol) en  $CDCl_3$  para las constantes de asociación de los derivados de los ácidos tricarbónicos de Rebek [1990c] y 9-etiladenina.

#### 2.1.4 Interacciones $N^+-\pi$

Aunque el efecto hidrofóbico, el enlace de hidrógeno y las interacciones de pares iónicos (puente salino) han sido estudiadas y discutidas extensivamente hay otra importante pero generalmente poco apreciada fuerza de enlace no covalente. Muchos aspectos distinguen la interacción catión- $\pi$  de otras fuerzas de enlace y hacen de ella especialmente conveniente para nuevos tipos de enlace biológico [Dougherty, 1996].

Diversas líneas de evidencia establecen que los sistemas aromáticos interactúan fuertemente con cationes. Aunque están involucrados muchos efectos, a primera vista la interacción catión- $\pi$  puede ser considerada un efecto electrostático que involucra el momento cuadrupolar del anillo aromático. Lo que es tal vez más sorprendente aún es que ha sido firmemente establecido, por estudios de sistemas modelo, que la interacción catión- $\pi$  puede competir energéticamente con la solvatación acuosa en el enlace de cationes. Esto sugiere que las proteínas podrían emplear también las interacciones catión- $\pi$  para enlazar sustratos catiónicos. También se ha establecido la

importancia de las interacciones catión- $\pi$  en el reconocimiento biológico a través de interacciones con cadenas laterales aromáticas de los aminoácidos Phe, Tyr y Trp [Dougherty, 1996].

Las interacciones amino-aromáticas en proteínas fueron descritas por primera vez por Burley y Petsko [1986]. Este tipo de interacciones se presenta entre los grupos amino de cadenas laterales de lisina, arginina, glutamina, asparagina e histidina, y las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptofano, y entre las partes aromáticas de ligandos y residuos aromáticos, o entre grupos amino de ligandos y residuos aromáticos, o entre grupos amino de una proteína y partes aromáticas de ligandos. Los análisis geométricos de una base de datos con estructuras de 33 proteínas, mostraron que las cadenas laterales con grupos amino y grupos aromáticos en proteínas prefieren distancias de separación de 3.0 a 6 Å entre el átomo de nitrógeno y el centro del anillo aromático vecino. Además estos análisis muestran que las cadenas laterales con grupos amino son encontradas preferentemente axialmente cercanas a la  $\delta^-$  de las nubes de electrones  $\pi$  de anillos aromáticos y que ellas evitan las posiciones ecuatoriales cercanas a la  $\delta^+$  de los átomos de hidrógeno de estos anillos. Estas preferencias espaciales son diferentes de las esperadas de un estrecho empacamiento azaroso de grupos dentro del corazón hidrofóbico de una proteína y son estadísticamente significantes. La energética de la interacción ha sido caracterizada por cálculos *ab initio* mecánico-cuánticos del ion amonio cargado positivamente con la  $\delta^-$  de la nube de electrones  $\pi$  del benceno, la interacción es entálpicamente favorable con una distancia óptima de aproximadamente 3 Å entre el átomo de nitrógeno y el anillo de fenilo centroide. La dependencia de la distancia esperada es de  $1/r^4$  para -NH y -NH<sub>2</sub>, y  $1/r^3$  para -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>; y es espacialmente anisotrópica en ambos casos [Burley y Petsko, 1988].

La distribución de carga en el benceno esta caracterizada por cargas positivas parciales en los átomos de hidrógeno y cargas negativas parciales en los átomos de carbono [Buckingham, 1978; Claverie, 1978]. Esta distribución ha sido cuantificada por diversos cálculos *ab initio*. Las interacciones coulómbicas son atractivas para partículas cargadas positivamente y perpendiculares al plano del anillo y para partículas cargadas

negativamente localizadas en el plano del anillo [Kim *et al.*, 1994 y referencias citadas allí].

El benceno es generalmente considerado como una molécula no polar debido a que no tiene un momento dipolar permanente. Sin embargo, tiene un momento cuadrupolar, que es muy grande en magnitud y de allí que el benceno tiene una distribución de carga no esférica permanente, esto es lo esperado para interactuar con cargas apropiadamente posicionadas a través de fuerzas electrostáticas [Dougherty, 1996].

La interacción catión- $\pi$  no puede reducirse a hablar solo de interacciones ion-cuadrupolo. Esto no es aconsejable ya que la electrostática es sólo una parte de la interacción, aunque quizá la parte más grande. Sin embargo, la teoría moderna indica claramente que las interacciones catión- $\pi$  no pueden ser cuantitativamente modeladas a menos que términos adicionales, tales como dipolos inducidos, polarizabilidades, fuerzas de dispersión y transferencia de carga sean incluidas. Además, el término ion-cuadrupolo tiene implicaciones muy específicas en consideración a la dependencia de la distancia de interacción. Se espera que la energía de estabilización de la interacción ion-cuadrupolo decaiga de acuerdo a  $1/r^3$ , donde  $r$  es la distancia entre el ion y el cuadrupolo (ver Tabla 2.1). Sin embargo, la interacción catión- $\pi$  no muestra definitivamente tal dependencia de la distancia, sino que más bien exhibe una dependencia  $1/r^n$ , con  $n < 2$ , se parece más cercanamente a una interacción Coulómbica ( $1/r$ ), se ha sugerido incluso que un 60 % de la interacción catión- $\pi$  es electrostática. Como tal, el término más descriptivo de la interacción catión- $\pi$  es la mejor forma para identificar la interacción estabilizante entre carga positiva y la cara  $\pi$  de un sistema aromático, con el entendimiento que las interacciones electrostáticas con la distribución de carga cuadrupolar del sistema aromático son de primordial interés. El interés en las interacciones electrostáticas se ha incrementado en los últimos años, especialmente con relación a las macromoléculas biológicas. En tales estructuras, el momento cuadrupolar de los sistemas aromáticos podría contribuir al esquema

electrostático, y este debería ser considerado en estudios de alta resolución [Dougherty, 1996 y referencias citadas allí].

En 1994, Kim *et al.* llevaron a cabo cálculos *ab initio* con los cationes tetrametilamonio y amonio, ambos con benceno y agua. Los autores indican que la interacción repulsiva entre las nubes de electrones  $\pi$  deslocalizados sobre el anillo de benceno y las nubes electrónicas de  $\text{Me}_4\text{N}^+$  tienden a ser disminuidas a través de la transferencia de electrones  $\pi$  en el anillo de benceno a los orbitales  $\sigma^*_{\text{C-H}}$  en el  $\text{Me}_4\text{N}^+$ . Concluyen que la importante interacción entre benceno y  $\text{Me}_4\text{N}^+$  surge de interacciones carga-cuadrupolo y carga-polarizabilidad.

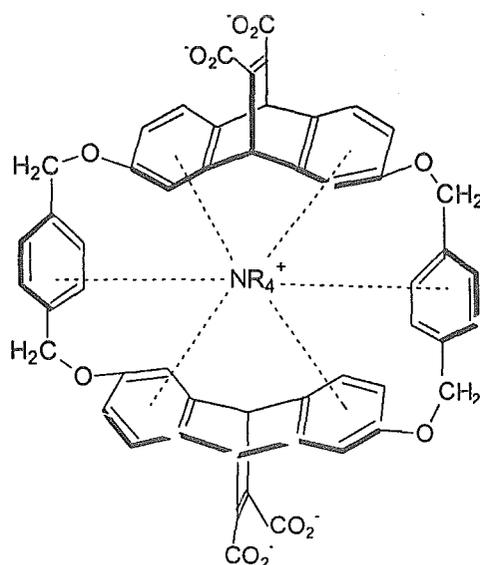
Si el benceno puede enlazar cargas positivas, entonces debería también enlazar cargas parciales positivas, esto es, moléculas con enlaces altamente polarizables. Realmente moléculas como  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$  se enlazan al benceno. Como podría esperarse estas interacciones son más débiles que la interacción catión- $\pi$  completa;  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$  muestran energías de enlace al benceno de 1.8 y 1.4 kcal/mol, respectivamente [Dougherty, 1996].

La interacción amino-aromática también puede ser descrita como "enlace de hidrógeno". La  $\delta^+$  del grupo amino interactúa con un anillo aromático actuando como un "donador de enlace de hidrógeno" y la nube de electrones  $\pi$  del anillo aromático puede actuar como "aceptor de enlace de hidrógeno" [Burley y Petsko, 1988].

### A. Interacciones $\text{N}^+-\pi$ en sistemas anfitrión-huésped

A comienzos de 1980, el grupo de trabajo de Dougherty [Stauffer *et al.* 1990; Dougherty y Stauffer, 1990; Stauffer y Dougherty 1988], inició los estudios de una serie de anfitriones de tipo ciclofánico solubles en agua, cuya estructura estaba formada por anillos aromáticos, los cuales fueron empleados para definir las paredes del anfitrión, con el objetivo de reproducir las propiedades de enlace de receptores biológicos. Sus estudios cuantitativos les mostraron que el principal factor en el enlace es la interacción favorable entre la carga positiva del huésped y la cara aromática rica en electrones de

las paredes del anfitrión, es decir a través de interacciones  $N^+-\pi$  (Figura 2.8). Petti *et al.* [1988] han reportado las constantes de asociación para el anfitrión mostrado en la Figura 2.8 y el tetrametilaminio ( $2649 M^{-1}$ ) y tributilmetilamonio ( $6127 M^{-1}$ ) en disolución amortiguadora de boratos a pH 9. Es importante señalar que la mayor parte de las moléculas anfitrión estudiadas por Dougherty y colaboradores soportan residuos aniónicos en sus estructuras. Se han observado otros sistemas que involucran receptores artificiales que enlazan cationes a través de interacciones catión- $\pi$ . Schneider y Blatter [1988] y Schneider [1991] determinaron en sistemas ciclofánicos que la contribución de la interacción  $N^+-\pi$  a la energía libre del complejo es de -2 kJ/mol.

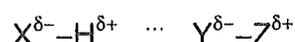


**Figura 2.8.** Ciclofano soluble en agua mostrando en forma general el enlace con un huésped tetraalquilamonio [Dougherty, 1996].

### 2.1.5 El enlace de hidrógeno

El enlace de hidrógeno es una combinación de una interacción electrostática de la forma dipolo-dipolo y una interacción de transferencia de carga. Aunque hay un desacuerdo en relación a las contribuciones relativas de estos dos tipos de interacciones, el enlace de hidrógeno puede ser descrito fenomenológicamente como una interacción electrostática dipolo-dipolo [Burley y Petsko, 1988].

Un enlace de hidrógeno se forma por la orientación y proximidad favorable de las cargas electrónicas parciales.



La nube del electrón que rodea al átomo de H se desplaza hacia el átomo más electronegativo (designado como X) al cual está covalentemente enlazado, con lo que se genera en el H y en X cargas electrónicas parciales diferentes. Se dice que se forma un enlace de H cuando este dipolo electrónico  $X^{\delta-}-H^{\delta+}$  se aproxima a otro dipolo electrónico, como se muestra esquemáticamente arriba. Las fuerzas Coulómbicas y de London son grandes y atractivas, y la repulsión de corto alcance debida al traslape desfavorable de las nubes electrónicas es minimizada por la liberación de los electrones compartidos lejos del núcleo de hidrógeno hacia el átomo más electronegativo X. Como resultado, el "donador" X y el "aceptor" Y se mantienen en estrecha proximidad, típicamente a menos de 3 Å de separación internuclear. Para la formación de los enlaces de hidrógeno  $X^{\delta-}-H^{\delta+} \cdots Y^{\delta-}$  la distancia X  $\cdots$  Y debe ser menor que la suma del enlace covalente X-H y el radio de van der Waals de H y que de Y. Cálculos mecánico cuánticos *ab initio* han mostrado que esta interacción puede ser modelada exactamente combinando la ley de Coulomb con el potencial 6-12 de Lennard-Jones, si son asignadas cargas electrónicas parciales apropiadas a cada una de las especies participantes. La interacción resultante contribuye -0.5 a -1.5 kcal/mol a la energía libre de estabilización de una proteína si los grupos donadores y aceptores están parcialmente cargados y -3 a -5 kcal/mol si un miembro del par tiene una carga formal. El incremento en la energía de interacción, en el caso de especies cargadas es consistente con una dependencia de la distancia en un intervalo más grande,  $1/r^2$ , para

interacciones carga-dipolo y una dependencia  $1/r^3$ , para interacciones dipolo-dipolo [Burley y Petsko, 1988].

El enlace de hidrógeno no es sólo una de las fuerzas intermoleculares más fuertes (energías de enlace de hasta 30 kJ/mol, dependiendo del medio) sino que además es direccional [Mascal, 1994]. El requerimiento geométrico para maximizar la interacción es que el ángulo X-H-Y debe ser cercano a  $180^\circ$  y que el H debe estar alineado con el átomo que posee el par de electrones libres [Taylor y Kennard, 1984].

### A. El enlace de hidrógeno en sistemas anfitrión-huésped

Los enlaces de hidrógeno dominan no sólo en proteínas sino en muchos casos de enlace selectivo en complejos orgánicos anfitrión-huésped [Schneider, 1994]. Los grupos de Rebek [1984, 1987, 1988, 1989a-b, 1990a-d], Hamilton [Hamilton *et al.* 1988; Hamilton 1990] y Still [Chapman y Still, 1989] han sido especialmente activos en el diseño de sistemas que contienen múltiples sitios complementarios donador-aceptor de hidrógeno, los cuales también resultaron muy convenientes para el reconocimiento quiral (Figura 2.9).

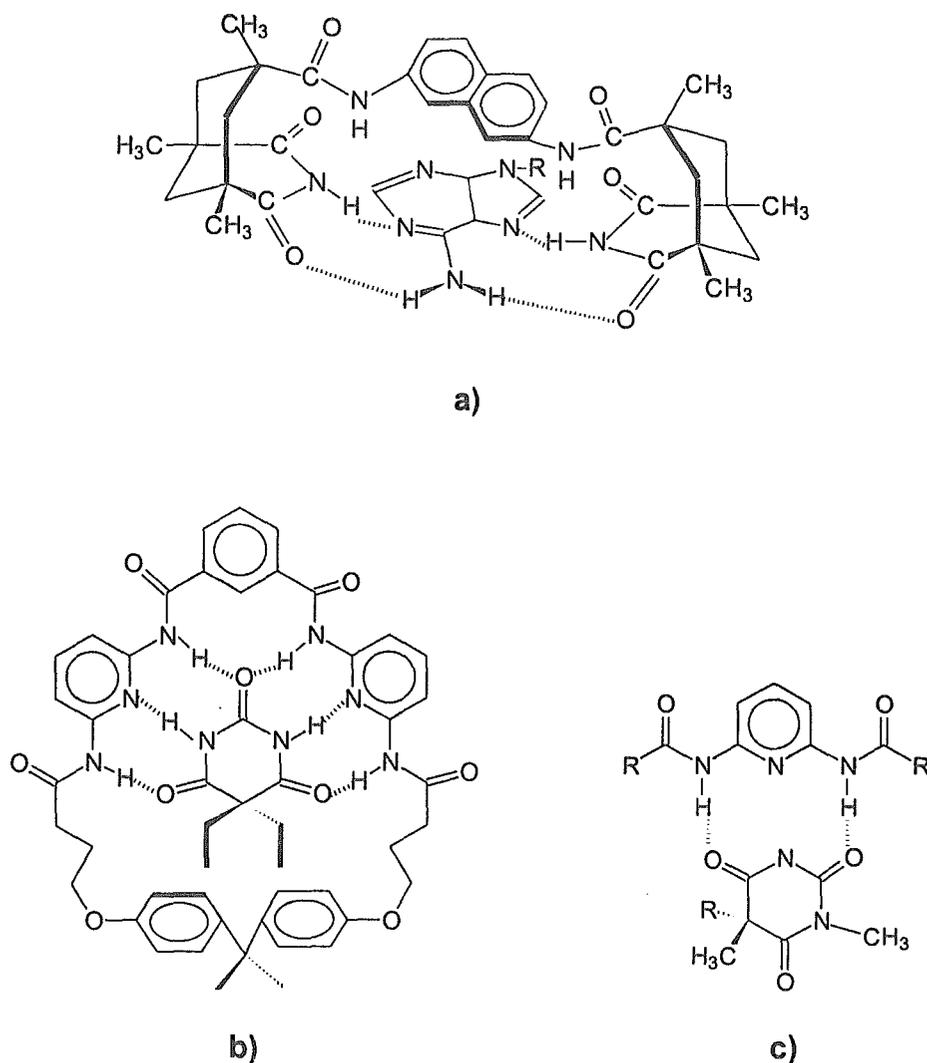
Un análisis de tales estructuras ha mostrado que las energías de complejación correlacionan linealmente con el correspondiente número de enlaces de hidrógeno, al menos en ausencia de otros efectos como impedimento estérico, transferencia de carga, interacciones de apilamiento o contribuciones de entropía que surgen de segmentos altamente flexibles [Schneider y Dürr, 1991].

La fuerte influencia del medio en la complejación puede ser cuantificada por la capacidad del disolvente para formar enlaces de hidrógeno y así competir en alta molaridad por el soluto. Esto ocasiona un incremento en la constante  $K$  por un factor de 10-20 si se emplea  $\text{CCl}_4$  en lugar de  $\text{CHCl}_3$  [Schneider, 1994].

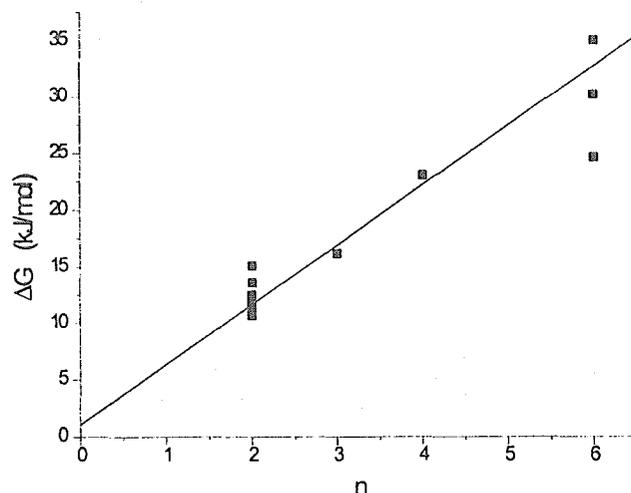
Schneider *et al.* [1989a] indican que si se grafican los cambios de energía libre reportados en la literatura determinados en  $\text{CHCl}_3$  vs el número  $n$  de posibles enlaces de hidrógeno en cada caso, se obtiene una línea recta, donde la pendiente da un

incremento de  $5 \pm 1$  kJ/mol (Figura 2.10). Sin embargo, si los experimentos se llevan a cabo en  $\text{CCl}_4$  se obtiene un incremento por enlace de hidrógeno de  $\approx 10$  kJ/mol.

El debilitamiento de la constante de asociación de los complejos en diferentes disolventes es consecuencia enteramente de una competencia del disolvente por los sitios de enlace en el soluto. Si una molécula de disolvente grande es incapaz de entrar a la cavidad, el resultado es una constante de asociación más grande [Schneider y Dürr, 1991].



**Figura 2.9.** Sistemas anfitrión-huésped de: **a)** Rebek *et al.* [1987], **b)** Chang y Hamilton [1988] y **c)** Schneider *et al.* [1989a] formados por enlaces de hidrógeno de funciones amida.



**Figura 2.10.** Energías de complejación  $\Delta G$  para sistemas anfitrión-huésped [Rebek *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1989a; Chang y Hamilton, 1988] que contienen principalmente funciones amida en  $\text{CDCl}_3$ , como función del número  $n$  de enlaces de hidrógeno.

### 2.1.6 El efecto hidrofóbico

Un adecuado entendimiento del comportamiento molecular de la insolubilidad de un hidrocarburo líquido en agua es prerequisite para cualquier racionalización satisfactoria de una gran variedad de fenómenos. Algunos ejemplos incluyen: 1) efectos de cambios de disolvente en los parámetros de activación de reacciones orgánicas, 2) la formación de micelas y membranas biológicas y 3) la estabilidad y desnaturalización térmica de proteínas globulares [Muller, 1990].

Ha habido algunos desacuerdos acerca del significado del término hidrofóbico (efecto, fuerza o interacción). Se han empleado al menos tres significados: 1) para referirse a la transferencia de un soluto no polar a cualquier disolución acuosa, 2) más específicamente para referirse a la transferencia de solutos no polares en una disolución acuosa cuando han observado características particulares de su dependencia con la temperatura. Estos dos significados describen sólo observaciones

experimentales y no hacen referencia a ninguna interpretación molecular en particular.

3) La hidrofobicidad también ha sido empleada para referirse a modelos moleculares particulares, en los cuales se involucran generalmente el ordenamiento de moléculas de agua alrededor de solutos no polares [Dill, 1990].

### A. Desarrollo del concepto de hidratación hidrofóbica

En términos termodinámicos, la baja solubilidad de los hidrocarburos significa que la transferencia de la molécula de soluto del alcano líquido puro a la disolución de agua involucra un largo incremento en la energía libre estándar de Gibbs  $\Delta G_{tr}^0 > 0$ .  $\Delta G_{tr}^0$  está relacionada a  $X_s$ , la fracción molar del soluto en la disolución saturada.

$$\Delta G_{tr}^0 = -RT \ln X_s$$

El largo calor de vaporización y la tensión superficial del agua implica que ésta tiene una alta densidad cohesiva. Por lo tanto la creación de una cavidad para acomodar una molécula de soluto podría requerir una cantidad considerable de entrada de entalpia. Aunque parte de esta energía podría recuperarse cuando el soluto es puesto en la cavidad, podría suponerse que el proceso total involucra el reemplazamiento de interacciones agua-agua atractivas por unas agua-soluto más débiles. Esto podría explicar el  $\Delta H_{tr}^0$  positivo y éste a su vez el  $\Delta G_{tr}^0$  observado.

Sin embargo, en los años 30 se dispuso en forma indirecta de los valores experimentales de  $\Delta H_{tr}^0$ , basándose en la siguiente relación a presión constante.

$$\frac{d(\Delta G_{tr}^0 / T)}{dT} = -\frac{\Delta H_{tr}^0}{T^2}$$

De tal forma que  $\Delta H_{tr}^0$  es negativo a temperatura de  $\sim 25^\circ\text{C}$ . A la luz de esta situación la relación:

$$\Delta G_{tr}^0 = \Delta H_{tr}^0 - T\Delta S_{tr}^0$$

muestra que a  $25^\circ\text{C}$  la transferencia del soluto en la disolución debe involucrar un largo decremento de entropía *i.e.*,  $\Delta S_{tr}^0 < 0$ . Debido a que  $\Delta G_{tr}^0$  no puede ser positiva en

ausencia del término entrópico, parece natural considerar la insolubilidad como "controlada por la entropía". No ocurren pérdidas similares de entropía cuando los solutos no polares entran en otro medio polar; este comportamiento es aparentemente único de las disoluciones acuosas. Estas consideraciones son las bases de todos los intentos subsecuentes para racionalizar el comportamiento de estas disoluciones invocando al efecto hidrofóbico como efecto de un reflejo estructural especial o de aspectos termodinámicos del agua líquida [Muller, 1990].

La mecánica estadística señala que un incremento en la entropía para una colección de moléculas indica una transición a un estado de mayor desorden. Entonces un  $\Delta S_{tr}^0$  negativo sugiere que cuando un soluto no polar se disuelve en agua causa algún tipo de reorganización de las moléculas de disolvente vecinas, lo cual las deja en un estado más ordenado. Se han desarrollado muchos modelos conceptuales para visualizar esta transformación. Muchas de estos involucran la formación cerca del soluto de agregados de moléculas de agua de corta vida con estructura más o menos bien definida. Estos han sido llamados "icebergs", "flickering clusters" o "clathration shells", jaulas poliédricas similares a los hidratos cristalinos formados por algunas moléculas no polares pequeñas. Cualquiera de éstas es consistente con una terminología en la cual los solutos no polares son referidos como "promotores de estructura", término que describe bien los cambios producidos en el agua por alcanos o grupos alquilo [Muller 1990].

Las moléculas de agua que rodean al soluto no polar prefieren enlazarse por enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua en lugar de gastar los enlaces de hidrógeno dirigiéndolos hacia las especies no polares (Figura 2.11) [Dill, 1990 y referencias citadas allí].

Sin embargo, la aversión de solutos no polares al agua comienza a ser más común, y menos manejada por la entropía a temperaturas más altas. Para disoluciones simples, el cambio de capacidad calorífica después de la transferencia es pequeño. Para solutos no polares el cambio de capacidad calorífica después de la transferencia del líquido puro al agua es grande y positivo. Esto significa que para disoluciones simples (por ejemplo A y B), la transferencia de A en B esta caracterizada por una

entalpía y entropía que son independientes de la temperatura y una energía libre la cual es constante o lineal con temperatura. Sin embargo, la situación es muy diferente para la transferencia de solutos no polares en agua.

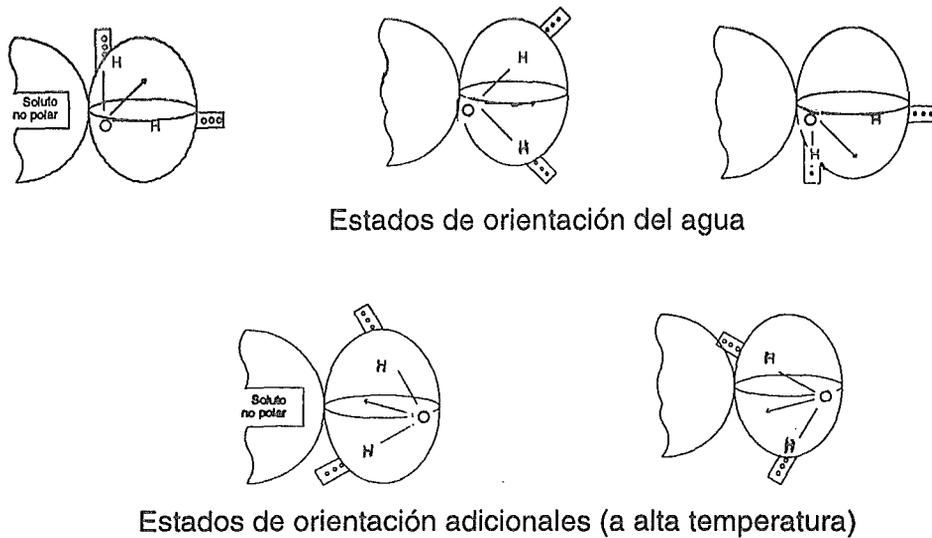


Figura 2.11. Modelo de "iceberg" para los largos cambios de capacidad calorífica que involucran la transferencia de solutos no polares en agua [Frank y Evans, 1945; Dill, 1990].

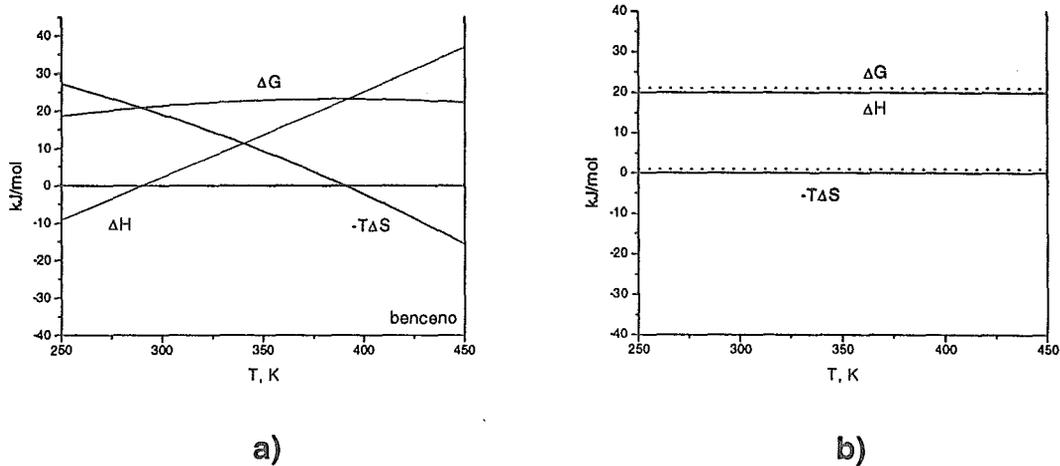


Figura 2.12. Comparación de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$  para la transferencia de un soluto del líquido puro a una a) disolución acuosa y a una b) disolución regular hipotética [Privalov y Gill, 1988].

Las grandes capacidades caloríficas implican que la entalpia y entropia son fuertes funciones de la temperatura [Privalov y Gill, 1988; ver otras referencias en Dill, 1990] (Figura 2.12).

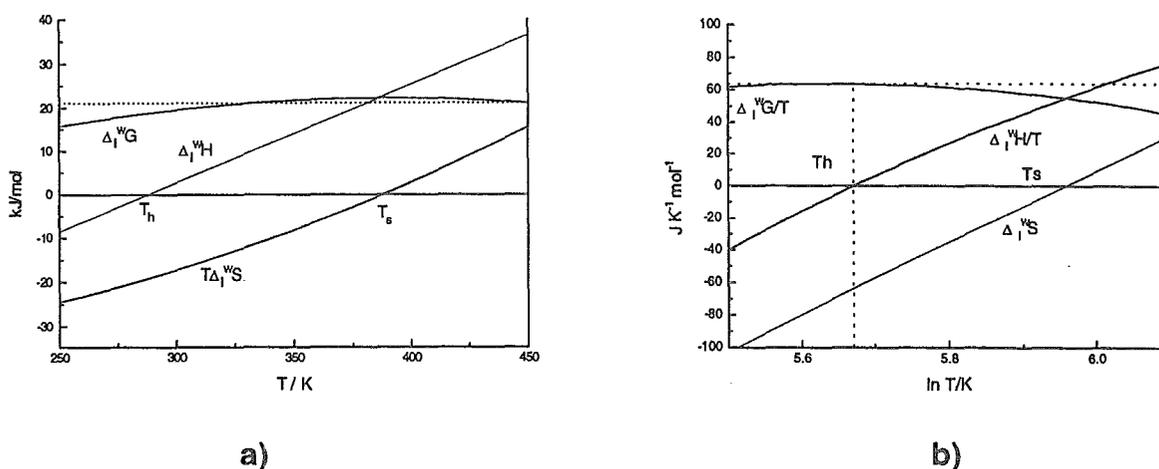
La entalpia de transferencia de solutos no polares en agua es más positiva en el intervalo de temperatura 130-160°C (403-433 K) por lo tanto la aversión de las especies no polares por el agua, cualquiera que sea su naturaleza molecular, es más grande a esas temperaturas más altas. Por definición este máximo de aversión surge donde la energía libre de transferencia es máxima y así donde la entropia (la derivada de la energía libre con la temperatura) es igual a cero, entonces el máximo de aversión de los solutos no polares por el agua debe ser dirigido por la entalpia. En otras palabras, a la temperatura para la cual la hidrofobicidad es más grande, la entropia de transferencia es cero. A esas temperaturas la aversión de los solutos no polares por el agua es entálpica como en las soluciones simples clásicas. Es por lo tanto inapropiado referirse a los procesos de solvatación no polares en agua con grandes capacidades caloríficas como "dirigidos por la entropia" o "dirigidos por la entalpia" debido a que cualquier descripción es exacta sólo dentro de un intervalo de temperatura. A 25°C (298 K) el efecto de hidrofobicidad es entrópico, mientras que a 140°C (413 K) es entálpico [Privalov y Gill, 1988].

Privalov y Gill [1988] indican que hay dos temperaturas de naturaleza universal que describen las propiedades termodinámicas de la disolución de un hidrocarburo líquido en agua (Figura 2.13). La primera de estas,  $T_H$ , es la temperatura a la cual el calor de disolución es cero y tiene un valor de aproximadamente 20°C (293 K) para diferentes tipos de líquidos. La segunda temperatura universal es  $T_S$ , donde el cambio de entropia del estado estándar es cero y es aproximadamente 140°C (413 K). El cambio de energía libre del estado estándar puede expresarse en términos de estas dos temperaturas, requiriendo conocer sólo el cambio de capacidad calorífica para una sustancia en particular.

$$\Delta_l^a G^0 = \Delta_l^a C_p (T - T_H) - T \Delta_l^a C_p \ln \frac{T}{T_S}$$

La dependencia de la temperatura de la solubilidad también puede expresarse en términos de los parámetros dados en la ecuación anterior  $\Delta_l^a G^0 / T$  es  $-R \ln$  (solubilidad).

$$\frac{\Delta_l^a G^0}{T} = \Delta_l^a C_p \left( 1 - \frac{T_H}{T} \right) - \Delta_l^a C_p \ln \frac{T}{T_S}$$



**Figura 2.13.** Dos representaciones termodinámicas de la disolución de benceno en agua, suponiendo un  $\Delta C_p^0$  constante. **a)** Energía libre de transferencia y sus contribuciones fundamentales como función de la temperatura. **b)** Función solubilidad ( $\Delta G/T$ ) y sus contribuciones fundamentales como función del  $\ln T$  [Privalov y Gill, 1988].

Si se grafica la energía libre de transferencia como función de la temperatura (Figura 2.13a) se pueden ver las contribuciones de  $\Delta H$  y  $T\Delta S$ . En esta gráfica, la pendiente de la función  $\Delta H$  es  $\Delta C_p$ , y la energía libre se maximiza a  $T_S$ . Por otro lado, si se grafica la función de solubilidad  $\Delta_l^a G^0 / T$  vs  $\ln T$  (Figura 2.13b) se pueden observar directamente las contribuciones de  $\Delta H / T$  y  $\Delta S$  directamente. En esta gráfica la pendiente de la curva  $\Delta S$  es  $\Delta C_p$ . De aquí el máximo de  $\Delta_l^a G^0 / T$  ocurre a  $T_H$  (Figura 2.13b).

Dos observaciones han contribuido significativamente a establecer las bases moleculares de los grandes cambios de capacidad calorífica de la transferencia de solutos no polares en agua: 1) la entropía y la capacidad calorífica de transferencia son linealmente proporcionales al área superficial del soluto no polar y 2) los largos cambios de capacidad calorífica de transferencia para los solutos más simples decrece ligeramente con el incremento de la temperatura.

Lo anterior permite una visión en la que la organización de las moléculas de agua en la primera capa que rodea al soluto es como un "iceberg" un clatrato o un "flickering cluster" (Figura 2.11). A temperatura ambiente, las moléculas de agua que rodean al soluto no polar pueblan principalmente un estado de baja energía, de baja entropía: las moléculas de agua están ordenadas de tal forma que se establecen enlaces de hidrógeno agua-agua. Las moléculas de agua están ordenadas de tal manera que forman enlaces de hidrógeno agua-agua. Con el incremento de la temperatura, las moléculas de agua que rodean al soluto pueblan, de manera importante un nivel de alta energía, alta entropía: ellas están menos ordenadas y tienen atracciones debilitadas. De aquí que el incremento de temperatura causa una "fusión" de la estructura del agua que lo rodea conforme la entropía y la energía se incrementan. (Probablemente este proceso se representa mejor por enlaces de hidrógeno doblados en lugar de enlaces rotos, debido a su energía de doblado es mucho más pequeña que la energía de ruptura). De esto resulta una larga capacidad calorífica ya que los dos estados energéticos diferentes del agua proveen un mecanismo de almacenamiento de energía. El estado de más alta energía comienza a estar más poblado con la temperatura. La razón de que esta capacidad calorífica sea tan larga para una molécula de soluto se debe a que cada molécula de soluto está rodeada por un número grande (más de 10) moléculas de agua en la primera capa, cada una de las cuales participa en este mecanismo de almacenamiento de energía. Aún no se conoce en detalle la naturaleza de la ruptura de estos enlaces, aunque ellos indudablemente incluyen alguna combinación de enlaces de hidrógeno soluto-agua y agua-agua e interacciones de van der Waals y dipolar electrostáticas [Dill, 1990 y referencias citadas allí].

El "nuevo punto de vista" del efecto hidrofóbico representa el desarrollo de las ideas presentadas incluyendo los esfuerzos por predecir y observar como las propiedades termodinámicas y espectroscópicas de estas disoluciones cambian cuando se hacen mediciones a temperaturas que se aproximan a 100°C o aún mayores a presiones arriba de una atmósfera [Muller, 1990]. Un dogma característico del nuevo punto de vista es que realmente existe una temperatura donde el agua no muestra su comportamiento anómalo y que la distingue marcadamente de otros disolventes polares, esta temperatura es identificada como  $T_S$ , temperatura a la cual  $\Delta S_{tr}^0 = 0$  [Muller, 1990].

Una de las debilidades del esquema de interpretación de Privalov y Gill [1988] es que establece que  $\Delta S_{tr}^0 = 0$  es casi ciertamente una condición necesaria para la ausencia de hidratación hidrofóbica, y que esta condición podría no ser suficiente [Muller, 1990]. También señala Muller [1990] que a  $T = T_S$ , donde  $\Delta S_{tr}^0(T_S) = 0$  y de aquí  $\Delta G_{tr}^0(T_S) = \Delta H_{tr}^0(T_S)$ , estos cambios de entalpia y energía libre no contienen, por suposición, ninguna hidratación hidrofóbica. Esto tiene futuras implicaciones, tal como que la "causa real" de la insolubilidad de hidrocarburos a temperaturas ordinarias es la contribución a la entalpia de transferencia,  $\Delta H_{tr}^0(T_S)$  [Muller, 1990].

Costas *et al.* [1994] han presentado, basándose en la disolución de alquilbencenos en agua, un nuevo esquema de interpretación para las funciones de transferencia termodinámica, el cual contrasta con el propuesto por Privalov y Gill [1988]. Aunque ambos esquemas son capaces de reproducir el comportamiento de la transferencia del líquido a agua en el intervalo de temperatura en el que se dispone de datos experimentales difieren marcadamente en la interpretación del proceso de transferencia y especialmente en su descomposición en las diferentes contribuciones y en su significado físico.

El nuevo esquema [Costas *et al.*, 1994] considera que las moléculas de agua alrededor del soluto sufren un proceso de relajación, el cual disminuye la energía libre, la entalpia y entropía del sistema y que es responsable de la larga capacidad calorífica de transferencia. Describen el proceso de relajación empleando un modelo de dos estados para las moléculas de agua obtenido de primeros principios. La contribución

negativa de relajación a la energía libre de Gibbs promueve la solubilidad, pero ésta es compensada por una larga contribución positiva que surge de la creación de una cavidad en agua y de las largas diferencias en interacciones entre soluto-soluto, agua-agua y soluto-agua. Indican también que el origen de la hidrofobicidad reside en la alta energía cohesiva del agua.

La Tabla 2.2 presenta las evaluaciones del incremento de  $\Delta G$  hidrofóbico obtenidas por diferentes procedimientos.

**Tabla 2.2.** Evaluaciones del incremento de  $\Delta G$  hidrofóbico.

Valor ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ )	Origen	Referencia
-0.11	De los parámetros de Hansch	Leo <i>et al.</i> [1971]
-0.10	Correlación empírica entre área superficial accesible del soluto y su energía libre de transferencia a agua	Chothia [1975]
-0.23	Experimentos de ingeniería de proteínas	Serrano <i>et al.</i> [1992]
-0.24	De solubilidad límite de alquilbencenos	Costas <i>et al.</i> [1994]

La comparación de las propiedades termodinámicas de procesos como el de transferencia de sustratos no polares a agua, la formación de micelas, la distribución de solutos apolares en micelas, las interacciones de apilamiento de moléculas orgánicas y la formación de complejos de inclusión, entre otros; atribuidos al efecto hidrofóbico ha traído como consecuencia la clasificación del efecto hidrofóbico como "clásico" y "no clásico".

Las características termodinámicas comúnmente atribuidas a complejación debido al efecto hidrofóbico "clásico" son un  $\Delta S^0$  positivo y un  $\Delta H^0$  cercano a cero. Estas tendencias generales fueron establecidas en base a estudios de la solubilidad de compuestos apolares en agua (o la transferencia de tales compuestos de una fase orgánica a una acuosa) y principalmente relacionados al concepto de agua estructurada de Frank y Evans [1945] y Kauzmann [1959], *i.e.*, ordenamiento de moléculas de disolvente alrededor de solutos no polares en disolución acuosa. Sin embargo, este modelo no es inconsistente con el concepto de la cavidad en el disolvente de Sinanoglu [1968]. El modelo de Sinanoglu [1968] se basa en los requerimientos de energía para la formación de una cavidad en el disolvente, de tal

manera que la energía libre necesaria para compensar las largas fuerzas cohesivas entre moléculas de disolvente (especialmente fuertes en agua) es proporcional a la tensión superficial del disolvente. En este último modelo, se debe reconocer que aunque la formación o desaparición de una cavidad en el disolvente domina el cambio de energía libre del proceso, la relajación o reestructuración de las moléculas de agua que ocurrirá alrededor del soluto apolar puede contribuir grandemente al cambio de entalpia o entropía del proceso completo, mientras que tiene una contribución mínima al cambio de energía libre.

Otra característica termodinámica bien establecida asociada al efecto hidrofóbico "clásico" es un cambio de capacidad calorífica ( $\Delta C_p^0$ ) negativo. Las bases moleculares del decremento de  $\Delta C_p^0$  después de la agregación de dos partículas de soluto se explican considerando que cuando las partículas están solvatadas por separado están rodeadas por una capa de moléculas de agua estructurada muy lábiles a la temperatura. Así el decremento en la cantidad de moléculas de agua estructurada, que surge de la agregación de partículas de soluto resultará en un decremento en la capacidad calorífica del sistema. Además de los procesos de transferencia de solutos no polares a agua, el enlace hidrofóbico "clásico" se ha visto en el enlace del etano, propano y butano a muchas proteínas y ocurre con  $\Delta H$  cercana a cero, en la polimerización del virus del mosaico, el cual ocurre con un  $\Delta H$  positivo de 794.2 kJ/mol y  $\Delta S$  de 682 u.e. y en la agregación de moléculas de detergentes no iónicos en micelas, la cual ocurre con un  $\Delta H$  positivo de +20.9 kcal/mol y  $\Delta S$  de +30 u.e [Jencks 1969 y referencias citadas allí].

De acuerdo a Jencks [1969] existen diversas interacciones soluto-soluto que se podrían esperar como dirigidas por el efecto hidrofóbico, pero que sin embargo proceden con valores de  $\Delta H^0$  grandes y negativos,  $\Delta S^0$  negativos o cercanos a cero y  $\Delta C_p^0$  positivos. Tales casos han sido descritos como debidos a interacciones hidrofóbicas "no clásicas". Los ejemplos de este tipo de efecto hidrofóbico incluyen la dimerización de la tionina, un colorante catiónico ( $\Delta H = -28.4$  kJ/mol), la asociación de otros colorantes exhibe valores de  $\Delta H$  tan grandes como -104.5 kJ/mol y  $\Delta S$  de -40 a 60

u.e. y la asociación de purinas con moléculas de esteroides relativamente no polares  $\Delta H = -25.1$  kJ/mol [Jencks 1969 y referencias citadas allí].

## B. El efecto hidrofóbico en sistemas anfitrión-huésped

El efecto hidrofóbico constituye la principal contribución a la estructura terciaria de las proteínas, las cuales adquieren una forma globular con grupos cargados en la superficie y residuos hidrofóbicos dentro. Aunque las fuerzas hidrofóbicas exhiben una poderosa influencia de organización, no son específicas y tienden a operar colectivamente como las interacciones de van der Waals.

La interacción más importante en los sistemas anfitrión-huésped en disolución acuosa es la atracción entre regiones lipofílicas en las moléculas anfitrión y huésped [Schneider, 1991].

Se han observado valores de  $\Delta S^\circ$  significativamente positivos en el caso de la formación de complejos con proteínas [ver referencias citadas en Schneider, 1991] y ciclodextrinas en agua, por ejemplo:  $\beta$ -ciclodextrina/carboxilato de adamantano,  $\Delta H^\circ = -23$  kJ/mol y  $\Delta S^\circ = 6.3$  J/mol K [Harrison y Eftink, 1989] y  $\beta$ -ciclodextrina/carboxilato de 1 biciclo [2.2.1] hepteno  $\Delta H^\circ = -7.5$  kJ/mol y  $\Delta S^\circ = 35.5$  cal/mol K [Eftink *et al.*, 1989]. Una característica adicional de tales asociaciones es el decremento en capacidad calorífica  $\Delta C_p$  [Abraham, 1982], debido a que la liberación de agua de solvatación da lugar a una reducción en el número de enlaces que absorben calor. Una consecuencia importante para los equilibrios supramoleculares es que los valores  $\Delta H^\circ/\Delta S^\circ$  correspondientes muestran una dependencia importante de la temperatura. Los cambios en los valores de  $\Delta C_p$  sólo pueden ser establecidos por mediciones precisas de las constantes de equilibrio sobre un amplio intervalo de temperaturas o, mejor por estudios calorimétricos directos.

Según algunos autores los mejores valores relativos para determinar la contribución del efecto hidrofóbico a las energías libres de diversos complejos anfitrión-huésped pueden ser anticipados del estudio de los cambios de energía libre de los

complejos o de las constantes de enlace en función de la composición del disolvente, más que basarse solamente en mediciones individuales en agua [Connors y Sun, 1971; Connors *et al.*, 1969; Lowe y Schellman, 1972]. Schneider *et al.* [1988] emplearon la relación (2.11) para determinar la sensibilidad de  $K$  a la contribución de las interacciones hidrofóbicas (en términos de la pendiente  $a$ ):

$$\log K = aS_p + \log K^0 \quad (2.11)$$

donde  $S_p$  es un parámetro empírico que describe la solvofobicidad del medio ( $S_p = 1.00$  para agua y  $S_p = 0.0$  para  $n$ -hexano [Abraham *et al.*, 1988]) y  $K^0$  es la constante de enlace en un disolvente hidrocarbonado.

La Figura 2.14 muestra una correlación lineal en la gráfica de  $\log K$  vs  $S_p$  de mezclas binarias de disolventes, agua-metanol, agua-etanol y agua-dioxano para siete sistemas. La pendiente  $a$  y la ordenada de  $\log K^0$  (para  $S_p = 0.0$ ) para los mismos sistemas correlacionan también linealmente (Figura 2.15), mostrando que  $a$  y  $K^0$  pueden emplearse como una medida de las contribuciones hidrofóbicas al enlace [Schneider *et al.*, 1988], ambos parámetros indican, por ejemplo que la solvofobicidad es la clave de la complejación de huéspedes neutros en anfitriones solubles en agua como las ciclodextrinas [Schneider *et al.*, 1988; Mascal, 1994] y en los ciclofanos [Mascal 1994].

El ajuste lineal de los datos mostrados en la Figura 2.15 da la siguiente ecuación:

$$a = 3.75 - 0.73 \cdot \log K^0 \quad (2.12)$$

Sin embargo, la interpretación de las correlaciones no es tan clara como lo parece a primera vista. Llama la atención el hecho de los valores extremos de  $a$  corresponden a huéspedes iónicos, que no es lógico. Además la correlación entre  $a$  y  $\log K^0$  es sólo un artefacto estadístico.

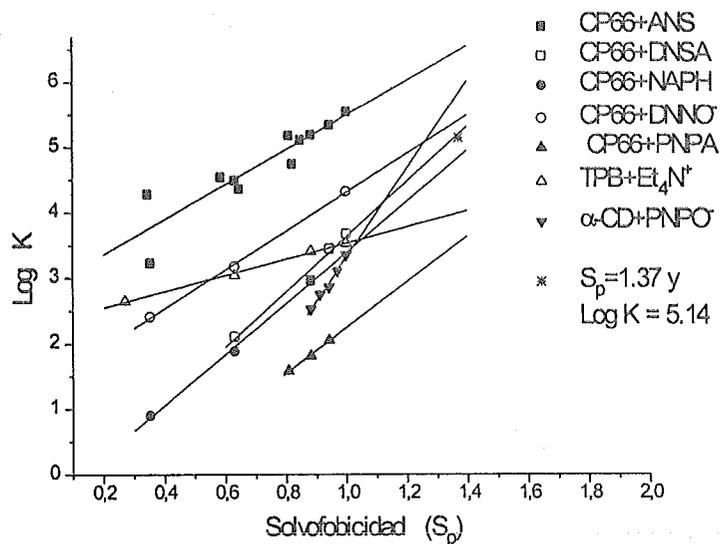


Figura 2.14.  $\text{Log } K$  (constantes de asociación) vs valores de solvofobicidad ( $S_p$ ) para siete sistemas en mezclas acuosas con metanol, etanol y dioxano [Schneider *et al.*, 1988]. Las estructuras de los sistemas se presentan en la Figura 2.16.

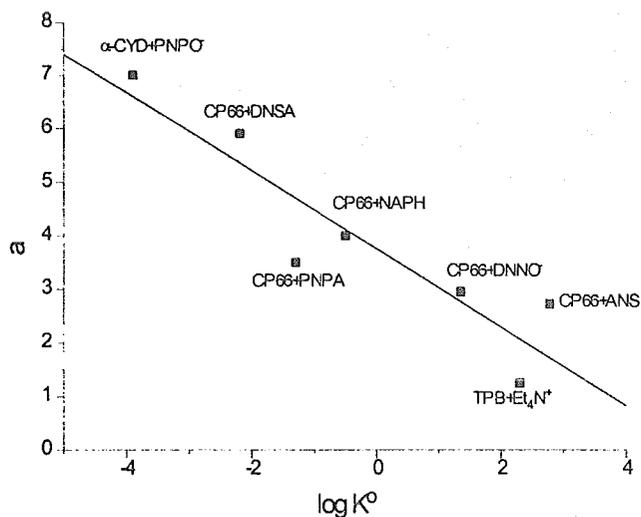


Figura 2.15. Correlación de la sensibilidad (pendiente  $a$ ) vs  $\log K^0$  (ordenada para  $S_p = 0.0$ ) para siete sistemas diferentes [Schneider *et al.*, 1988]. El ajuste lineal de los datos es:  $a = 3.75 - 0.73 \times \log K^0$ . Las estructuras de los sistemas se presentan en la Figura 2.16.

Para determinar la confiabilidad de las dependencias mostradas se sustituye la ecuación (2.12) en la ecuación (2.11), dos correlaciones lineales encontradas:

$$\log K = (3.75 - 0.73 \cdot \log K^0) \cdot S_p + \log K^0 \quad (2.13)$$

Reagrupando términos en la ecuación (2.13)

$$\log K = 3.75 \cdot S_p + (1 - 0.73 \cdot S_p) \cdot \log K^0 \quad (2.14)$$

Si se considera el caso:

$$S_p = \frac{1}{0.73} = 1.37 \quad (2.15)$$

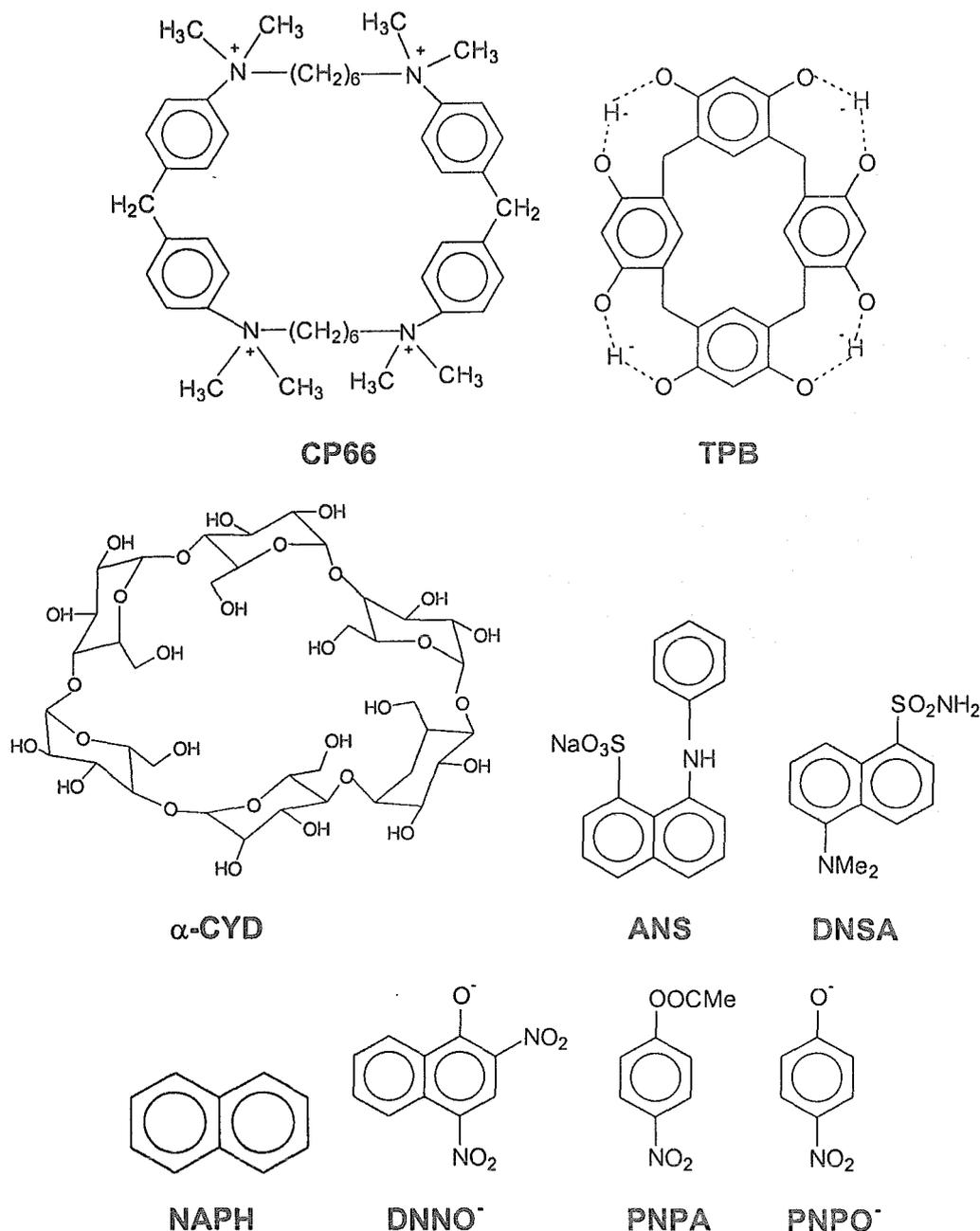
Sustituyendo la ecuación (2.15) en la ecuación (2.14):

$$\log K = 5.14 \quad (2.16)$$

Se encuentra que en el punto  $S_p = 1.37$  y  $\log K = 5.14$  (marcado con un asterisco en la Figura 2.14) deberían converger todas las dependencias primarias; sin embargo, se observa que este no es el caso, ver Figura 2.14.

El efecto isocinético o su equivalente en términos termodinámicos, la relación de isoequilibrio, se refiere a un punto de intersección común de las líneas de Arrhenius ( $\ln k$  vs  $1/T$ ) o líneas de van't Hoff ( $\ln K$  vs  $1/T$ ), para una serie de reacciones. El hecho de que exista un punto de intersección común de las líneas de Arrhenius (o van't Hoff) es matemáticamente equivalente a una relación lineal entre las energías de activación y factores pre-exponenciales o entre términos entálpicos y entrópicos (estos cuatro últimos términos, también se denominan términos secundarios). Sin embargo esa equivalencia matemática no siempre se mantiene desde el punto de vista estadístico debido a las incertidumbres experimentales en los parámetros secundarios

mencionados, los cuales frecuentemente dan lugar a una dependencia lineal artificial sin significado físico. Por ejemplo, en una gráfica de  $\Delta S$  vs  $\Delta H$ , puede mostrar en apariencia una relación lineal, pero regraficando los datos en una forma  $\Delta H$  vs  $\Delta G$  tal relación lineal no se mantiene [Linert, 1994].

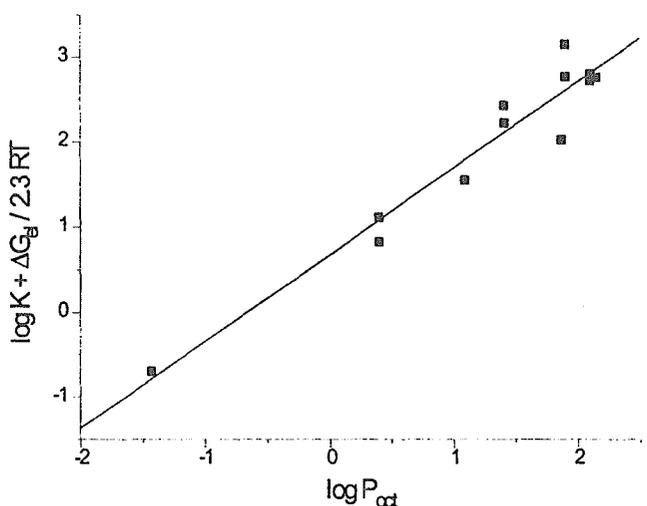


**Figura 2.16.** Estructuras de los anfitriones y sustratos empleados por Schneider *et al.* [1988], para el estudio de efectos solvofóbicos.

Una medida de hidrofobicidad ampliamente usada es el logaritmo de la constante de partición de un compuesto dado en un disolvente no acuoso, por ejemplo octanol ( $P_{oct}$ ), y agua [Leo *et al.*, 1971]. Como ejemplo puede citarse el trabajo de Yatsimirsky y Eliseev [1991], quienes determinaron las constantes de enlace de una serie de aniones de pirocatecoles (1,2-dihidroxibencenos) sustituidos en la posición 4 a cuatro formas catiónicas de 6-deoxi, 6-amino derivados de la  $\beta$ -ciclodextrina a partir de datos cinéticos de su auto-oxidación a pH 10.0. Yatsimirsky y Eliseev [1991] encontraron que la ecuación (2.17) describe las contribuciones electrostáticas e hidrofóbicas de sus sistemas estudiados:

$$\log K = a - \frac{\Delta G_{pi} \cdot n}{2.3 \cdot RT} + b \log P_{oct} \quad (2.17)$$

donde:  $\Delta G_{pi}$ , es la contribución por interacción de cada par iónico a la constante de enlace y es  $-5.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  (valor obtenido aplicando la aproximación de Schneider y Theis [1989] a sus sistemas de estudio),  $n$ , es el número de pares iónicos,  $2.3 RT = 5.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  y  $a$  y  $b$  son constantes.



**Figura 2.17.** Gráfica que muestra una correlación lineal entre las contribuciones electrostáticas e hidrofóbicas para los sistemas ciclodextrinas-pirocatecoles estudiados por Yatsimirsky y Eliseev [1991].

Del ajuste lineal de los datos mostrados en la Figura 2.17, la ecuación (2.17) tiene la forma final (ecuación 2.18) que describe sus resultados experimentales:

$$\log K = 0.71 + 1.0 \cdot n + 1.0 \cdot \log P_{oct} \quad (2.18)$$

Yatsimirsky y Eliseev [1991] encontraron que las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas contribuyen aditivamente a la energía libre de la complejación anfitrión-huésped y que las interacciones de cada tipo son empleadas en sus sistemas de estudio en una extensión máxima como es indicado por los coeficientes igual a uno de cada una de las diferentes contribuciones. La combinación de ambos tipos de interacciones da lugar a un enlace fuerte y específico que alcanza constantes de equilibrio de  $10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . La ventaja estructural de las ciclodextrinas que permite una separación en los tipos de enlace iónico e hidrofóbico reside supuestamente en que los grupos amino cargados positivamente se hayan localizados fuera de la región donde se lleva a cabo la interacción hidrofóbica, *i.e.*, la cavidad de la ciclodextrina.

## 2.2 Macrociclos naturales y sintéticos

Un número muy grande de macrociclos sintéticos y naturales han sido estudiados en considerable profundidad. El principal objetivo de éstos ha sido investigar las propiedades poco usuales que frecuentemente se asocian con ligandos cíclicos. En particular, la investigación de aspectos espectrales, electroquímicos, estructurales, cinéticos y termodinámicos de la formación de complejos macrocíclicos [Lindoy, 1989].

Se ha reconocido la importancia de los compuestos macrocíclicos en diversos procesos biológicos fundamentales, como la fotosíntesis, el transporte de oxígeno en mamíferos y otros sistemas respiratorios. Un macrociclo natural representativo producido por microorganismo es la valinomicina (Figura 2.18), el cual está formado por unidades alternadas de  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, y que exhibe actividad antibiótica [Lindoy, 1989 y referencias citadas allí].

Los derivados ion-metálicos de anillos macrocíclicos del tetrapirrol son de gran importancia biológica. Los complejos metálicos de las porfirinas (Figura 2.19) han sido estudiados por muchos años. Se han hecho estudios extensivos a algunos derivados de las porfirinas, las cuales juegan un papel central en la fotosíntesis, transporte y almacenamiento de oxígeno al igual que en otros procesos fundamentales como en la transferencia de electrones [Lindoy, 1989 y referencias citadas allí].

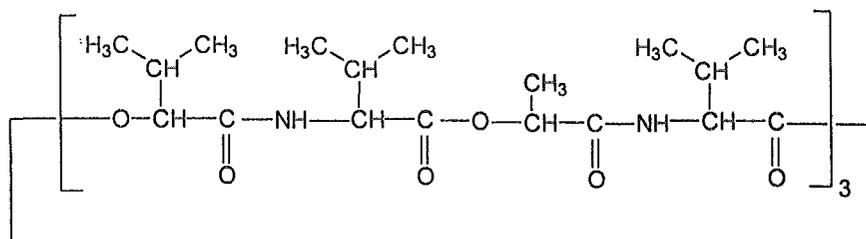


Figura 2.18. Estructura de la valinomicina.

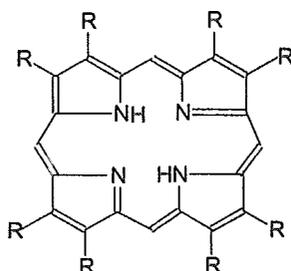


Figura 2.19. Estructura de la porfirina.

## 2.2.1 Las ciclodextrinas como anfitriones

### A. Naturaleza de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos naturales. Las ciclodextrinas fueron aisladas por primera vez en 1891 [Villers, 1891] de la acción de la amilasa de *Bacillus macerans* en el almidón y compuestos relacionados. Estos azúcares no-reductores fueron caracterizados más completamente en 1904 por Schardinger. Desde entonces las ciclodextrinas han sido objeto de un número extremadamente grande de estudios.

Las ciclodextrinas están formadas de 6 a 12  $\alpha$ -1,4-unidades de D-glucosa y tienen aproximadamente la forma de una dona. Sin embargo, no son perfectamente cilíndricas sino que adoptan la forma de un cono truncado. Las tres ciclodextrinas más comunes están compuestas de 6, 7 y 8 unidades de glucosa, las cuales son conocidas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - ciclodextrinas respectivamente (ver por ejemplo en la Figura 2.20 la estructura de la  $\alpha$ -ciclodextrina). El interior de la cavidad de las ciclodextrinas contiene dos anillos de enlaces C-H y un anillo de oxígenos glicosídicos y ninguno de los hidroxilos apunta dentro de la cavidad. El tamaño de la cavidad central se incrementa con el número de unidades de glucosa en el anillo y por ejemplo la  $\alpha$ -ciclodextrina tiene aproximadamente 4.5 Å de diámetro y 6.7 Å de profundidad. Las ciclodextrinas son muy hidrofílicas en sus bordes, pero muy lipofílicas en el resto de sus superficies internas y externas. Las ciclodextrinas son solubles en agua como un reflejo de sus bordes externos hidrofílicos.

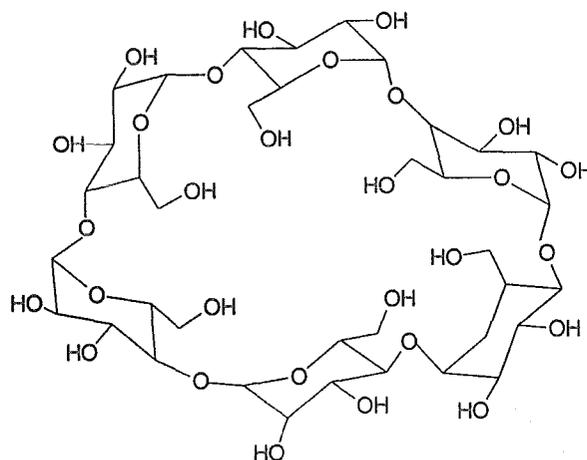


Figura 2.20. Estructura de la  $\alpha$ -ciclodextrina.

## B. Comportamiento de inclusión de las ciclodextrinas

Se ha demostrado por muchos años que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con una amplia variedad de huéspedes inorgánicos y orgánicos [Bender y Komiyama 1978; Szejtli, 1982]. Entre los que se encuentran compuestos aromáticos sustituidos, hidrocarburos, yodo, bromo y gases simples (bajo presión) que incluyen

cloro, criptón y alcanos pequeños. En muchos casos estos complejos exhiben una estequiometría 1:1 con constantes de asociación moderadamente altas ( $10^2 - 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Los complejos moleculares de las ciclodextrinas pueden ser aislados como sólidos cristalinos.

La fuerte complejación de la molécula huésped podría deberse a un "mejor ajuste" dentro de la cavidad. La dinámica de la formación y disociación ha sido estudiada por diferentes técnicas que incluyen experimentos de relajación de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  [Behr y Lenh, 1976].

El "enlace" hidrofóbico no clásico ( $\Delta H^\circ < 0$ ,  $\Delta S^\circ < 0$ ) entre las ciclodextrinas y moléculas huésped orgánicas involucra probablemente interacciones de van der Waals al igual que cambios de solvatación favorables [Tabushi *et al.*, 1978]. Un componente de este último aspecto podría involucrar la expulsión de la cavidad de agua "entálpicamente rica" (el agua en la cavidad no tiene un número completo de enlaces de hidrógeno comparados al agua del volumen del disolvente [Bergeron, 1977; Bender y Komiyama, 1978]). Se ha postulado que los cambios conformaciones que sufren las ciclodextrinas en la formación de complejos influyen la fuerza del enlace del anfitrión.

Ha sido ampliamente conocido que las ciclodextrinas pueden actuar como modelos elementales del comportamiento catalítico de las enzimas [Breslow, 1971]. Estos anfitriones con asistencia de sus funciones hidroxilo, pueden exhibir especificidad por huéspedes por inhibición competitiva y cinética del tipo Michaelis-Menten.

En estos sistemas un aspecto frecuente es que los grupos funcionales de los huéspedes son mantenidos adyacentes a los hidroxilos en la ciclodextrina. Se espera que tal proximidad promueva un aumento de la velocidad de reacción de la misma manera que los grupos hidroxilos del sitio activo de proteasas de serina atacan a un sustrato adyacente enlazado.

Se han desarrollado procedimientos efectivos para la funcionalización selectiva de grupos hidroxilos en las ciclodextrinas. La motivación de estos estudios ha sido generar anfitriones convenientemente funcionalizados, los cuales induzcan velocidades

de reacción aumentadas con un huésped incluido mientras que simultáneamente mantiene el control geométrico de la reacción [Lindoy, 1989 y referencias citadas allí].

## 2.2.2 Macrociclos naturales

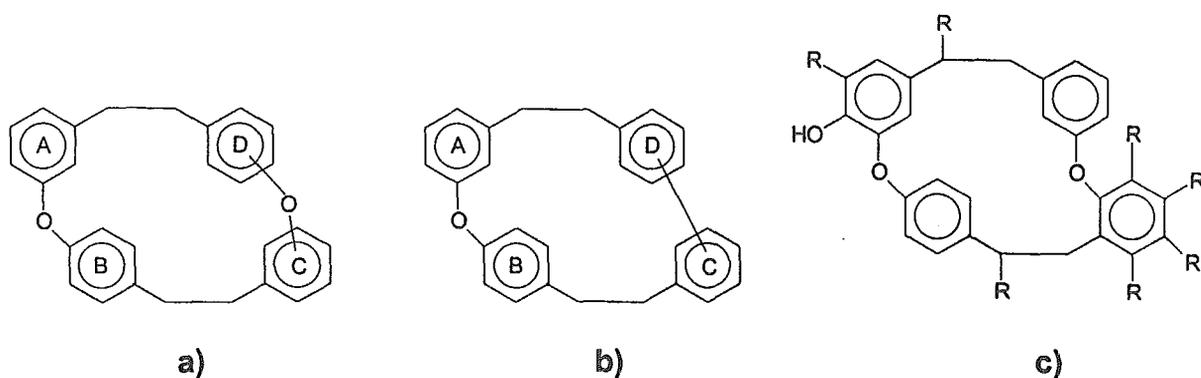
Dentro de este grupo, las ciclodextrinas ocupan un lugar preponderante como anfitriones. Sin embargo, existen algunas moléculas biológicas macrocíclicas que potencialmente podrían actuar como anfitriones, entre este tipo de moléculas se pueden citar los bis(bibencilos), tricotecenas macrocíclicas, algunos alcaloides, antibióticos como las rifamicinas y péptidos cíclicos. A continuación se presentan algunos aspectos relevantes de las ciclodextrinas y algunas estructuras de otros macrociclos naturales para los cuales aún no se ha investigado su capacidad de actuar como anfitriones.

### 2.2.2.1 Bis(bibencilos)

En contraste a la medicina tradicional europea, la cual se basa en plantas superiores, la etnomedicina en el lejano Este emplea extensivamente una amplia variedad de líquenes, musgo y helechos y algunas especies del género *Marchantiales* en la medicina folklórica japonesa. Un estudio sistemático [Keserú y Nógrádi, 1995 y referencias citadas allí] de los principios activos de algunas de las especies del género *Marchantiales* con actividades diurética, antitumoral, antibacterial y antifungal, les permitió aislar moléculas del tipo terpenoide, lípidos y muchos compuestos fenólicos relativamente simples, principalmente bibencilos, y una nueva serie de compuestos macrocíclicos llamados bis(bibencilos).

De acuerdo a la constitución del anillo macrocíclico, los bis(bibencilos) pueden dividirse en dos grupos principales aquellos con dos enlaces diarileter, tipo I (Figura 2.21a) o aquellos con un enlace diarileter y un enlace biarilo, tipo II (Figura 2.21b). Las

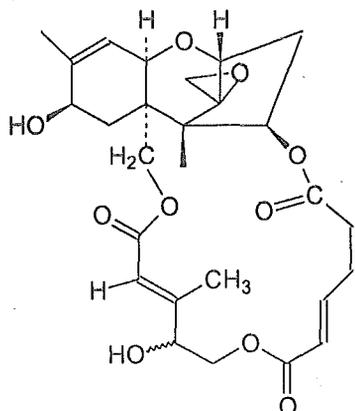
características de estos macrociclos es que el anillo B está invariablemente *para*-disustituido, el puente etano en el anillo A está en posición *meta* al éter de oxígeno y los anillos C y D están oxigenados en la posición *meta* a los puentes de etano. La variabilidad en los macrociclos surge de la oxigenación adicional de los anillos aromáticos (excepto el anillo B) y las formas en las cuales se unen los anillos C y D. La Figura 2.21c, muestra la estructura típica de un macrociclo de bis(bibencilo) [Keserú y Nógrádi, 1995].



**Figura 2.21.** Estructura de los bis(bencilos): a) tipo I, b) tipo II y c) esqueleto de bis(bibencilos) más frecuentemente encontrado.

### 2.2.2.2 Tricotecenas macrocíclicas

Las micotoxinas tricotecenas macrocíclicas son ésteres de alcoholes sesquiterpenos derivados de un esqueleto tricíclico común. De 172 tricotecenas aisladas de fuentes naturales, 67 son compuestos macrocíclicos. El 42 % de las tricotecenas han sido aisladas de plantas del género *Baccharis* y son llamados bacarinoideos. El resto de macrociclos son productos fungales entre estos están las roridinas y verrucarinas. Grove [1993] presenta en su artículo, las estructuras de muchos de estos compuestos macrocíclicos, así como sus fuentes y sinónimos, además proporciona datos espectroscópicos de absorción ultravioleta/visible, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como de espectrometría de masas característicos de estos compuestos. La Figura 2.22 muestra como ejemplo la estructura típica de un bacarinoide.



**Figura 2.22.** Estructura típica de un bacarinoide, una tricotecena macrocíclica.

### 2.2.2.3 Alcaloides isoquinolínicos

Un alcaloide es un compuesto orgánico cíclico, que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativo y esta limitado en su distribución a los organismos vivientes. La nomenclatura de los alcaloides no ha sido sistematizada debido a la complejidad de los compuestos involucrados. Los nombres de los alcaloides derivados químicamente están basados en el esqueleto cuyos miembros de un grupo poseen en común. De esta manera se tienen alcaloides derivados del indol, pirrolidina, piridina, quinolina, isoquinolina, imidazol, piridina-pirrolidina y piperidina-pirrolidina [Pelletier, 1983].

Entre los diferentes tipos de alcaloides se hace referencia a los alcaloides de bisbencilisoquinolina, de los cuales se conocen más de 140. Schamma y Moniot han clasificado este grupo en 26 estructuras típicas.

En el grupo bencilisoquinolina, los sustituyentes aromáticos pueden ser hidroxilo, metoxilo o metilenedioxilo. Las uniones pueden ser del tipo difenilo o difenil éter y el compuesto dado puede contener uno o más de cada uno de estos puentes. Una bisbencilisoquinolina típica contiene dos centros asimétricos, pero algunas veces uno o ambos átomos de nitrógeno están involucrados en grupos imino. Estos compuestos han sido aislados de 10 familias de plantas, de las cuales la *Menispermaceae* y

*Ranunculaceae* son las fuentes más importantes [Cordell, 1981]. El principal alcaloide de importancia dentro este grupo es la tubocurarina, es también el más estudiado y el mejor caracterizado. Enseguida se presentan en detalle los antecedentes, estructura química y trabajos preliminares realizados sobre la tubocurarina, objeto de estudio en esta tesis.

## A. Tubocurarina

### *Antecedentes*

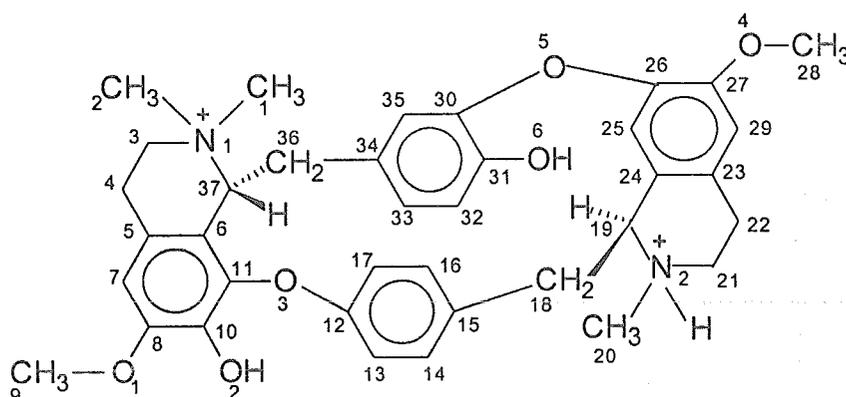
La tubocurarina (TC) es uno de los alcaloides del tubo curare de Brasil y Perú. Uno de los efectos de este alcaloide, conocido desde hace mucho tiempo, es que al ser inyectado a la corriente sanguínea causa relajamiento muscular. Debido a este efecto se ha promovido la investigación de la TC enfocada a su empleo en el tratamiento de desórdenes neuromusculares.

La química de la TC ha sido estudiada muy ampliamente desde que fue aislada [Boehm, 1897]. Inicialmente se propuso [King 1935, 1936] que se trataba de una bisbenciltetrahidroisoquinolina con dos átomos de nitrógeno cuaternarios y dos grupos fenólicos libres. Sin embargo, un estudio de RMN [Everett *et al.*, 1970] mostró que se trataba de una sal monocuaternaria. Esta última estructura fue confirmada por los análisis de rayos X de  $TC^{+2} 2Cl^{-} 5H_2O$  [Coddington y James, 1973] y  $TC^{+2} 2Br^{-} 4CH_3OH$  [Reynolds y Palmer, 1976]. La TC adopta conformaciones marcadamente diferentes en los cristales de ambas sales.

La TC cristaliza en la sal de dibromuro en metanol como una empalizada de cristales octaédricos amarillos. Es soluble en agua, etanol y metanol y puede ser recristalizada de estos disolventes, es insoluble en piridina, cloroformo, benceno y acetona. El pentahidrato tiene una rotación específica  $[\alpha]_D^{22} = +190^{\circ}$  en agua [Dutcher, 1946].

La TC presenta dos superficies, una convexa ampliamente hidrofílica formada por seis átomos de oxígeno y una superficie cóncava casi completamente hidrofóbica. Se determinó [Barlow, 1982] por titulaciones electrométricas en presencia de NaCl 0.1

M que la TC presenta tres grupos ionogénicos con  $pK_a$ 's a 25°C :  $pK_{a1} = 7.6$ ,  $pK_{a2} = 8.65$  y  $pK_{a3} = 9.65$ , los efectos de pH en la absorbancia les permitieron asignar los dos primeros  $pK_a$ 's a los grupos fenólicos de los oxígenos O6 y O2 (ver Figura 2.23), respectivamente y el tercer  $pK_a$  al grupo amonio N2.



**Figura 2.23.** Cation macrocíclico de la tubocurarina (TC). Numeración de protones de acuerdo a Fraenkel *et al.* [1994].

Los estudios de RMN a diferentes temperaturas [Egan *et al.*, 1973] indican que la conformación de la TC en disolución no es rígida y que los anillos aromáticos están orientados perpendicularmente al plano de los anillos de la tetrahydroisoquinolina.

El estudio más reciente de RMN [Fraenkel *et al.*, 1994] constituye un antecedente de la interacción de la TC y un receptor específico por acetilcolina (AChR). En este trabajo los investigadores asignaron las señales de todos los protones del espectro de la TC empleando las técnicas de RMN 1D y 2D y determinaron por experimentos NOESY los cambios conformacionales de la TC y el neurotransmisor natural acetilcolina ACh libres y cuando forman un complejo con el receptor.

Fraenkel *et al.* [1994] encontraron que la TC libre en disolución adopta una estructura donde los iones amonio cargados positivamente se repelen y mantienen una distancia máxima de 9.1 Å. La asociación TC-AChR, induce en la TC una forma más compacta con una cavidad hidrofóbica en la cual los iones amonio se encuentran separados por 6 Å.

Debido a que en este trabajo se realizaron algunos estudios con la TC a pH 9.0, en el cual se encuentra en forma zwitteriónica, se presenta a continuación algunos trabajos recientes de moléculas zwitteriónicas de estructura similar a la TC actuando como anfitriones.

Askew [1990] diseñó y sintetizó un anfitrión macrobicyclo zwitteriónico para formar complejos con algunos aminoácidos. Askew registró grandes desplazamientos a campo alto para los protones del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, detectó que las señales de algunos protones se ampliaban y determinó para este complejo una constante de asociación de  $(3.2 \pm 2.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Recientemente, Worm y Schmidtchen [1995] estudiaron por RMN el enlace un anfitrión macrotríclico zwitteriónico con carga positiva y sustituyentes rígidos extendidos radialmente al exterior con extremos finales cargados negativamente con haluros negativos. Los autores determinaron constantes de asociación del orden de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  para la formación de complejos con estequiometría 1:1 con aniones pequeños como los halogenuros.

Parker y Rosser [1995] encontraron que un ciclofano aniónico formaba un complejo 1:1 con acetilcolina en 98:2  $[^2 \text{ H}_8]\text{THF-D}_2\text{O}$ , las características de los espectros de RMN les indicaron la formación de un complejo con una constante aproximada de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . El mismo ciclofano, pero en su forma zwitteriónica también forma un complejo 1:1 con la acetilcolina; sin embargo, según los autores el complejo pareció (no dan ningún valor de la constante) ser menos estable que el complejo formado cuando el anfitrión está cargado negativamente.

Una secuencia de reconocimiento zwitteriónico corta, de importancia biológica, es la "señal" del péptido RGD (ArgGlyAsp). Su enlace a receptores biológicos específicos por interacción a través de su guanidinium y cadenas laterales de carboxilato juega un papel crítico en varios procesos que involucran adhesión celular [Ruoslahti y Pierschbacher, 1987; Travis, 1993].

#### 2.2.2.4 Rifamicinas

Las rifamicinas son un grupo de antibióticos estrechamente relacionados producidos por *Streptomyces mediterranei*. Los cultivos de cepas de *Streptomyces* muestran actividad contra bacterias gram-positivas e infecciones de tipo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*) y actividad limitada contra bacterias gram-negativas. El estudio cromatográfico de los productos de fermentación, muestra al menos cinco sustancias. Sólo una de estas, el ácido, rifamicina B, puede ser separado fácilmente y cristalizado. La rifamicina B se oxida en presencia del aire a la rifamicina O, la cual puede ser hidrolizada a la rifamicina S. La rifamicina S puede ser reducida reversiblemente en la rifamicina SV, rifamicina empleada terapéuticamente [Giunchi, 1963; Frontali y Tecce, 1967] (Figura 2.24).

La estructura básica de las rifamicinas se muestra en la Figura 2.24. Consiste fundamentalmente de dos partes: un cromóforo naftoquinónico y un puente alifático llamado *ansa*, el cual extiende el cromóforo naftoquinónico [Martinelli *et al.*, 1973]. Como tipo estructural, las ansamicinas están relacionadas por la presencia de un puente *ansa*, el cual le da una forma de dona a estas moléculas [Brufani *et al.*, 1964]. Se ha especulado que esta forma de las ansamicinas es la responsable de la estrecha similaridad en sus funciones a pesar de la presencia de otros aspectos estructurales ampliamente diversos. Existe la idea de que la formación de complejos es similar a los formados por las ciclodextranas [Casey y Whitlock, 1975], en virtud de que al igual que las ciclodextranas, las rifamicinas poseen una cavidad, con unidades estructurales alifáticas y aromáticas capaces de interacciones hidrofóbicas e hidroxilos susceptibles de formar puentes de H.

La estructura de las rifamicinas ha sido determinada independientemente por: estudios de degradación química de la rifamicina S [Oppolzer *et al.*, 1964] y por análisis de rayos-X de la rifamicina B [Brufani *et al.*, 1964].

Algunos estudios han mostrado que estos antibióticos son inhibidores de las enzimas transcriptoras. Estudios de relación estructura-reactividad muestran que los aspectos esenciales para la actividad de la rifamicinas es la presencia de tres hidroxilos

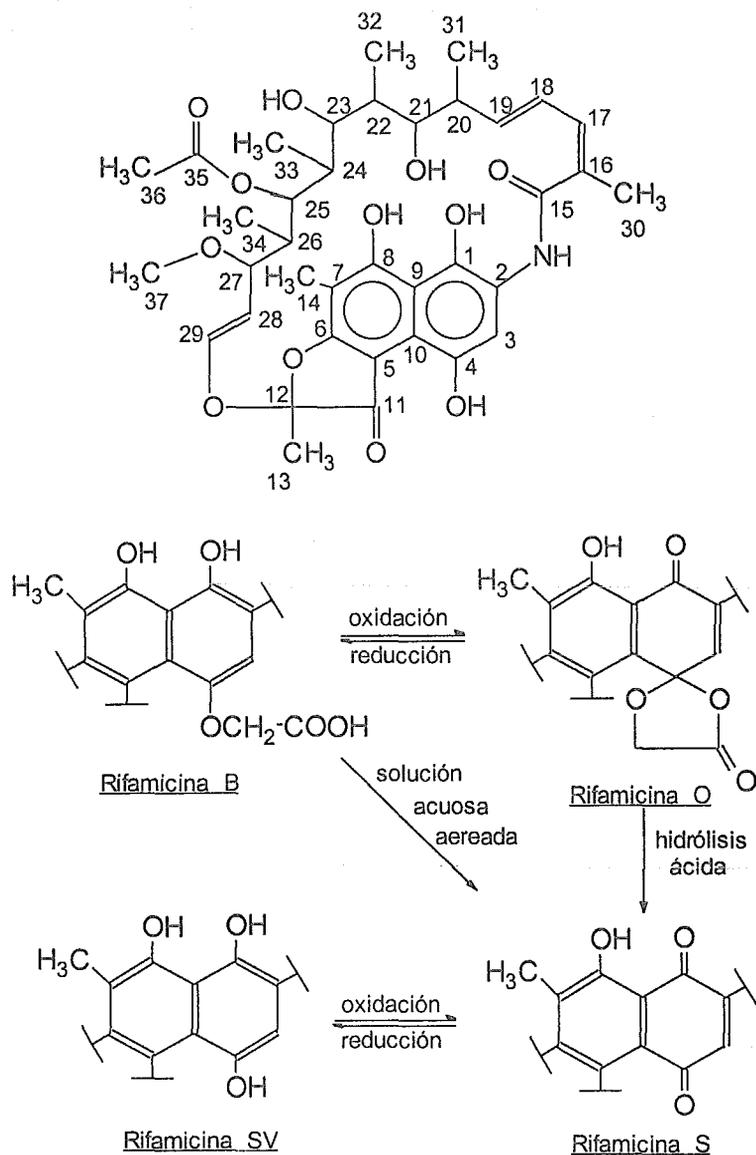
libres en C-21, C-23 y C-8 y de la función oxígeno en C-1. Además se ha sugerido que probablemente sólo una conformación de la cadena *ansa* permite el enlace entre las rifamicinas y la enzima blanco, polimerasa bacteriana dependiente de ADN y ARN dependiente de ADN, de tal forma que debe existir una relación espacial definida entre las funciones oxígeno mencionadas [Sensi, 1973].

También han sido preparadas rifamicinas de estructura diversa por modificación química. Las rifamicinas difieren una de otra en el tipo y localización del sustituyente en su anillo naftohidroquinónico. La síntesis de las 3-aminometilrifamicinas S N-sustituídas [Maggi *et al.*, 1965a; 1968a] tiene como objetivo mejorar su absorción oral y eventualmente su actividad contra bacterias gram-negativas en comparación con la rifamicina SV, la cual se emplea clínicamente.

Para las rifamicinas B y SV se han reportado diversos estudios que ponen de manifiesto la capacidad de las rifamicinas para interactuar con otras moléculas.

Rifamicina B. Rifamicina que posee, en la posición 4; un ácido carboxílico. Existe como un ácido dibásico con  $pK_a$ 's de aproximadamente 2.8 y 6.7 [Sensi *et al.*, 1959-1960]. A pH 7.0 la rifamicina B es un compuesto aniónico y ha sido mostrado que se asocia y resuelve enantioselectivamente diversos amino alcoholes quirales [Armstrong *et al.*, 1994a] incluyendo terbutalina, isoproterenol, bametan, metaproterenol, sinefrina, metanefrina, salbutamol, epinefrina, norfenilefrina, efredina,  $\psi$ -efredina, octopamina, norepinefrina, normetanefrina, metopropol, alprenonol, atenonol y oxprenonol.

La rifamicina B resuelve mejor amino alcoholes con un sustituyente hidroxilo en la posición  $\alpha$  y mejor aminas secundarias que aminas primarias. Atribuyen la formación de complejos y reconocimiento quiral a interacciones múltiples, de las cuales las interacciones carga-carga, enlace de hidrógeno e inclusión hidrofóbica dominan muy probablemente en disolventes aguaorgánicos. Armstrong *et al.* [1994b] emplearon también la rifamicina B para resolver mezclas racémicas de idazoxan, coumafurilo y laudanosina.



**Figura 2.24.** Estructura básica y transformaciones entre las principales rifamicinas.

Rifamicina SV. Es un poderoso inhibidor de la síntesis del ARN [Wehrli y Staehelin, 1971]. La actividad antitumoral de la rifamicina SV puede deberse a su habilidad para quelatar iones metálicos en disolución y de esta forma decrece su disponibilidad para actuar como coenzima de la ARN polimerasa [Wu y Goldthwait, 1969; Scrutton *et al.*, 1971]. Basosi *et al.* [1987] estudiaron la formación de un complejo de la rifamicina SV con  $\text{Cu}^{2+}$  por resonancia de espín electrónico, a través de una

aproximación de dos pasos, basada en la generación de un radical libre y en complejación metálica en disolución.

### A. Antecedentes de la rifampicina

La rifampicina es un antibiótico semisintético de la familia de las rifamicinas, efectivo oralmente contra la tuberculosis y otras infecciones bacteriales, la cual ha sido estudiada extensivamente por sus propiedades biológicas [Maggi *et al.*, 1965b]. La rifampicina se obtiene por condensación de 1-amino-4-metilpiperazina con la 3-formilrifamicina SV en tetrahidrofurano libre de peróxido a 10–15°C [Maggi *et al.*, 1966]. La 3-formilrifampicina SV [Maggi *et al.*, 1967] fue obtenida de la rifampicina B, el producto de fermentación [Sensi *et al.*, 1959, 1959-1960] por el procedimiento químico indicado en las Figuras 2.24 y 2.25 También puede obtenerse por reacción de la rifamicina S con formaldehído, *ter*-butilamina y MnO<sub>2</sub> y condensando con 1-amino-4-metilpiperazina [U.S., 1970] (Figura 2.25).

La rifampicina es designada por las reglas de IUPAC como 2,7-(epoxipentadeca[1,11,13]trienimino)nafto[2,1-b]furan-1,11(2H)-diona,5,6,9,17,19,21-hexahidroxi-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-hetametil-8-[N-(4-metil-1-piperazinil)formidoil]-21-acetato. Sin embargo, en la literatura se le conoce preferentemente como 3-[[[(4-metil-1-piperazinil)imino]metil]rifamicina SV [Oppolzer *et al.*, 1964; Prelog, 1963; Leitich *et al.*, 1964]. Su peso molecular es de 822.95 gr/mol y su estructura desarrollada se muestra en la Figura 2.26.

### B. Características y propiedades de la rifampicina

Estereoisomerismo potencial. Aún cuando la rifampicina contiene nueve átomos de carbono asimétricos y tres dobles enlaces, se encuentra sólo como un isómero debido a que todos sus centros isomerogénicos pertenecen a la parte natural de la molécula y sólo un isómero es específicamente producido por el microorganismo [Brufani *et al.*, 1964; Leitich *et al.*, 1964].

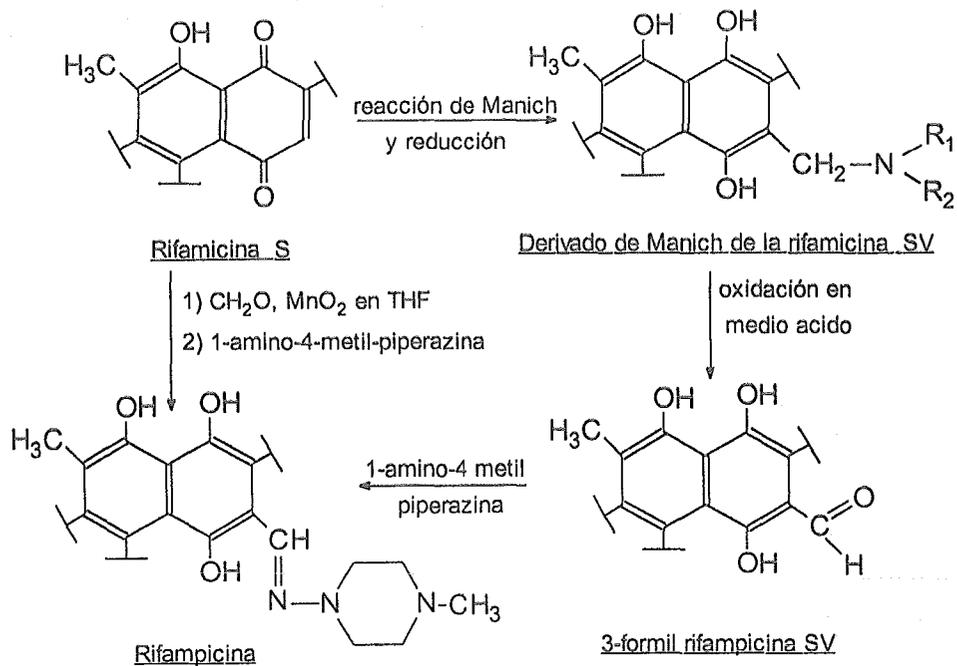


Figura 2.25. Síntesis de la rifampicina.

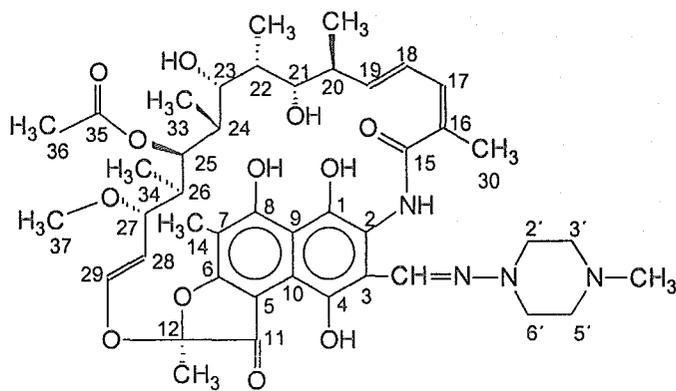


Figura 2.26. Estructura de la rifampicina. Numeración de protones de acuerdo a Gallo y Radaelli [1976].

Apariencia, color y olor. La rifampicina es un polvo rojo-naranja, cristalino sin olor [Gallo y Radaelli, 1976].

Espectro ultravioleta-visible. La espectrofotometría UV-VIS ha sido empleada para la determinación estructural de varias rifamicinas y para obtener información específica de la parte cromofórica de la molécula [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí]. El espectro UV-VIS de la rifampicina fue registrado en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 4000-A en disolución acuosa en una disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7.38, exhibiendo los siguientes máximos de absorción:  $\lambda = 237 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 33,200$ ),  $\lambda = 255 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 32,100$ ),  $\lambda = 334 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 27,000$ ) y  $\lambda = 475 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 15,400$ ) [Maggi *et al.*, 1966]. La variación del espectro UV-VIS de la rifampicina con el pH, indica la presencia de una función ionizable, asignada al grupo hidroxilo en la posición 8 [Pasqualucci *et al.*, 1969; Oppolzer, 1963; Oppolzer y Prelog, 1973].

Espectro de resonancia magnética nuclear. La espectroscopia  $^1\text{H}$ -RMN ha sido ampliamente utilizada como una herramienta fundamental para la determinación estructural de varias rifampicinas. Se ha registrado el espectro de la rifampicina en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15 NMR. Se ha reportado también su interpretación completa [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí], la cual se presenta en la Tabla 2.3.

Constantes de ionización. Las propiedades de ionización de las rifamicinas han sido empleadas en conjunto con los datos de espectrofotometría para obtener información de la parte cromofórica de la molécula y como método cuantitativo de análisis [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí].

Los valores de los  $\text{pK}_a$ 's de la rifampicina han sido determinados espectrofotométricamente y potenciométricamente en disolución, en agua y en metilcellosolve-water 4:1, (Tabla 2.4). La rifampicina existe en agua en forma zwitteriónica con un punto isoeléctrico igual a 4.8 [Maggi *et al.*, 1966; Pasqualucci *et al.*, 1969].

**Tabla 2.3.** Multiplicidad y desplazamiento químico,  $\delta$  (ppm) de las señales espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la rifampicina en  $\text{CDCl}_3$  [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí].

Protón	Multiplicidad	$\delta$	Protón	Multiplicidad	$\delta$
NH	s	11.96 <sup>b</sup>	H-23	dd	3.04
CH=N	s	8.22	H-24	ddc	1.52
CH <sub>2</sub> -2',6'	m	2.9-3.3	H-25	dd	4.96
CH <sub>2</sub> -3',5'	m	2.4-2.8	H-26	ddc	1.22
N-CH <sub>3</sub>	s	2.34	H-27	dd	3.58
OH-1, OH-8	sa	11.4-14.0 <sup>b</sup>	H-28	dd	5.0
OH-4	s	13.16 <sup>b</sup>	H-29	d	6.20
CH <sub>3</sub> -13	s	1.82	CH <sub>3</sub> -30	s	2.10
CH <sub>3</sub> -14	s	2.22	CH <sub>3</sub> -31	d	0.88
H-17, H-18	m	6.3-6.8	CH <sub>3</sub> -32	d	1.01
H-19	dd	5.92	CH <sub>3</sub> -33	d	0.58
H-20	ddc	2.26	CH <sub>3</sub> -34	d	-0.33
H-21	dd	3.78	CH <sub>3</sub> -36	s	2.06
OH-21, OH-23	sa	3.2-4.2 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> -37	s	3.05
H-22	ddc	1.70			

<sup>a</sup> s = singulete, d = doblete, dd = doble de dobles, ddc = doble de doble de cuartetos, m = multiplete, sa = señal amplia. <sup>b</sup> Se intercambia con D<sub>2</sub>O

**Tabla 2.4.** Constantes de ionización de la rifampicina [Pasqualucci *et al.*, 1969].

	pKa <sup>a</sup>	pK <sub>MCS/agua</sub> <sup>b</sup>	Asignación
protón perdido	1.7	3.6	hidroxilo en C-8
protón ganado	7.9	6.7	piperazina N-4

<sup>a</sup> pK determinado en agua. <sup>b</sup> pK determinado en metilcellosolve-agua 4:1.

La rifampicina se ioniza en disolventes no-acuosos, *i.e.*, en ácido acético glacial; el nitrógeno básico de la piperazina puede ser titulado con ácido perclórico [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí].

**Polarografía.** Ha sido investigado el comportamiento polarográfico de las rifamicinas a través de una onda de oxidación o reducción a aproximadamente 0 volts vs SCE para el sistema hidroquinona o quinona, respectivamente [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí]. Las propiedades polarográficas de las rifamicinas permiten su estudio por titulaciones amperométricas [Gallo *et al.*, 1962].

La rifampicina en una disolución amortiguadora metanol-acetato, pH 5.9, muestra una onda de oxidación con  $E^{1/2} = +0.10$  volts vs SCE (saturated calomel electrode, electrodo de calomel saturado), atribuido al sistema hidroquinona [Maggi *et al.*, 1966], y en disolución amortiguadora acuosa de fosfatos, pH 6.88, hay también una

onda de reducción con  $E^{1/2} = -1.66$  volts vs SCE, no asignada [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí]. También se ha reportado [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí] un potencial de oxidación de  $E^{1/2} = +0.06$  volts vs SCE, sin más detalles.

Rotación óptica. La rotación óptica reportada [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí] para la rifampicina es:  $[\alpha]_D^{25} = +10.6^\circ$  (C = 0.5 % in  $\text{CDCl}_3$ ).

Difracción de rayos-X. La estructura tridimensional de la rifampicina pentahidratada ha sido resuelta por análisis cristalográfico de rayos-X [Gadret *et al.*, 1975]. Los datos del cristal son: grupo espacial  $P2_12_12_1$ ,  $Z = 4$ ;  $a = 17.508$ ,  $b = 19.943$ ,  $c = 13.896$  Å. La estructura fue determinada por métodos directos con el programa *MULTAN*. Las cinco moléculas de agua de cristalización forman una red de enlaces de hidrógeno, los cuales son responsables de la cohesión cristalina.

Solubilidad. La rifampicina es muy soluble en cloroformo, soluble en agua ácida y alcalina [Maggi *et al.*, 1966], etanol, dimetilformamida y dimetilsulfóxido; ligeramente soluble en etanol al 95% y acetona; muy poco soluble en benceno y prácticamente insoluble en tetracloruro de carbono, *n*-hexano, ciclohexano, *n*-butanol, propilenglicol y glicerol [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí].

Estabilidad en disolución. La estabilidad de la rifampicina en disolución acuosa ha sido ampliamente investigada. Al igual que otras rifamicinas, la rifampicina sufre desacetilación con tratamiento alcalino para dar el correspondiente 25-desacetil derivado sin pérdida substancial de la actividad bacterial [Maggi *et al.*, 1968a].

En disoluciones acuosas alcalinas suaves (pH 8.2) y en la presencia de oxígeno atmosférico a temperatura ambiente (20-22°C), la rifampicina se transforma en rifampicina quinónica; esta oxidación puede ser evitada por la adición de ascorbato de sodio. Bajo las mismas condiciones y a 60-70°C, la rifampicina da tres productos principales de transformación, los cuales fueron identificados como 25-desacetil-rifampicina, 25-desacetil-23-acetil-rifampicina y 25-desacetil-21-acetil-rifampicina [Maggi *et al.*, 1968b].

También se ha estudiado la estabilidad de la rifampicina a 25°C en disoluciones acuosas a diferentes pH's [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí]. Se ha encontrado que la rifampicina se descompone rápidamente en condiciones ácidas o

alcalinas, pero lentamente en disoluciones neutras y que la 3-formilrifamicina SV es el principal producto de descomposición de la rifampicina en disolución acuosa ácida.

Determinación fluorométrica. Las rifamicinas no exhiben fluorescencia natural [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí]. Sin embargo, la rifampicina ha sido estudiada fluorométricamente transformándola con peróxido de hidrógeno en un producto fluorescente [Finkel *et al.*, 1971]. El máximo de fluorescencia de este producto se presenta a 480 nm en una disolución amortiguadora carbonato-bicarbonato acuoso a pH 9.2 y una longitud de onda de excitación de 370 nm.

Formación de complejos. Las rifamicinas forman complejos con iones metálicos [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí; Leibfritz, 1974]. La rifampicina en disolución metanólica forma un complejo rojo cuando es tratada con una disolución acuosa de  $\text{AlCl}_3$  en la proporción 2:1, con una constante de inestabilidad en  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (1:1) de  $3.42 \times 10^8$  [Barza, 1973]. La rifampicina también forma complejos con  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Fe}^{+++}$  [Barza, 1972] y con quinonas halogenadas por transferencia de carga [Galal *et al.*, 1992]. Las rifamicinas forman [Barza, 1972] complejos con el Pt, resultando en agentes antibióticos muy útiles; preparan los complejos con Pt por tratamiento de las rifamicinas con  $\text{M}_2\text{PtCl}_n$  ( $\text{M} = \text{Na}, \text{K}; n = 4, 6$ ) bajo condiciones alcalinas [Kono, 1989]. Salvadori *et al.* [1984] han estudiado los efectos Cotton de la transición f-f del  $\text{Yb}^{3+}$  en el cercano-IR para probar la interacción entre la rifampicina y el  $\text{Ca}^{2+}$ , ion fisiológicamente importante. Leibfritz [1974], estudió por espectroscopia RMN de  $^{13}\text{C}$ , los complejos de la rifamicina S con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . Recientemente, Kumar y Chatterji [1990] y Kumar *et al.* [1992] encontraron que la rifampicina forma un complejo 1:1 con la ARN polimerasa.

Enlace con proteínas. Ha sido ampliamente estudiado el enlace de la rifampicina a proteínas del suero sanguíneo y plasma. Los datos obtenidos cubren una gama relativamente grande, probablemente debido a las diferentes metodologías empleadas y los diversos parámetros que influyen el fenómeno [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí; Calvori *et al.*, 1965; Buss *et al.*, 1978]. Lachau *et al.* [1992] desarrollaron un método espectroscópico de primera derivada para la determinación simultánea de rifampicina enlazada y no enlazada en disoluciones de suero humano y

suero de albúmina sin ninguna separación física. En la disolución de suero de albúmina las fracciones de rifampicina enlazada y no-enlazada fueron determinadas a 473.5 y 475.8 nm, respectivamente, mientras que para el suero humano, la fracción no-enlazada fue determinada a 479.4 nm.

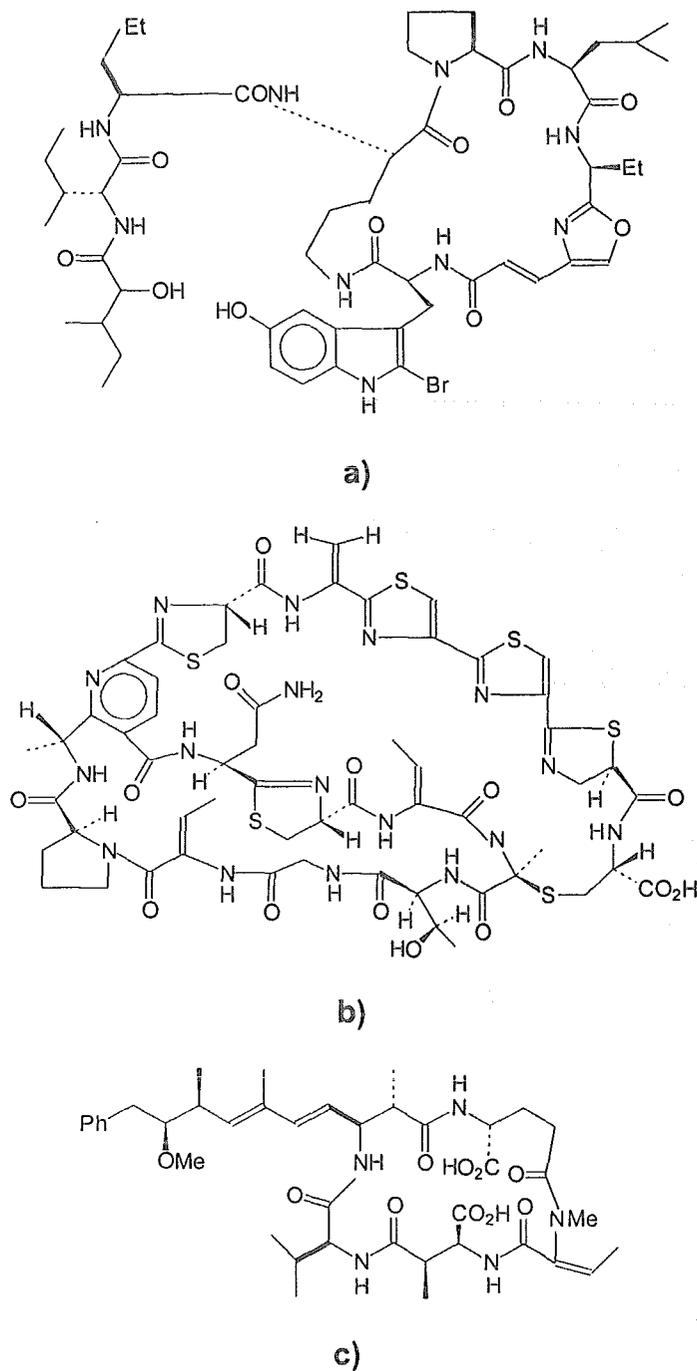
Oxidación de la rifampicina. La oxidación de la rifampicina de la forma naftohidroquinona a la forma naftoquinona ocurre con  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{FeCl}_3$  [Barza, 1972]. Pasqualucci *et al.* [1970] emplearon un método espectrofotométrico diferencial para la determinación de la rifampicina, rifamicina B, rifamida y rifamicina SV, basado en la oxidación de la parte hidroquinónica de las rifamicinas con  $\text{NaNO}_2$  al 1 %. Buss *et al.* [1977] encontraron que los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{3+}$ , pero no  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ó  $\text{Zn}^{2+}$  catalizan la oxidación de la rifampicina. La reacción es dependiente del pH y ocurre más rápidamente a pH neutro o básico que a pH ácido. El  $\text{Mn}^{2+}$  cataliza más efectivamente la oxidación seguido por el  $\text{Cu}^{2+}$  y finalmente  $\text{Co}^{3+}$ . La oxidación completa ocurre a concentraciones del ion metálico por abajo de los valores estequiométricos. Sus estudios de velocidades iniciales les sugieren un mecanismo de oxidación complejo.

#### 2.2.2.5 Otros macrociclos naturales

En este grupo de compuestos se pueden mostrar como ejemplos algunos alcaloides macrociclos que incluyen unidades de oxazol y tiazol así como péptidos cíclicos.

La keramamida B (Figura 2.27a), es un péptido con unidades de oxazol obtenido de una esponja marina de la especie *Theonella*, su estructura fue determinada por RMN  $^{13}\text{C}$  y por espectrometría de masas. La ciclotiazomicina (Figura 2.27b) es un macrólido producido por especies *Streptomyces* NR 0516, contiene seis anillos de tiazol en un arreglo único. Su estructura fue determinada por hidrólisis ácida e identificación de los aminoácidos producidos, seguido de extensivos experimentos de RMN para establecer la conectividad entre los fragmentos. La Figura 2.27c, presenta

también la estructura de un pentapéptido cíclico (Mutuporin) que se encuentra en algas de agua fresca [Lewis, 1994; y referencias citadas allí].



**Figura 2.27.** Estructuras de **a)** keramamida B, **b)** ciclotiazomicina y **c)** Mutuporin, un pentapéptido cíclico, compuestos macrocíclicos naturales.

### 2.2.3 Macrociclos sintéticos como anfitriones

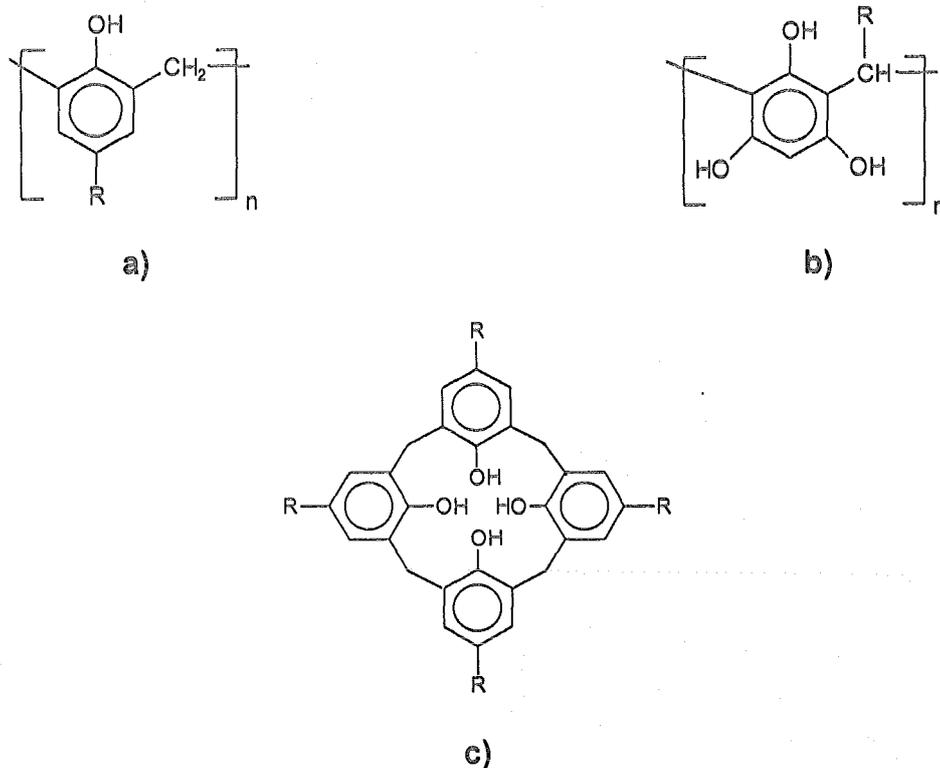
Desde 1960 un gran número de macrociclos sintéticos han sido preparados y esto ha resultado en un interés aumentado en todos los aspectos de la química de sistemas macrocíclicos. Ha crecido el interés en estudiar el papel de iones metálicos en sistemas biológicos y muchos estudios bioinorgánicos han involucrado complejos de macrociclos naturales y sintéticos [Lindoy, 1989 y referencias citadas allí].

Una considerable cantidad de investigación sobre macrociclos sintéticos se ha dirigido hacia la preparación de compuestos modelo de macrociclos naturales [Lindoy, 1989]. Entre los macrociclos sintéticos más importantes se encuentra el grupo de los calixarenos y de los ciclofanos. A continuación se resumen algunas características de los calixarenos y de sus principales propiedades de inclusión. Se describe más ampliamente las moléculas del tipo ciclofánico, por ser este el tipo de moléculas estudiadas en este trabajo de investigación.

#### 2.2.3.1 Los calixarenos como anfitriones

##### A. Naturaleza de los calixarenos

El nombre de calixarenos fue introducido por Gutsche [1989] para oligómeros cíclicos obtenidos de la condensación de formaldehído con *para*-alquilfenoles bajo condiciones alcalinas [Gutsche, 1989; Vicens y Böhmer, 1991]. Son un tipo de macrociclos fenólicos más generalmente llamado calix[n]arenos que consisten de cuatro o más unidades fenólicas puenteadas por espaciadores metilénicos (Figura 2.28). Los calixarenos poseen una cavidad rica en electrones y un borde inferior que consiste de un arreglo cíclico de donadores de oxígeno, por lo que los calixarenos son más convenientes para la complejación de cationes que para el enlace de aniones y moléculas neutras [Atwood *et al.*, 1996].



**Figura 2.28.** Estructuras generalizadas de los **a)** calix[n]arenos de fenol ( $n = 4-8$ ), grupos hidróxido en posición endo, **b)** resorc[n]arenos, grupos hidróxido en posición exo y **c)** estructura generalizada del calix[4]areno.

Los calixarenos pueden adoptar una variedad de conformaciones, las cuales resultan de rotaciones más o menos libres alrededor de los enlaces  $\sigma$  de los grupos  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ . Se ha determinado que los parámetros de activación para la inversión del anillo del calix[4]areno están manejados por términos entálpicos. Los calixarenos adoptan una conformación de cono, la cual es establecida por interacciones de enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo. Esto afecta las propiedades de disociación ácida de los hidroxilos. Así, la disociación del primer protón ocurre a valores de pH sorprendentemente bajos (1.8–2.9) correspondientes a un desplazamiento de 8 unidades de  $\text{pK}_a$  relativo al fenol, mientras que los  $\text{pK}_{a2}-\text{pK}_{a4}$  aparecen a valores normales de pH o en regiones más altas de pH que el fenol [Böhmer, 1995; Shinkai, 1993 y referencias citadas allí].

La modificación química de los calixarenos no sólo permite la síntesis de nuevas moléculas anfitrión por la introducción de grupos funcionales adicionales, sino que también controla la conformación de los calixarenos e impide la inversión configuracional. Los calixarenos pueden ser convertidos en derivados asimétricos por la introducción de sustituyentes quirales. En el caso de calixarenos derivados de fenoles esto puede hacerse en los grupos hidroxilo fenólicos o en las posiciones *para* [Böhmer, 1995].



QUIMICA  
D.E.P.G.

## B. Complejos de inclusión de los calixarenos

Gustche [1988] han encontrado que calixarenos solubles en agua pueden formar una variedad de complejos con anfitriones orgánicos en agua. También se ha encontrado que los ésteres calixarílicos muestran una alta afinidad por iones metálicos alcalinos [Shinkai, 1993 y referencias citadas allí].

Los derivados de los calixarenos solubles en agua como los ácidos *para*-sulfónicos complejan iones amonio, debido principalmente a la interacción electrostática con el anion calixareno. Los ligandos neutros tales como los éteres alquílicos pueden funcionar como bases  $\pi$  y complejar iones tetra-alquilamonio en disolventes orgánicos [Böhmer, 1995 y referencias citadas allí].

La inclusión de moléculas huésped orgánicas en calixarenos solubles en agua puede surgir debido a la acción de fuerzas hidrofóbicas y en algunos casos se ha observado la selectividad del huésped en base al tamaño de la cavidad. Sin embargo, el enlace del huésped a la cavidad del calixareno no ocurre selectivamente debido a su flexibilidad e isomerismo conformacional [Shinkai, 1993 y referencias citadas allí].

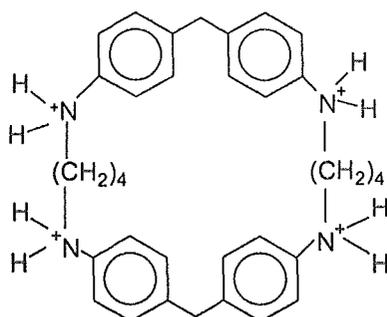
El estudio de la complejación de aniones por calixarenos es limitado. Se ha reportado que una sulfonamida de calix[4]areno enlaza aniones por enlaces de hidrógeno, una notable selectividad ( $10^2$ ) fue encontrada en  $\text{CDCl}_3$  para el  $\text{HSO}_4^-$  (con una constante de asociación de  $10^5 \text{ L mol}^{-1}$ ) con respecto al  $\text{Cl}^-$  ó  $\text{NO}_3^-$  [Böhmer, 1995].

El estudio de la complejación de moléculas neutras por calixarenos es también limitado. Se ha descrito la complejación no específica de hidrocarburos aromáticos (causado por interacciones hidrofóbicas) para varios calixarenos solubles en agua con cierta selectividad y dependiendo del tamaño del anillo. Se han empleado algunos derivados de resorcarenos (ver Figura 2.28b) como moléculas anfitrión y se ha encontrado que en disolventes no polares tales como  $\text{CHCl}_3$  enlazan un número grande de moléculas huésped que tienen grupos hidroxilo en su estructura, donde la interacción predominante ocurre a través de enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno involucran dos grupos hidroxilo vecinos del calixareno y un grupo hidroxilo del huésped. Se han empleado como moléculas huésped de los resorcarenos ácidos carboxílicos, los cuales pueden ser diferenciados por su tamaño y los dioles por el arreglo estereoquímico de los grupos hidroxilo [Böhmer, 1995].

### **2.2.3.2 Los ciclofanos como anfitriones**

#### **A. Naturaleza de los ciclofanos**

Los ciclofanos (Figura 2.29) se caracterizan por sus anillos aromáticos, los cuales en principio pueden actuar como unidades estructurales rígidas, como sitios de enlace hidrofóbico y/o van der Waals y como donadores o aceptores de tipo  $\pi$ . Los anillos aromáticos, le confieren a las cavidades de inclusión una estructura bien definida y suficiente profundidad. Los ciclofanos pueden emplearse en disolventes orgánicos como anfitriones de inclusión para huéspedes orgánicos, (a través de interacciones de van der Waals y/o transferencia de carga) o iones metálicos (coordinación  $\pi$ ). Pueden solubilizarse en agua (por medio de la incorporación de sustituyentes hidrofóbicos apropiados) o pueden emplearse en agua como anfitriones de inclusión para huéspedes hidrofóbicos [Odashima y Koga, 1983].



**Figura 2.29.** Estructura típica de una molécula de ciclofano.

Al ser los ciclofanos anfitriones completamente sintéticos están sujetos a una amplia modificación estructural. Esta versatilidad es importante ya que los anfitriones pueden ser diseñados y sintetizados arbitrariamente. Como resultado es posible estudiar sistemáticamente detalles de las interacciones anfitrión-huésped y desarrollar anfitriones que formen complejos selectivos con huéspedes de interés particular.

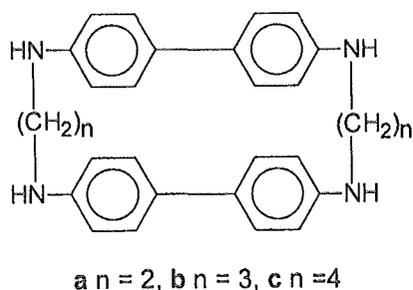
Por definición, cualquier anfitrión macrocíclico que posea anillos aromáticos se denomina ciclofano, en los cuales los anillos aromáticos son (o intentan ser) los principales sitios de enlace [Odashima y Koga, 1983].

## **B. Estudios preliminares de los ciclofanos**

En los años 50 considerable atención se enfocó al estudio de las propiedades físicas y químicas de ciclofanos pequeños. Fue también durante ese periodo que ciclofanos grandes (con estructura establecida) fueron empleados por primera vez como anfitriones de inclusión para huéspedes orgánicos.

Stetter y Roos [1955] sintetizaron una serie de paraciclofanos (Figura 2.30) conteniendo dos esqueletos de bencidina puenteados por dos cadenas alquílicas. En su artículo describen la formación de complejos cristalinos 1:1 con benceno y dioxano cuando los macrociclos (Figuras 2.30b y 2.30c) fueron recrystalizados de estos disolventes. Hasta 1982, se pensó que estos complejos eran de inclusión dentro de la cavidad. Sin embargo, en ese tiempo Hilgenfeld y Saenger [1982] mostraron por cristalografía de rayos X que el macrociclo más grande (Figura 2.30c) y el benceno no

forman un complejo de inclusión intramolecular sino más bien un clatrato en el cual el benceno está acomodado entre las moléculas anfitrión en la red cristalina.



**Figura 2.30.** Estructura de los paraciclofanos de Stetter y Ross [1955].

En los años 70's, los grupos de investigación de Tabushi [Tabushi y Kuroda, 1983; Tabushi y Yamamura 1983; Tabushi *et al.*, 1972, 1976, 1984], Murakami [Murakami 1983, 1984; Murakami *et al.*, 1974, 1987] y Koga [Odashima *et al.*, 1980a, 1980b, 1981, 1985; Odashima y Koga, 1981, 1983; Kawakami *et al.*, 1985; Lai *et al.*, 1985; Soga *et al.* 1980] en Japón y de Whitlock [Jarvi y Whitlock 1980, 1982; Whitlock *et al.*, 1981; Adams y Whitlock, 1982; Miller y Whitlock, 1984] en los Estados Unidos comenzaron el desarrollo de ciclofanos solubles en agua y analizaron su habilidad para actuar como anfitriones en disoluciones acuosas. Entre estos estudios el trabajo de Koga *et al.* representa la contribución más importante.

Por reemplazamiento de unidades de bencidina como paredes aromáticas que rodean la cavidad por unidades de 4,4'-diaminodifenilmetano, Koga y colaboradores [Odashima *et al.*, 1980a, 1980b, 1981, Soga *et al.*, 1980, Odashima y Koga, 1981] obtuvieron una nueva serie de tetraazaciclofanos macrocíclicos (Figura 2.29). Sus anfitriones fueron solubles en agua en su forma protonada y en disolución ácida. La complejación anfitrión-huésped con huéspedes apolares fue estudiada por espectroscopia RMN y fluorescencia. Obtuvieron un complejo cristalino de estequiometría 1:1 de un tetraazaciclofano con dureno como huésped. El complejo de inclusión fue preparado en disolución acuosa y demostraron la inclusión del dureno dentro de la cavidad molecular por análisis de la estructura cristalina [Odashima *et al.*, 1980a]. Subsecuentemente, Koga y colaboradores, por variación de los puentes entre

las unidades de difenilmetano y por variación de los espaciadores aromáticos, prepararon otros tetraazaparaciclofanos y estudiaron su complejación con huéspedes aromáticos especialmente aquellos con residuos aniónicos en disolución acuosa [Soga *et al.*, 1980; Odashima *et al.*, 1985; Kawakami *et al.*, 1985; Odashima y Koga, 1983].

### C. Complejos de inclusión de los ciclofanos y naturaleza del proceso de inclusión

Diederich y Dick [1984] diseñaron y sintetizaron anfitriones macrocíclicos del tipo ciclofano solubles en agua a temperatura ambiente y a pH neutro. Las cavidades de sus anfitriones debían estar bien definidas en tamaño y forma y ser de muy alta hidrofobicidad. Emplearon también las unidades de difenilmetano y para lograr la solubilización en agua de sus huéspedes introdujeron iones amonio, pero localizados en la parte más alejada de la cavidad para no interrumpir el carácter hidrofóbico de la cavidad. De esta forma introdujeron los iones amonio como anillos espiropiperidinium (Figura 2.31). Así, las unidades de difenilmetano de sus huéspedes estaban puenteadas por cadenas de  $\alpha,\omega$ -dioxaalcanos, la variación en la longitud de las cadenas les permitió el diseño de cavidades de tamaño variable, dependiendo del huésped a ser acomplejado. Por espectroscopia de fluorescencia encontraron que su anfitrión más grande forma un complejo 1:1 con 6-[(4-metilfenil)-amino]-2-naftalensulfonato (TNS) con una constante  $K_a = 4.3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ .

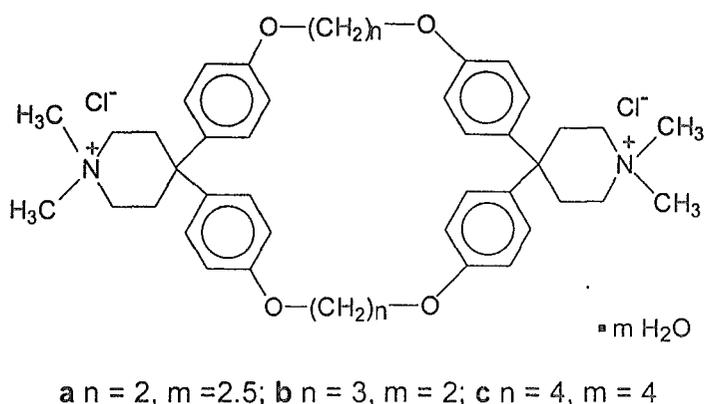


Figura 2.31. Primer macrociclo ciclofánico de Diederich y Dick [1984].

Para fortalecer el enlace con huéspedes apolares, Diederich y Dick [1984] sintetizaron un anfitrión con dos anillos de espiropiperidinium adicionales unidos a las cadenas alifáticas que puentean las unidades de difenilmetano introdujeron también ocho metilenos más para aumentar el carácter hidrofóbico de la cavidad e incrementar el enlace de huéspedes apolares (Figura 2.32). Encontraron que este anfitrión forma complejos de estequiometría 1:1 con arenos neutros y con huéspedes aromáticos con residuos aniónicos (sulfonato). Indican que las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals son las responsables de la fuerte complejación de su anfitrión con arenos neutros (por ejemplo, la constante obtenida con perileno es de  $1.6 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ ) y que con huéspedes aniónicos las fuerzas atractivas son de naturaleza apolar y electrostática [Diederich y Griebel, 1984].

En 1986, Diederich, Dick y Griebel diseñaron y sintetizaron nuevos anfitriones ciclofánicos, en los cuales para lograr una encapsulación más eficiente y una complejación más fuerte de arenos más grandes decidieron introducir una tercer unidad de difenilmetano dentro de su molécula anfitrión anterior para crear así un anfitrión más esférico (Figura 2.33). Estos autores presentaron un estudio extensivo del enlace entre arenos neutros y sus anfitriones ciclofánicos sintéticos en disolventes orgánicos de diferente polaridad. Discuten las constantes de asociación obtenidas en diferentes disolventes en términos de la contribución de las interacciones atractivas de van der Waals entre el anfitrión y huésped en el complejo y en términos de la contribuciones de los procesos de solvatación-desolvatación.

Ferguson *et al.* [1989, 1991], sintetizaron dos nuevos tetraoxaciclofanos con ocho grupos metoxi *orto* a los éteres arílicos (Figura 2.34). Una comparación entre los diferentes ciclofanos les mostró que los grupos funcionales unidos a los anillos aromáticos incrementan la fuerza de enlace si ellos hacen más profunda la cavidad sin perturbar el carácter apolar del sitio de enlace.

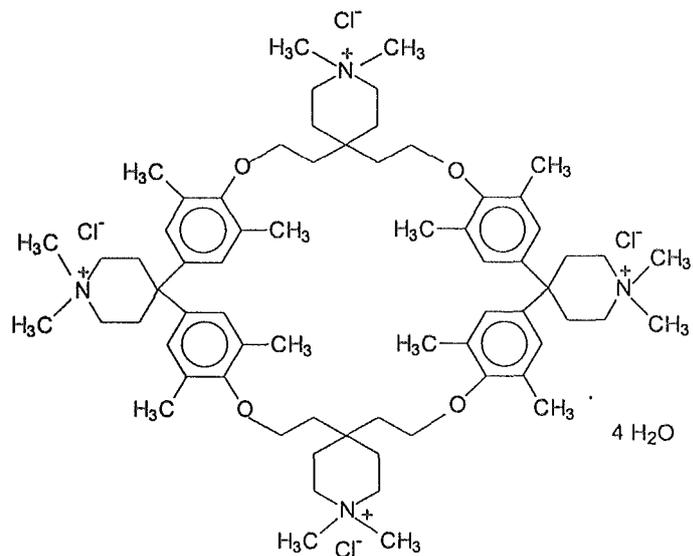


Figura 2.32. Anftrión macrocíclico modificado de Diederich y Dick [1984].

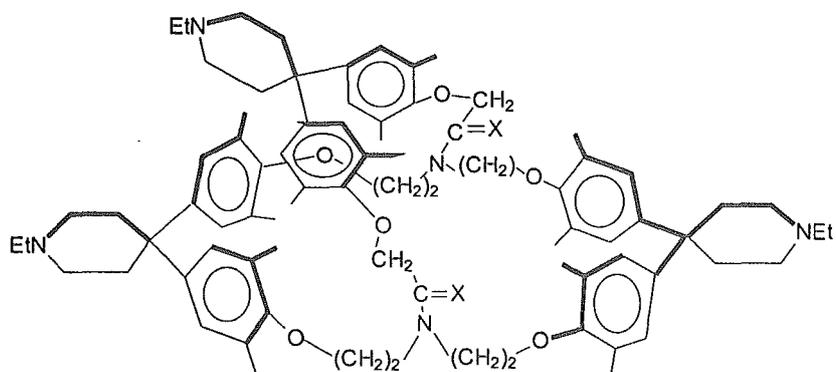


Figura 2.33. Anftrión macrocíclico de Diederich, Dick y Griebel [1986].

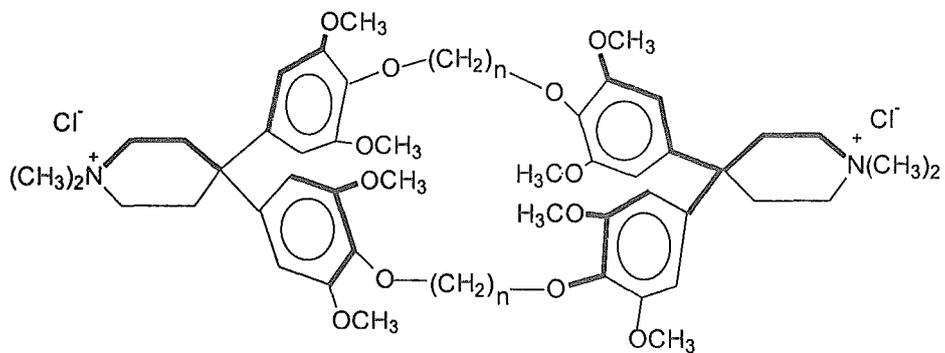


Figura 2.34. Tetraoxaciclofano de Ferguson *et al.* [1989, 1991].

Ferguson *et al.* [1989, 1991], encontraron que sus ciclofanos sintéticos forman complejos altamente estructurados con sustratos aromáticos en disoluciones acuosas y orgánicas. Indican que los procesos de solvatación-desolvatación son reconocidos como factores centrales que determinan la estabilidad de estos complejos. Señalan que la fuerza responsable de la complejación es mucho mayor en disoluciones acuosas que en disolventes orgánicos. Suponen que en disoluciones acuosas la fuerza responsable de la complejación es el efecto hidrofóbico entálpico, el cual se discute en términos de un incremento de las interacciones cohesivas entre las moléculas de agua e interacciones de dispersión atractivas después de la complejación. Los estudios de enlace en una serie de disolventes orgánicos que cubren un amplio intervalo de polaridades les indicó que la fuerza de la complejación es altamente dependiente del disolvente. Discuten la estabilidad de los complejos en términos de la habilidad del disolvente para competir eficazmente con el huésped por la cavidad de enlace.

Si se comparan las constantes de enlace de algunos huéspedes comunes como los aniones del ácido 8-anilinaftaleno sulfónico (ANS) y del ácido benzoico (AB) con algunos ciclofanos y la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) se tiene:  $64 \text{ M}^{-1}$  [Frank *et al.*, 1985] y  $65 \pm 7 \text{ M}^{-1}$  [Schneider *et al.*, 1991] para el caso de la inclusión de ANS en la  $\beta$ -CD y  $\approx 10^2$  y  $\approx 10^6 \text{ M}^{-1}$  [Izatt *et al.*, 1991] para la inclusión de ANS en los ciclofanos mostrados en la Tabla 2.5, líneas 1 y 2 (ver más adelante). Mientras que la inclusión de AB en  $\beta$ -CD es  $4.4 \text{ M}^{-1}$  [Szejtli, 1988] y  $36.2 \pm 0.4 \text{ M}^{-1}$  [Gelb y Schwatz, 1989] y la inclusión de AB en el ciclofano mostrado en la línea 4 de la Tabla 2.5 es  $665 \text{ M}^{-1}$  [Schneider *et al.*, 1989b]. Los valores presentados muestran una mayor capacidad de los ciclofanos para la inclusión de algunos huéspedes aniónicos.

### 2.3 Reconocimiento de sustratos aniónicos

En vista del papel fundamental que juegan los aniones en la química al igual que en los procesos biológicos, el enlace de aniones por ligandos orgánicos puede esperarse que provea una multitud de estructuras nuevas con propiedades de amplia

importancia [Lehn, 1985]. Sólo en años recientes la química de coordinación de aniones se ha desarrollado como una nueva área de la química de coordinación [Graf y Lehn 1976; Lehn, 1978; Bianchi *et al.*, 1991; Atwood *et al.*, 1996, Fabbrizzi *et al.*, 1996; Hawthorne *et al.*, 1994]. Esto surgió del diseño de receptores catiónicos de diversos tipos, especialmente policationes macrocíclicos y macropolicíclicos capaces de formar complejos fuertes y selectivos con aniones y con grupos funcionales cargados negativamente (como carboxilatos y fosfatos) de sustratos orgánicos o biológicos. La fuerza de enlace y la selectividad de los receptores esta dada por los sitios de interacción deficientes electrónicamente (como los cationes de poliamonio) dispuestos convenientemente alrededor de una cavidad intramolecular de forma y tamaño adaptado a los sustratos aniónicos a los que se enlazan [Graf y Lehn, 1976; Dietrich *et al.*, 1981, 1984; Park y Simmons, 1968].

Los macrociclos de poliamonio de varios tamaños actúan como receptores aniónicos hacia policarboxilatos orgánicos, exhibiendo estabilidades y selectividades que resultan de efectos electrostáticos y estructurales [Dietrich *et al.*, 1981; Bianchi *et al.*, 1991; Bencini *et al.*, 1992].

La Tabla 2.5 presenta como ejemplo las constantes de asociación de algunos macrociclos del tipo ciclofánico con huéspedes aniónicos empleados en esta tesis.

**Tabla 2.5.** Constantes de asociación de algunos anfitriones macrocíclicos del tipo ciclofánico con huéspedes aniónicos empleados en esta tesis.

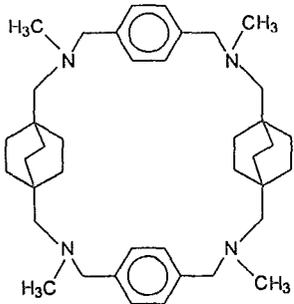
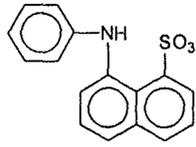
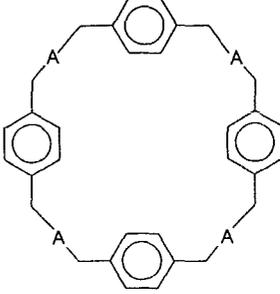
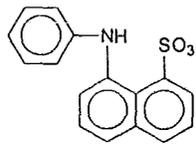
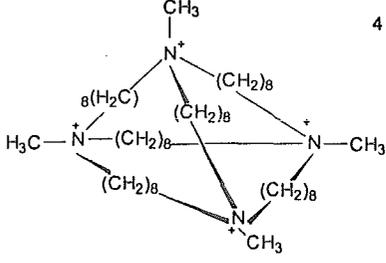
Anfitrión	Huésped	Constante de asociación $M^{-1}$
		$\approx 10^{2a}$
 <p style="text-align: center;"> <math>A = N-C(O)CH_2</math>  <math>(CH_3)_3N^+CH_2C(O)NHCHC(O)N(C_{14}H_{29})_2Br^-</math> </p> <p style="text-align: center;"> <math>A = N-C(O)</math>  <math>(CH_3)_3N^+CH_2C(O)NHCHCH_2C(O)N(C_{14}H_{29})_2Br^-</math> </p>		$\approx 10^{6a}$
 <p style="text-align: right;"><math>4F^-</math></p>		$2.75^b$  $8.1^b$

Tabla 2.5. (Continuación).

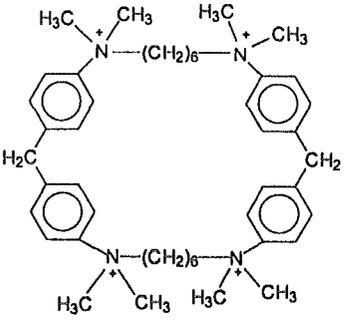
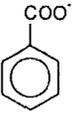
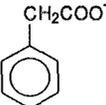
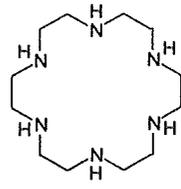
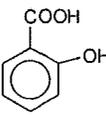
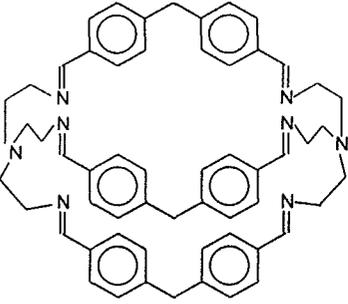
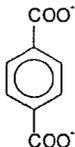
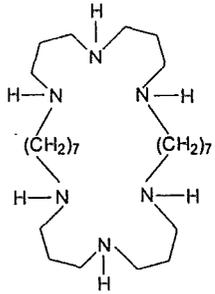
Anfitrión	Huésped	Constante de asociación $M^{-1}$
	  	<p>665<sup>c</sup></p>  <p>560<sup>c</sup></p>
		<p>470<sup>d</sup></p>
		<p><math>\approx 10^4</math><sup>e</sup></p>

Tabla 2.5. (Continuación).

Anfitrión	Huésped	Constante de asociación M <sup>-1</sup>
	<sup>-</sup> OOC <sup>-</sup> COO <sup>-</sup>	79 <sup>a</sup>
	<sup>-</sup> OOCCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	22 <sup>a</sup>
	<sup>-</sup> OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	282 <sup>a</sup>
	<sup>-</sup> OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	316 <sup>a</sup>
	<sup>-</sup> OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COO <sup>-</sup>	45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Izatt *et al.* [1991].

<sup>b</sup> Schmidtchen [1981].

<sup>c</sup> Schneider *et al.* [1989b].

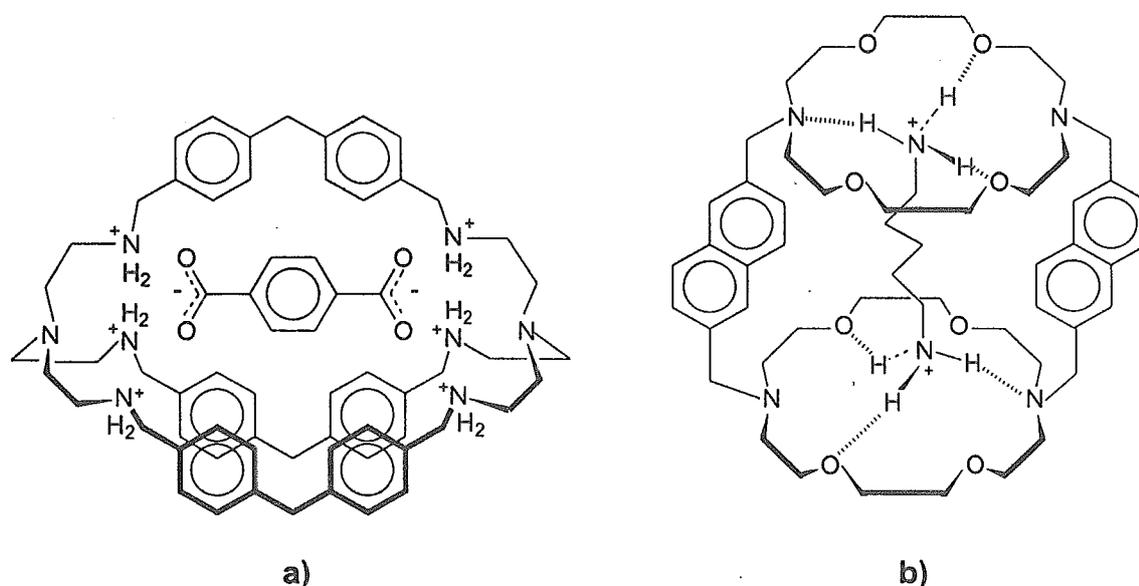
<sup>d</sup> Kimura *et al.* [1983].

<sup>e</sup> Jazwinski *et al.* [1987].

## 2.4 Receptores ditópicos

Cuando dos subunidades de enlace están localizadas en los polos de una molécula llamada receptor, la complejación de un sustrato difuncional depende de la complementariedad de la distancia entre los dos sitios de unión en el receptor y la distancia entre los dos grupos funcionales correspondientes en el sustrato [Lehn, 1973, 1983]. Tal reconocimiento lineal por receptores ditópicos ha sido alcanzado por sustratos dicatiónicos y dianiónicos, es decir, iones diamonio y dicarboxilato, respectivamente. La Figura 2.35 muestra como ejemplo la estructura de dos criptatos de los cuales se han obtenido sus estructuras cristalinas. En uno de los criptatos (Figura 2.35a) una poliamina macrobíciclica hexaprotonada forma un fuerte y selectivo

complejo con el dianion tereftalato, el cual esta fijo en la cavidad debido a la formación de tres enlaces de hidrógeno entre cada carboxilato y los iones amonio [Pascard *et al.*, 1982]. La incorporación de subunidades [18]-N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> macrocíclicas que enlazan grupos -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en estructuras macrotríclicas cilíndricas da receptores ditópicos que forman criptatos moleculares como el mostrado en la Figura 2.35b, con terminales de cationes amonio <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. En el sistema resultante el sustrato se localiza en la cavidad central y se ancla por sus dos grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en los sitios de unión macrocíclicos. En la Figura 2.35b el sustrato complementario tiene cinco unidades de metileno que separan los dos cationes amonio. Cambiando la longitud de los puentes del macrociclo central se modifica la selectividad del enlace del sustrato en favor de sustratos de estructura complementaria [Lehn *et al.*, 1991]



**Figura 2.35.** Estructuras de dos criptatos: **a)** poliamina macrobíclica hexaprotonada con el dianion tereftalato [Pascard *et al.*, 1982] y **b)** dos macrociclos unidos por unidades de naftaleno para formar un macrotríciclo con un dicación amonio como huésped [Lehn *et al.*, 1991].

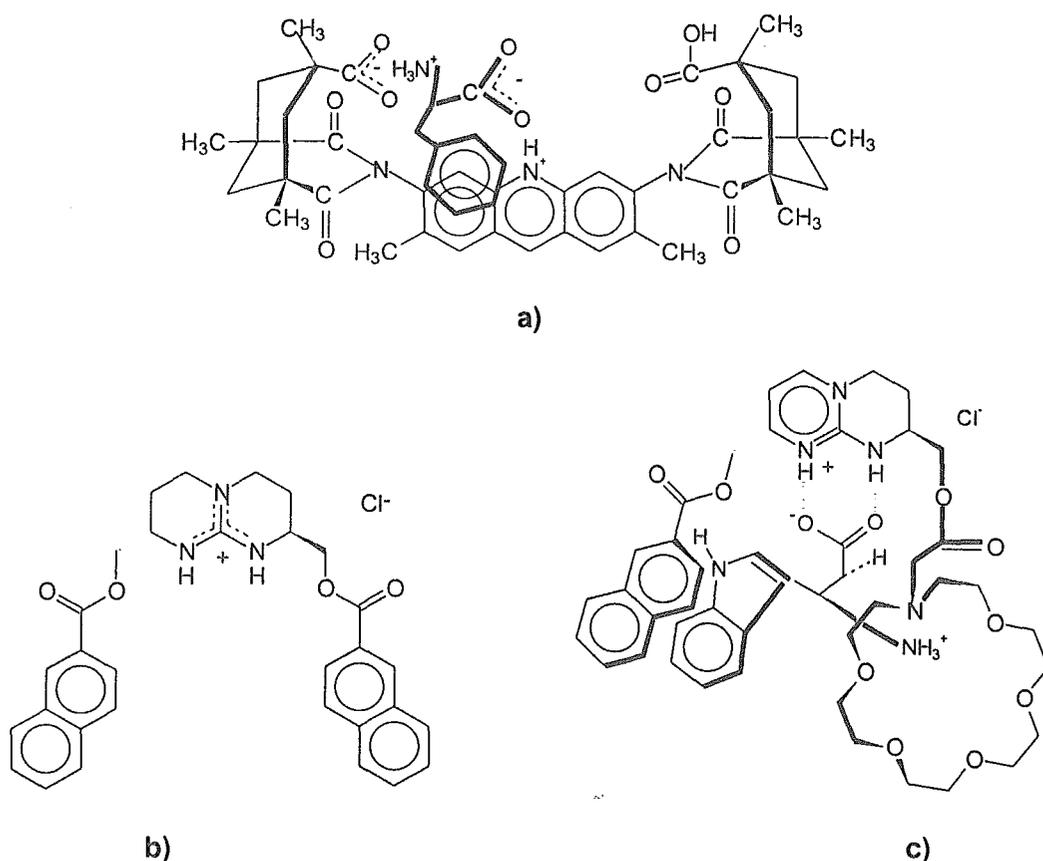
## 2.5 Discriminación de enantiómeros de aminoácidos en la complejación supramolecular

Una característica de muchos sistemas enzimáticos es su capacidad para distinguir entre enantiómeros en reacciones catalíticas. Los sitios activos de las enzimas son asimétricos y los dos enantiómeros son acomplejados diferencialmente y reaccionan a diferentes velocidades. Los complejos enzima-sustrato son diastereoméricos, poseen diferentes energías libres y tienen diferentes potencialidades para reaccionar. En la química anfitrión-huésped se emplean anfitriones ópticamente activos para separar los enantiómeros de la molécula huésped por extracción líquido-líquido [Cram y Cram, 1974].

Los  $\alpha$ -aminoácidos en forma neutra son zwitteriones (sales internas), altamente polares y en agua están muy solvatados. Los grupos amonio y carboxilato son los sitios de enlace ideales para la complejación por una molécula anfitrión estructurada apropiadamente. Los poliéteres cíclicos enlazan iones amonio, mientras que los iones carboxilato forman pares iónicos con iones amonio. Para la resolución eficaz de aminoácidos se requiere además un alto reconocimiento quiral [Cram y Cram, 1974]. La Figura 2.36 presenta como ejemplo algunos los sistemas modelo empleados para el reconocimiento de aminoácidos. El modelo de receptor de Rebek y Nemeth [1985] y Rebek *et al.* [1987] (Figura 2.36a) tiene la forma de una grieta molecular que incorpora dominios iónicos, hidrofóbicos y aromáticos, los cuales resultan convenientes para el reconocimiento de aminoácidos que soportan cadenas laterales aromáticas tales como el triptofano, fenilalanina y tirosina estos aminoácidos son extraídos de disoluciones acuosas con alta eficiencia. La Figura 2.36a muestra el complejo de la molécula de receptor de Rebek con la fenilalanina.

Mendoza y colaboradores [Echavarren *et al.*, 1989 y Galán *et al.*, 1992] diseñaron moléculas receptoras (Figuras 2.36b y 2.36c) para aminoácidos en su forma zwitteriónica. Sus moléculas receptoras involucran sitios de unión para carboxilato (función guanidinium) y iones amonio (éter corona), una superficie aromática planar (unidades de naftaleno) para una interacción de apilamiento con anillos aromáticos de

los aminoácidos y una estructura quiral (prepararon los isómeros *S,S* y *R,R*) para reconocimiento enantioselectivo. Su primer modelo no incluyó el éter corona (Figura 2.36b); sin embargo, formó complejos con *para*-nitrobenzoato y N-acetiltriptofano [Echavarren *et al.*, 1989]. Posteriormente diseñaron otra estructura modelo que incluía el éter corona (Figura 2.36c) [Galán *et al.*, 1992] su afinidad por los aminoácidos triptofano, fenilalanina y valina fue determinada por experimentos de extracción líquido-líquido. El reconocimiento quiral de su molécula modelo fue confirmado ya que el receptor *S,S* era capaz de extraer los D-enantiómeros en tanto que el receptor *R,R* era capaz de extraer sólo los L-enantiómeros. La Figura 2.36c muestra la estructura del complejo propuesto para la molécula receptor *S,S* y el L-triptofano.



**Figura 2.36.** Estructuras de algunos sistemas modelo empleados para el reconocimiento de aminoácidos **a)** molécula de Rebek y Nemeth [1985] y Rebek *et al.* [1987] con fenilalanina como huésped, **b)** y **c)** moléculas modelo de Mendoza y colaboradores [Echavarren *et al.*, 1989 y Galán *et al.*, 1992], **c)** muestra también la estructura propuesta para el complejo formado con L-triptofano.



### 3. Objetivos

De los antecedentes vemos que hay varios macrociclos naturales, muchos de los cuales están relacionados por su estructura con los ciclofanos. Ninguno de ellos actúa como anfitrión en sistemas biológicos, pero por sus características estructurales puede tener esta capacidad tal como la presentan las ciclodextrinas. Entre los posibles candidatos a mostrarla se eligieron dos moléculas: un alcaloide macrocíclico, la tubocurarina y un antibiótico, la rifampicina. La razón principal es que para estos macrociclos se conoce en forma bastante detallada sus estructuras cristalinas, su comportamiento en disolución, solubilidad, propiedades ácido-básicas, conformación, asignación de las bandas espectrales, las cuales fueron descritas en la sección 2.2.2.3.A de **Antecedentes** (Capítulo 2). Todo esto facilita el estudio planeado. Además, ambas moléculas tienen sitios quirales que pueden ser susceptibles de reconocimiento quiral. También es importante mencionar que algunos antibióticos macrocíclicos, incluyendo la rifamicina B, fueron empleados como selectores quirales, para HPLC [Armstrong *et al.*, 1994b], lo que indica una capacidad para el reconocimiento molecular entre este tipo de moléculas.

#### 3.1 Objetivos generales

1. Estudiar la capacidad de los ciclofanos naturales para incluir específicamente diferentes tipos de moléculas huésped empleando como pruebas un alcaloide macrocíclico la tubocurarina y un antibiótico macrocíclico la rifampicina.
2. Entender los factores estructurales responsables del reconocimiento molecular en los ciclofanos seleccionados.
3. Diseñar sistemas basados en la interacción huésped-anfitrión que permitan separar, por medio de mecanismos termodinámicos o cinéticos, mezclas racémicas o bien diferenciar mezclas de isómeros no ópticamente activos.

### 3.2 Objetivos específicos

#### Molécula de tubocurarina en forma dicatiónica

1. El estudio de una serie de aniones orgánicos de estructura variable como huéspedes para determinar los elementos de estructura importantes para la interacción.
2. Probar algunas moléculas quirales como huéspedes para determinar la capacidad de la tubocurarina para reconocimiento quiral.
3. Estudiar una serie de huéspedes dianiónicos de tipo general  $^-\text{OOC-R-COO}^-$  con una estructura de espaciador R sistemáticamente variable para determinar los requerimientos de complementaridad entre sitios cargados.

#### Molécula de tubocurarina en forma zwitteriónica

4. Estudiar moléculas quirales cargadas positiva, negativa o zwitteriónicamente como huéspedes de la tubocurarina en forma zwitteriónica, para determinar su capacidad de reconocimiento electrostático y grado de diferenciación quiral en cada caso.
5. Estudio de su posible actividad esterolítica gracias a la presencia de un sitio nucleofílico de fenolato.

#### Molécula de rifampicina

6. Estudio de algunos derivados de aminoácidos aniónicos y zwitteriónicos y también algunos heterociclos como huéspedes de la rifampicina, para determinar su capacidad de reconocimiento electrostático,  $\pi$ - $\pi$  y quiral.

## 4. Metodología

Por las características estructurales y propiedades de las moléculas a estudiar se consideró que el empleo de métodos ópticos como la espectroscopia de absorción electrónica en la región ultravioleta-visible y la espectroscopia de emisión electrónica, conductometría y resonancia magnética nuclear reúnen las condiciones necesarias para alcanzar los objetivos planteados. A continuación se presenta la lista de reactivos y aparatos empleados y las ventajas del empleo de cada uno de los métodos. También se presentan algunos comentarios y consideraciones hechas para el ajuste de los datos experimentales, el cálculo de las constantes de asociación y sus errores asociados. Además se describe en términos generales el procedimiento experimental y análisis de los datos obtenidos, en los **Capítulos 5, 6 y 7** se presenta en detalle esta información.

### 4.1 Reactivos

Las moléculas anfitrión, dicloruro de *d*-tubocurarina y rifampicina 95 % fueron compradas a *Sigma*.

Los aminoácidos y sus derivados que se encuentran en forma aniónica, catiónica o zwitteriónica en las disoluciones amortiguadoras, N-acetil-D-alanina, N-acetil-L-alanina, N-acetil-D-fenilalanina, N-acetil-L-fenilalanina, D-alanina, L-alanina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, D-tirosina 98 %, L-tirosina, L-3,4-dihidroxifenilalanina, adenina, cafeína anhidra, teofilina, inosina, L-alanina metil éster hidrocioruro, L-alanina etil éster hidrocioruro, D-fenilalanina metil éster hidrocioruro y L-fenilalanina metil éster hidrocioruro 98 % fueron comprados a *Sigma*, mientras que el L-triptofano fue comprado a *Pfanstiehl Chemical*.

La molécula fluorogénica, ácido 8-anilino-naftaleno sulfónico 97 %; el ácido benzoico y sus derivados, ácido salicílico 99 %, ácido *meta*-hidroxibenzoico, ácido *para*-hidroxibenzoico, el ácido fenilacético; los ácidos dicarboxílicos aromáticos, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tereftálico (sal de sodio) 96 %; los ácidos dicarboxílicos

alifáticos, ácido oxálico (dihidrato) 99 %, ácido malónico, ácido succínico (sal de sodio) 99 %, ácido glutárico y ácido adípico, aniones en las disoluciones amortiguadoras empleadas fueron comprados a *Aldrich*.

El agua deuterada 99.9 % D, empleada para preparar las disoluciones para los estudios de resonancia magnética nuclear fue comprada a *Aldrich*.

Los reactivos empleados para el estudio de la cinética de hidrólisis del acetato de *para*-nitrofenol por la tubocurarina, nitrofenol 99 %, acetonitrilo HPLC y acetato de *para*-nitrofenilo 97 % fueron comprados a *Aldrich*. Mientras que el éster de *para*-nitrofenilo N-carbobenciloxifenilalanina, enantiómeros D y L, fueron comprados a *Sigma*.

También fueron empleadas las siguientes sales inorgánicas, ácidos y bases para la preparación de las disoluciones amortiguadoras y para ajustar el pH de estas disoluciones y de disoluciones de las moléculas anfitrión y huésped: carbonato de sodio (*Merck*), bicarbonato de sodio (*Sigma*), cloruro de sodio (*Mallinckrodt*), fosfato de sodio monobásico monohidratado 98 % (*Aldrich*), fosfato de sodio dibásico 99% (*Aldrich*), ácido bórico (*Baker*), ácido trifluoroacético (*Sigma*), ácido fosfórico (*Baker*), ácido clorhídrico 37 % (*Mallinckrodt*), ácido acético glacial 99.7 % (*Baker*), hidróxido de sodio (*Mallinckrodt*), y estándares volumétricos en agua de hidróxido de sodio 0.0982 N y 1.010 N (*Aldrich*).

Todos los reactivos fueron empleados sin purificación posterior. Las disoluciones fueron preparadas momentos antes de iniciar los experimentos con agua purificada con el equipo *Milli-Q Water Reagent System*.

## 4.2 pH y pD

El pH de todas las disoluciones de las moléculas anfitrión, huésped y disoluciones amortiguadoras se determinó con un pH-metro *Orion* modelo 710-A con una precisión de  $\pm 0.005$  unidades de pH y electrodos de vidrio combinado y semimicro de la marca ROSS.

En el caso de los estudios de la rifampicina y de la tubocurarina realizados por RMN en agua deuterada a diferentes pH's, se empleó la ecuación (4.1) para calcular el pD de la disolución:

$$pD = pH + 0.40 \quad (4.1)$$

donde pH es la lectura del pH-metro después de la calibración del electrodo con los estándares de pH acuosos convencionales [Mikkelsen y Nielsen, 1960; Covington *et al.*, 1968; Galster, 1991].

### 4.3 Disoluciones amortiguadoras y fuerza iónica

Las disoluciones amortiguadoras se prepararon de acuerdo a las técnicas descritas en la literatura [Lurie, 1975; Dean, 1992]. Las disoluciones amortiguadoras de fosfatos se prepararon empleando disoluciones 0.067 M de fosfatos de sodio monobásico y dibásico; para pH 6.0 (87.9 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 12.1 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), para pH 7.0 (38.8 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 61.2 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y para pH 8.0 (3.1 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 96.9 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). El pH de las disoluciones amortiguadoras se ajustó empleando el pH-metro y las disoluciones de fosfato apropiadas. Para todos los experimentos, las disoluciones amortiguadoras fueron diluidas hasta una concentración 0.032 M.

La disolución amortiguadora universal se preparó con cantidades iguales de disoluciones 0.04 M de ácido fosfórico ( $\text{pK}_{a1} = 2.15$ ,  $\text{pK}_{a2} = 7.20$ ,  $\text{pK}_{a3} = 12.38$ ), ácido bórico ( $\text{pK}_{a1} = 9.24$ ,  $\text{pK}_{a2} = 12.74$ ,  $\text{pK}_{a3} = 13.80$ ) y ácido acético ( $\text{pK}_a = 4.76$ ) [Dean, 1992]. La mezcla universal se diluyó a 0.032 M y se añadió NaCl suficiente para fijar la fuerza iónica en 0.1 M. Los  $\text{pK}_a$ 's de los tres ácidos permiten cubrir un amplio intervalo de pH, por lo que fue empleada para titular las disoluciones de las moléculas anfitrión. En algunos casos la disolución amortiguadora se preparó sólo con ácido fosfórico y bórico y en otros sólo se empleó el ácido bórico como disolución amortiguadora, en cada caso el pH se ajustó al pH deseado con disoluciones concentradas de HCl y NaOH.

La fuerza iónica en todos los experimentos se mantuvo fija en 0.1 M.

## 4.4 Métodos ópticos

Las dos moléculas estudiadas, tubocurarina y rifampicina tienen anillos aromáticos, los cuales producen absorbancia de luz y en algunos casos fluorescencia. Las características de los espectros de fluorescencia y absorbancia, tales como la intensidad y posición de los máximos, son sensibles por el microambiente de los cromóforos y por tal razón pueden emplearse para seguir el proceso de inclusión. Ambos métodos se utilizan ampliamente para el estudio del proceso de inclusión [Izatt *et al.*, 1991].

### 4.4.1 Estudios por espectroscopia de absorción electrónica en la región ultravioleta-visible

La absorbancia que presentan la tubocurarina y rifampicina corresponde a transiciones del tipo  $\pi\text{-}\pi^*$  ó  $n\text{-}\pi^*$ . Los máximos de estas transiciones se encuentran en la región de 240 a 500 nm y los coeficientes de absorbancia típicos están en el intervalo  $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las medidas cuantitativas en este método están basadas en la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4.2)$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorbancia molar,  $l$  es el paso óptico y  $c$  es la concentración [Harris y Bashford, 1987]. En el proceso de formación del complejo pueden cambiarse  $\varepsilon$  y la posición del máximo. El análisis del cambio de la absorbancia con la concentración a una longitud de onda fija muestra el cambio de  $\varepsilon$  observada.

El intervalo de concentraciones que puede emplearse en este método es limitado, por ejemplo con  $\varepsilon = 10^4$  se pueden obtener datos precisos en el intervalo  $5 \times 10^{-6} - 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ . A concentraciones más bajas la absorbancia es menor que 0.05 e involucra un error muy grande ya que la absorción del blanco es aproximadamente del

orden de  $10^{-3}$ , por otro lado a concentraciones más altas la absorción es mayor que 1.5 y tiene asociado un error instrumental.

En los estudios de absorbancia realizados en este trabajo se emplearon dos espectrofotómetros de arreglo de diodos: uno HP8452 (ventana espectral de 190 nm a 820 nm y resolución de 2 nm) y otro HP8453 (ventana espectral 190-1100 nm y resolución de 1 nm), ambos con una precisión de longitud de onda de  $\pm 0.5$  nm y una precisión fotométrica  $< \pm 0.005$  A a 1 A), acoplados a un controlador de temperatura *Peltier* HP 89090 ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y volumen de 3 ml, para registrar los espectros de absorbancia de las moléculas anfitrión y de las mezclas anfitrión-huésped.

#### 4.4.2 Estudios por espectroscopia de emisión electrónica

Algunas de la moléculas que absorben luz también pueden fluorescer. Está reportada en la literatura la luminiscencia de la tubocurarina, la cual muestra máximos de intensidad moderada de fluorescencia a 317 nm y de fosforescencia a 434 nm con un máximo de excitación a 280 nm, el cual corresponde al máximo de absorbancia en disolución acuosa [Gibson y Tumbull, 1979]. Sin embargo, la rifampicina no presenta fluorescencia [Gallo y Radaelli, 1976 y referencias citadas allí].

Generalmente la fluorescencia es una propiedad más sensible para detectar los cambios de microambiente [Ramamurthy, 1991]. La intensidad de fluorescencia ( $I$ ) es proporcional de la concentración con una ecuación de la misma forma que ecuación (4.2):

$$I = i \cdot c \quad (4.3)$$

donde  $i$  es un coeficiente de proporcionalidad y  $c$  es la concentración de la sustancia fluoregénica. La ecuación (4.3) es correcta sólo cuando la absorbancia de la sustancia fluoregénica es menor que 0.05 [Harris y Bashford, 1987]. El coeficiente  $i$  normalmente

es muy grande y el método permite detectar las concentraciones del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  M.

En el proceso de formación del complejo pueden cambiarse  $i$  y la posición del máximo. El análisis del cambio de  $I$  del anfitrión con la concentración del huésped a una longitud de onda fija muestra el cambio de  $i$  observada.

En este trabajo se utilizó un espectrofluorómetro *Fluoromax-Spex* (ventana espectral de 200 nm a 800 nm, con una exactitud de longitud de onda  $\pm 0.5$  nm y una relación señal a ruido de 550/1) acoplado a un baño de temperatura controlada ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y volumen de 3 ml, para registrar los espectros de fluorescencia de la tubocurarina y tubocurarina-huésped.

#### 4.5 Estudios por conductometría

En virtud de que la molécula de tubocurarina al  $\text{pH} < 7$  es dicatiónica su interacción con huéspedes aniónicos puede medirse conductométricamente. La conductividad  $C$  de un electrolito  $\text{MX}$  esta dada por:

$$C = \Theta \sum \lambda_i c_i \quad (4.4)$$

donde  $\Theta$  es la constante de la celda,  $\lambda$  es conductividad equivalente del ion  $i$  y  $c$  es la concentración del ion  $i$ .

Se considera que la conductividad observada corresponde a la suma de las conductividades de cada especie presente y que dichas conductividades son proporcionales a un coeficiente de conductividad característico (conductividad equivalente) de esa especie por su concentración.

En este trabajo se empleó un puente de conductividad YSI digital, modelo 32 con celda de vidrio con una constante de  $1.0 \text{ cm}^{-1}$  y una exactitud de  $\pm 0.2 \%$  en las escalas 1.0-20, 0.1-2, 10.0-200, 1.0-20 milimhos y  $\pm 1.0 \%$  en la escala 10-200 milimhos; para medir la conductividad de las disoluciones de tubocurarina y tubocurarina-huésped.

## 4.6 Estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$

Aún cuando los métodos ópticos y la conductometría permiten obtener las constantes de enlace de los complejos formados no proporcionan información acerca de la interacción que permiten evaluar, es decir, si se trata de superficies de asociación o bien inclusión en una cavidad. Al respecto, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) tiene la ventaja de proporcionar información de la geometría del complejo. La evaluación de las constantes de asociación a través del uso de datos de RMN fue reportada por Huggins *et al.* [1955]. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada no sólo para obtener información de la geometría del complejo sino para evaluar la constante de estabilidad del complejo [Petti *et al.*, 1988; Diederich *et al.*, 1986; Schneider y Dürr, 1991 y referencias citadas allí].

El spin nuclear de un protón tiene asociado a él un momento magnético el cual interactúa con el campo magnético aplicado. El parámetro más importante en este tipo de espectroscopia es el desplazamiento químico,  $\delta$ , el cual está asociado a una frecuencia de resonancia relativa de un protón tomando como referencia la frecuencia de resonancia de los protones del tetrametil silano y expresado en partes por millón (ppm).  $\delta$  es sensible por el estado del protón, es decir por la estructura electrónica del átomo al cual está enlazado ( $\delta$  depende de la hibridación del carbono y de los efectos de los sustituyentes unidos a ese carbono), y de los contactos que presenta el protón con el resto de los átomos de la molécula y con las moléculas vecinas. Esta última característica permite el empleo de esta espectroscopia para detectar la formación de complejos no covalentes del tipo anfitrión-huésped.

En este trabajo se realizaron estudios de RMN protónica unidimensional mediante el empleo de tres espectrómetros, *General Electric* GN 500 MHz, para el estudio de las interacciones tubocurarina-huésped a pH 6.0, *Varian Gemini* 300 MHz, para el estudio de las interacciones de la tubocurarina con huéspedes aniónicos a pH 9.0 y las interacciones rifampicina-huésped y *Varian Unity* 400 MHz, para el estudio de las interacciones de la tubocurarina con huéspedes catiónicos y zwitteriónicos a pH 9.0.

## 4.7 Cálculos y ajustes

Todos los cálculos y ajustes de regresión lineal y no lineal requeridos se llevaron a cabo con el programa *Microcal Origin*, versión 3.5 (confiabilidad del 95%), tomando como criterio el mejor ajuste que reproduzca parámetros físicamente congruentes con las observaciones experimentales y modelos empleados.

El programa Origin emplea el algoritmo Levenberg-Marquardt [Press *et al.*, 1988] y el método simplex [Nelder y Mead, 1965] para el ajuste no lineal de mínimos cuadrados. Este método está entre los más empleados en la estimación de parámetros. Encuentra los parámetros de un modelo especificado por minimización de los valores de chi cuadrada,  $\chi^2$  [MicroCal Software, 1993]. Para hacer el proceso de ajuste más estable incluye restricciones lineales basadas en un método de programación cuadrático [Shrager, 1972].

### 4.7.1 Número y modelos de ajuste de los datos experimentales

El número de datos contenidos en las gráficas presentadas en este trabajo es muy dependiente de la características de los componentes, de la técnica experimental empleada y del tipo de estudio realizado.

En algunos casos las gráficas presentadas contienen un número relativamente pequeño de puntos (ver por ejemplo Figura 6.25, **Capítulo 6**), los cuales no resultan de mediciones independientes, sino que son datos de ajustes previos de muchos puntos y por tal razón son confiables.

Sólo en estudios cinéticos puede observarse que se presenta un número de puntos relativamente grande; sin embargo, cada uno de ellos no corresponde a una disolución preparada independientemente, sino a una serie de mediciones hechas con tiempo programado en una disolución a tiempos muy cortos, del orden de segundos (ver por ejemplo gráficas del **Capítulo 6**).

Sin embargo, en el caso de los estudios de la interacción anfitrión-huésped por las diferentes técnicas cada punto corresponde a una disolución preparada independientemente como se describe en los **Capítulos 5, 6 y 7** en cada sección experimental. Los puntos experimentales fueron obtenidos en el intervalo de concentraciones en el cual se había determinado cierta dependencia lineal de las concentraciones de los componentes y de acuerdo al intervalo de respuesta confiable del equipo empleado. La obtención de puntos experimentales a concentraciones más altas estuvo limitado por la solubilidad del huésped en agua, la cual fue diferente para cada uno de ellos.

Los modelos de ajuste de datos experimentales fueron propuestos basándose en ecuaciones en equilibrio, balances de masa, relación de concentraciones de los componentes, estado iónico de los componentes al pH de estudio, procedimiento y obtención experimental de datos, así como con significado físico.

Es importante mencionar que los Apéndices A (A.1-A.8) sólo presentan aquellos modelos que proporcionaron el mejor ajuste de los datos obtenidos, *i.e.*, valores de constantes de asociación y de otros parámetros consistentes entre sí, con resultados de otras técnicas y comparables con otros valores reportados en la literatura.

Aún cuando los datos obtenidos en los experimentos no fueron repetidos varias veces se verificó siempre la reproducibilidad de las condiciones iniciales y se buscó la consistencia de las constantes de asociación por diferentes técnicas. No se muestran las gráficas de datos experimentales con barras de error, excepto para las Figuras 6.5 y 6.6 del **Capítulo 6**.

#### **4.7.2 Cálculo de errores asociados a las constantes de enlace reportadas**

En general se trató de que en las ecuaciones empleadas para el ajuste de los datos experimentales uno de los parámetros de ajuste proporcionará directamente el valor de la constante de enlace y en consecuencia tendría asociado un error, el cual correspondería a la desviación estándar. Sin embargo, en algunos casos, por el tipo de

ecuación de ajuste propuesta la constante de asociación debía obtenerse a través de una serie de operaciones algebraicas, donde el valor de la constante de asociación que se reporta tiene un error asociado calculado de acuerdo al tipo de operaciones realizadas. En estos casos los errores fueron calculados de acuerdo a:

Si se consideran los siguientes números con sus errores asociados:

$$x \pm dx \quad y \pm dy$$

La suma de ellos y su error asociado se calculó de acuerdo a:

$$(x + y) \pm dx + dy \quad (4.5)$$

La diferencia de ellos y su error asociado se calculó de acuerdo a:

$$(x - y) \pm dx + dy \quad (4.6)$$

El producto de ellos y su error asociado se calculó de acuerdo a:

$$(x \cdot y) \pm x \cdot dy + y \cdot dx \quad (4.7)$$

El división de ellos y su error asociado se calculó de acuerdo a:

$$\left(\frac{x}{y}\right) \pm \frac{x \cdot dy + y \cdot dx}{y \cdot y} \quad (4.8)$$

Las constantes de enlace reportadas corresponden a los valores promedio obtenidos a diferentes longitudes de onda en los experimentos de fluorescencia y absorción ultravioleta visible. En el caso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear el valor de la constante reportado corresponde a un valor promedio de las constantes de enlace calculadas a partir de los cambios de desplazamiento químico para los diferentes protones. Los valores promedio de las constantes de enlace con sus

errores asociados fueron calculados con las ecuaciones (4.5) y (4.8) en todos los casos a excepción de las constantes reportadas de la tubocurarina a pH 9.0 por resonancia magnética nuclear en cuyo caso los errores asociados fueron calculados como desviaciones del valor medio de la constante de enlace a las otras constantes de enlace obtenidas para otros protones.

En el caso de la evaluación de otros parámetros, como por ejemplo,  $pK_a$ 's, también se emplearon las ecuaciones (4.5) a (4.8) para el cálculo del error asociado, dependiendo de las operaciones algebraicas que llevaran a dicha determinación.

#### **4.8 Procedimientos experimentales y cálculo de parámetros**

Los procedimientos experimentales de preparación de muestras para su análisis y cálculo de las constantes de asociación se describen en cada sección de acuerdo a la técnica empleada. En la mayor parte de los casos consistieron en la preparación de disoluciones patrón del anfitrión y el huésped y su mezcla en disoluciones amortiguadoras a diferente concentración dependiendo de la técnica, o bien manteniendo una concentración fija y variando la del otro componente. También se obtuvieron los datos correspondientes para ambos componentes en ausencia del otro en la disolución amortiguadora. Mientras que el cálculo de la constante se obtuvo por diferencias de los datos experimentales, graficación de las diferencias vs concentración de un componente y el cálculo de la constante, mediante el ajuste, generalmente no lineal, de los datos a diferentes longitudes de onda o bien desplazamientos químicos de diversos protones con la ecuación deducida de acuerdo al procedimiento experimental y la técnica.

Sin embargo, en los estudios realizados por fluorescencia a pH 9.0, tanto el procedimiento experimental como el análisis de los datos fue más laborioso por la inestabilidad del anfitrión a ese pH y por las diversas correcciones que tuvieron que realizarse en virtud de las contribuciones a la fluorescencia de los componentes presentes, dos en el caso de fluorescencia directa y tres en el caso de fluorescencia

por competencia. Por tal razón los procedimientos experimentales y cálculo de constantes para los dos casos citados se presentan detalladamente en esta sección para facilitar la lectura de los resultados obtenidos en el **Capítulo 6**.

#### **A. Estudios de fluorescencia directa a pH 9.0**

En general, el trabajo experimental consiste en un proceso de titulación en el cual para cada punto de la titulación se prepara una disolución nueva. En una primera serie de experimentos se preparan en la celda de fluorescencia 2.5 ml de disolución amortiguadora de ácido bórico 0.032 M, se registra el espectro de fluorescencia (blanco del experimento). A la disolución amortiguadora se añaden 0.28 ml de ANS  $5 \times 10^{-5}$  M ó 0.06 ml de TC  $5 \times 10^{-4}$  M de la especie cuya fluorescencia se va a monitorear, *i.e.*, ANS o TC, para obtener una concentración en la celda de  $5.04 \times 10^{-6}$  ó  $1.17 \times 10^{-5}$  M, respectivamente, se registra el espectro. Posteriormente se agrega a la celda la cantidad apropiada de una disolución concentrada de la especie no fluorescente (para TC a partir de una disolución  $1 \times 10^{-2}$  M y para cualquier otro huésped a partir de disoluciones de concentración aproximada  $5 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-2}$  M) para obtener una concentración en la celda en el intervalo indicado en la Tabla 6.1 (ver **Capítulo 6**), y se registra el espectro de fluorescencia. De la forma descrita se preparan entre 11 y 13 muestras con diferente concentración del huésped. En una segunda serie de experimentos se preparan, también en forma independiente las mismas concentraciones de la especie no fluorescente en la disolución amortiguadora en ausencia de la especie fluorescente y se registran los espectros de fluorescencia.

#### *Cálculo de la constante de asociación*

Una vez obtenidos los espectros tanto de la especie no fluorescente como de la mezcla TC-huésped se eligen las  $\lambda$ 's a ser estudiadas, se analizan aproximadamente tres  $\lambda$ 's, las cuales generalmente corresponden a los máximos de intensidad de fluorescencia y algún otro punto cercano a dichos máximos. Se extraen los valores de

intensidad de fluorescencia tanto de la mezcla como de la especie no fluorescente a cada concentración y a cada  $\lambda$  a ser analizada. El Apéndice C (Tablas C.1-C.4) presenta los datos empleados para el análisis y cálculo de las constantes de asociación por medio de estudios de fluorescencia directa.

Para cada  $\lambda$  de análisis, se emplea el siguiente procedimiento (sólo para el caso de la interacción TC-ANS todo lo mencionado con respecto a la especie que actúa como huésped corresponde a TC, la molécula anfitrión, ya que en este único caso se empleó la fluorescencia de ANS, el huésped, para este estudio). La Tabla 4.1 muestra como ejemplo los datos parciales del procedimiento de análisis y tratamiento de los datos experimentales para la interacción TC-NADFA a 389 nm.

a) Se calcula la concentración del huésped en la disolución de la mezcla (TC-huésped).

$$\frac{(conc. sol. huésped) \cdot vol. añ adido huesped}{2.56 + vol. añ adido huesped}$$

donde *conc. sol. huésped* es la concentración de la disolución patrón del huésped, 2.56 es la suma de volúmenes de la disolución amortiguadora (2.5 ml) y de la TC (0.06 ml). En la Tabla 4.1, la segunda columna es el volumen de NADFA añadido y la primera columna la concentración de NADFA en la celda.

b) Se corrige la intensidad de fluorescencia del huésped por dilución:

$$\frac{I_{obs-h} \cdot (2.5 + vol. añ adido de huesped)}{vol. total}$$

donde  $I_{obs-h}$  es la intensidad de fluorescencia observada del huésped en la disolución amortiguadora, 2.5 es el volumen de la disolución amortiguadora en la celda, *vol. añadido de huésped* es el volumen de la disolución concentrada del huésped añadida a la celda y *vol. total* es la suma de volúmenes de la disolución amortiguadora, el huésped y el anfitrión en la celda, columna 5 en la Tabla 4.1.

c) Se corrige la intensidad de fluorescencia de la mezcla huésped-anfitrión por dilución:

$$\frac{I_{obs-ha} \cdot vol. total}{2.5 + vol. añ adido de anfitrión}$$

donde  $I_{obs-ha}$  es la intensidad de fluorescencia observada de la mezcla huésped-anfitrión en la disolución amortiguadora,  $vol. total$  es la suma de volúmenes de la disolución amortiguadora, el huésped y el anfitrión en la celda, 2.5 es el volumen de la disolución amortiguadora en la celda,  $vol. añadido de anfitrión$  es cantidad de la disolución concentrada del anfitrión añadida a la celda, columna 6 en la Tabla 4.1.

d) Se grafica la concentración del huésped (ver inciso (a)) vs la diferencia de intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia de la mezcla corregida (inciso (c)) menos intensidad de fluorescencia del huésped (inciso (b))). En la Tabla 4.1, columna 7, ver más adelante la gráfica y la ecuación de ajuste correspondiente.

**Tabla 4.1.** Datos empleados para el análisis de la interacción TC-NADFA a  $\lambda = 389$  nm.

[NADFA] (M)	Vol. añadido de NADFA (ml) <sup>a</sup>	$I_{NADFA}$ recalculada <sup>b</sup>	$I_{TC-NADFA}$ obs	$I_{NADFA}$ corregida por dilución	$I_{TC-NADFA}$ corregida por dilución	$\Delta I$ ( $I_{TC-NADFA}$ - $I_{NADFA}$ )
0	0	144.87000	1936.749	141.47461	1936.749	1795.2744
$1.10 \times 10^{-4}$	0.06	159.42921	1952.812	155.77816	1998.5810	1842.8029
$2.20 \times 10^{-4}$	0.12	173.98842	1859.477	170.09315	1946.6400	1776.5468
$4.00 \times 10^{-4}$	0.23	197.81258	1777.143	193.55854	1936.8082	1743.2497
$5.10 \times 10^{-4}$	0.30	212.37178	1859.964	207.91643	2077.9285	1870.0121
$7.00 \times 10^{-4}$	0.43	237.51951	1643.992	232.75323	1920.1313	1687.3781
$1.05 \times 10^{-3}$	0.70	283.84426	1820.630	278.62013	2318.4585	2039.8384
$1.09 \times 10^{-3}$	0.06	289.13852	1839.884	282.51703	1883.0063	1600.4893
$2.14 \times 10^{-3}$	0.12	428.11278	1838.502	418.52817	1924.6818	1506.1536
$3.14 \times 10^{-3}$	0.18	560.46922	1993.251	548.19617	2133.4015	1585.2053
$4.10 \times 10^{-3}$	0.24	687.5314	2001.907	672.79859	2189.5858	1516.7872
$5.01 \times 10^{-3}$	0.30	807.97576	2109.420	791.02522	2356.6177	1565.5924

<sup>a</sup> Las concentraciones en el intervalo  $1.10 \times 10^{-4}$  a  $1.05 \times 10^{-3}$  M fueron obtenidas a partir de una disolución de NADFA 0.0049 M y las comprendidas en el intervalo  $1.09 \times 10^{-3}$  a  $5.01 \times 10^{-3}$  M a partir de una disolución de NADFA 0.047 M.

<sup>b</sup> Como las  $I_{NADFA}$  observadas no son lineales a bajas concentraciones, debido probablemente a que las  $I$ 's blanco son grandes, se ajustaron linealmente todos los datos y con los parámetros de ajuste se recalcularon las  $I_{NADFA}$ .

Los datos ya corregidos y graficados se ajustan con una ecuación diferente dependiendo del perfil de los puntos experimentales obtenidos. Las constantes de enlace calculadas por el ajuste de los resultados experimentales con las diferentes ecuaciones son mostradas en la Tabla 6.6 (ver **Capítulo 6**).

## B. Estudios de fluorescencia por competencia a pH 9.0

En general, el trabajo experimental consiste en un proceso de titulación en el cual para cada punto de la titulación se prepara una disolución nueva. Así para cada punto de la titulación, se preparan 2.5 ml de la disolución amortiguadora de ácido bórico 0.032 M y se registra el espectro de fluorescencia (blanco del experimento). Después se agrega 0.05, 0.10, 0.20 ó 0.40 ml de la disolución del huésped concentrada 0.005, 0.05 ó 0.15 M previamente ajustada a pH 9.0, se registra el espectro de fluorescencia. En la misma celda se agregan 0.28 ml de ANS  $5 \times 10^{-5}$  M, se registra nuevamente el espectro. Posteriormente se añade a la celda 0.25 ml de TC  $1 \times 10^{-2}$  M y se registra el espectro de fluorescencia. Este procedimiento se repite para el resto de las adiciones de cada huésped y para cada una de las tres concentraciones de las disoluciones patrón del huésped.

### Cálculo de la constante de asociación

Una vez obtenidos los espectros de fluorescencia del huésped, huésped-ANS y huésped-TC-ANS se eligen las  $\lambda$ 's a ser estudiadas, se analizan tres  $\lambda$ 's, las cuales generalmente corresponden a los máximos de intensidad de fluorescencia y algún otro punto cercano a dichos máximos. Se extraen los valores de intensidad de fluorescencia de cada una de las especies y las mezclas a cada concentración y a cada  $\lambda$  a ser analizada. El Apéndice C (Tablas C.5-C.8) presenta los datos empleados para el análisis y cálculo de las constantes de asociación por medio de estudios de fluorescencia por competencia.

Para cada  $\lambda$  de análisis, se emplea el siguiente procedimiento, debido a que las concentraciones del huésped, ANS y TC varían todas por dilución, es necesario corregir en todos los casos las intensidades de fluorescencia registradas. La Tabla 4.2 ilustra como ejemplo los datos parciales del procedimiento de análisis y tratamiento de los datos experimentales obtenidos para el caso de la interacción NADFA-TC-ANS a  $\lambda = 500$  nm.

Tabla 4.2. Datos empleados para el análisis de la interacción NADFA-TC-ANS a  $\lambda = 500$  nm.

[NADFA] (M)	Vol. de NADFA añadido (ml) <sup>a</sup>	I <sub>NADFA</sub> (obs)	I <sub>NADFA-ANS</sub> (obs)	I <sub>NADFA-TC-ANS</sub> (obs)	I <sub>NADFA-TC-ANS</sub> (corregida por dilución)
0	0	0	4462.617	12002.770	12002.77
$8.0 \times 10^{-5}$	0.05	86.2789	4604.632	11613.362	11805.00164
$1.6 \times 10^{-4}$	0.10	135.892	4515.279	10657.876	11009.62108
$3.1 \times 10^{-4}$	0.20	176.324	4550.000	10159.786	10830.39894
$5.8 \times 10^{-4}$	0.40	308.730	4479.272	9691.795	10971.23988
$7.6 \times 10^{-4}$	0.05	159.524	4921.225	10706.692	10883.37009
$1.5 \times 10^{-3}$	0.10	269.706	4789.968	10294.974	10634.74212
$2.91 \times 10^{-3}$	0.20	355.475	4817.675	9671.556	10309.94253
$5.48 \times 10^{-3}$	0.40	651.494	4912.403	9276.329	10500.92689
$2.14 \times 10^{-3}$	0.05	201.989	4865.115	10051.745	10217.61538
$4.22 \times 10^{-3}$	0.10	362.641	4937.791	10047.839	10379.45085
$8.17 \times 10^{-3}$	0.20	623.942	4991.415	9386.424	10005.98994
$1.539 \times 10^{-2}$	0.40	1363.426	5480.581	9325.562	10556.65929

<sup>a</sup> Las concentraciones en el intervalo  $8 \times 10^{-5}$  a  $5.8 \times 10^{-3}$  M fueron obtenidas a partir de una disolución de NADFA 0.005 M, las comprendidas en el intervalo  $7.6 \times 10^{-4}$  a  $5.48 \times 10^{-3}$  M a partir de una disolución de NADFA 0.047 M y las concentraciones en el intervalo  $2.14 \times 10^{-3}$  a  $1.539 \times 10^{-2}$  M a partir de una disolución de NADFA 0.132 M.

Tabla 4.2. (Continuación).

[TC] <sub>f</sub>	I <sub>NADFA</sub> (corregida por dilución)	$\Delta I$ (I <sub>NADFA-TC-ANS</sub> - I <sub>NADFA</sub> )	I <sub>TC-ANS</sub> (calculada)	I <sub>TC-ANS</sub> calculada (corregida)	$\Delta I$ (I <sub>TC-ANS exp</sub> - I <sub>TC-ANS calc</sub> )
$8.3 \times 10^{-4}$	0	12002.77	11473.74762	12001.54001	1.22999
$8.1 \times 10^{-4}$	7.00316	11797.99848	11365.84554	11888.67444	-90.67596
$8.0 \times 10^{-4}$	10.85399	10998.76709	11261.39082	11779.4148	-780.64771
$7.7 \times 10^{-4}$	13.64737	10816.75157	11062.18306	11571.04348	-754.29191
$7.3 \times 10^{-4}$	22.50219	10948.7377	10698.61437	11190.75063	-242.01293
$8.1 \times 10^{-4}$	12.94838	10870.42171	11365.84554	11888.67444	-1018.25273
$8.0 \times 10^{-4}$	21.54201	10613.20011	11261.39082	11779.4148	-1166.21469
$7.7 \times 10^{-4}$	27.51354	10282.42899	11062.18306	11571.04348	-1288.61449
$7.3 \times 10^{-4}$	47.48499	10453.4419	10698.61437	11190.75063	-737.30872
$8.1 \times 10^{-4}$	16.39521	10201.22017	11352.2447	11874.44796	-1673.22779
$8.0 \times 10^{-4}$	28.96494	10350.48591	11271.68588	11790.18343	-1439.69752
$7.7 \times 10^{-4}$	48.29272	9957.69722	11030.00941	11537.38984	-1579.69263
$7.3 \times 10^{-4}$	99.37507	10457.28422	10707.77412	11200.33172	-743.0475

a) Se calcula la concentración del huésped en la mezcla huésped-TC-ANS en la disolución amortiguadora:

$$\frac{(\text{conc. sol. huésped}) \cdot \text{vol. añ adido huésped}}{3.03 + \text{vol. añ adido huésped}}$$

donde la *conc. sol. huésped* es la concentración de la disolución huésped empleada para la preparación de las mezclas de estudio huésped-TC-ANS, 3.03 es la suma de volúmenes fijos de la disolución amortiguadora 2.5 ml, ANS 0.28 ml y TC 0.25 ml y *vol. añadido huésped*, volumen añadido de la disolución huésped concentrada para obtener una concentración en el intervalo indicado en la Tabla 6.1 (ver **Capítulo 6**). En la Tabla 4.2 ver las columnas 1 y 2.

b) Se calcula la concentración de TC en la mezcla huésped-TC-ANS en la disolución amortiguadora, columna 7 en la Tabla 4.2.

c) Se corrige la intensidad de fluorescencia de la mezcla huésped-TC-ANS por dilución:

$$\frac{I_{obs-ht-ANS} \cdot 3.03 + vol. \text{añadido huésped}}{3.03}$$

donde  $I_{obs-ht-ANS}$  es la intensidad de fluorescencia observada de la mezcla huésped-TC-ANS, columna 6 en la Tabla 4.2.

d) Se corrige la intensidad de fluorescencia del huésped en la disolución amortiguadora por dilución:

$$\frac{I_{obs-h} \cdot 2.5}{3.03 + vol. \text{añadido huésped}}$$

donde  $I_{obs-h}$  es la intensidad de fluorescencia observada del huésped en la disolución amortiguadora, 2.5 es el volumen de la disolución amortiguadora en la celda, columna 8 en la Tabla 4.2.

e) A la intensidad de fluorescencia de la mezcla huésped-TC-ANS se le resta la intensidad de fluorescencia corregida del huésped, columna 9 en la Tabla 4.2.

f) A cada  $\lambda$  de estudio, se calcula, con las concentraciones finales de TC en la mezcla huésped-TC-ANS, la intensidad de fluorescencia de la mezcla TC-ANS. La concentración inicial de TC es  $9.09 \times 10^{-4}$  M; sin embargo, ésta decrece hasta  $7.29 \times 10^{-4}$  M por dilución, primero por adición de ANS y posteriormente al preparar las disoluciones con diferente concentración de huésped. Para calcular la intensidad de fluorescencia de TC-ANS se emplea la información obtenida del estudio de fluorescencia de TC-ANS se emplea la información obtenida del estudio de fluorescencia directa TC-ANS. Del estudio de fluorescencia directa se toman tres

puntos, incluyendo las correcciones de intensidad de fluorescencia por dilución y restando a la intensidad de fluorescencia de la mezcla la intensidad de fluorescencia de la TC, aquellos puntos cercanos al intervalo en el que oscila la concentración de TC en el proceso de estudio de la interacción huésped-TC-ANS, *i.e.*,  $5.7 \times 10^{-4}$ ,  $7.4 \times 10^{-4}$  y  $9.1 \times 10^{-4}$  M. Se grafica la intensidad de fluorescencia de la mezcla vs concentración, se ajustan linealmente los datos. Los parámetros de ajuste se emplean junto con las concentraciones de TC finales en cada mezcla para calcular la intensidad de fluorescencia de TC-ANS en el intervalo de concentraciones en las que decrece la concentración inicial de TC. Así, la Tabla 4.3 presenta los parámetros de ajuste empleados para calcular la intensidad de fluorescencia de la interacción TC-ANS, columna 10 en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.3.** Parámetros de ajuste lineal empleados para calcular la intensidad de fluorescencia de la interacción TC-ANS por medio de la ecuación:  $Y = A + B \cdot X$ .

$\lambda$ de estudio (nm)	A	B
500	4826.98	8055882.35
516	5272.76	7020588.24
540	5373	3600000

g) Para emplear los datos de la interacción TC-ANS en el estudio de la interacción huésped-TC-ANS, se determina la relación de aumento de fluorescencia de las dos series  $I_{TC-ANS}$  calculada /  $I_{TC-ANS}$  observada, valores a concentración 0 de NADFA (columna 10 entre columna 9). Se divide la  $I_{TC-ANS}$  calculada entre el factor obtenido de la relación anterior, columna 11 en la Tabla 4.2.

h) A la intensidad  $I_{TC-ANS}$  observada se le resta la intensidad  $I_{TC-ANS}$  calculada y se grafican estos valores vs la concentración del huésped en la mezcla huésped-TC-ANS en la disolución, columna 12 en la Tabla 4.2.

Los datos finales se ajustan con ecuaciones diferentes dependiendo de la estequiometría del complejo, ver **Capítulo 6**.

## 5. Estudios de la tubocurarina en forma dicatiónica

### 5.1 Sustratos estudiados

Los antecedentes de la tubocurarina, trabajos preliminares y estructura química se presentan en la sección 2.2.2.3.A (ver **Capítulo 2**)

De la estructura de la TC ( ver Figura 2.23, **Capítulo 2**) es posible sugerir que los huéspedes capaces de interacciones simultáneas en dos o más sitios empleando fuerzas de varios tipos sean especies aniónicas capaces de atracciones electrostáticas, y que tienen fragmentos orgánicos susceptibles de interacciones hidrofóbicas u otros tipos de interacciones no covalentes. Las especies aniónicas estudiadas como huéspedes de la tubocurarina a pH 6.0 y 7.0 se muestran en la Figura 5.1.

**ANS** Especie bien conocida [Stryer, 1965] por la alta sensibilidad que presenta su fluorescencia a la polaridad de un ambiente y la cual refleja a través de un incremento de la intensidad de fluorescencia y desplazamiento a longitudes de onda más cortas, de  $\approx 526$  a  $483$  nm con una  $\lambda_{exc} = 360$  nm, cuando se transfiere un ion de ANS de medio acuoso a un disolvente orgánico. Con esta molécula se va probar la existencia de una cavidad o superficie hidrofóbica en la TC en disolución.

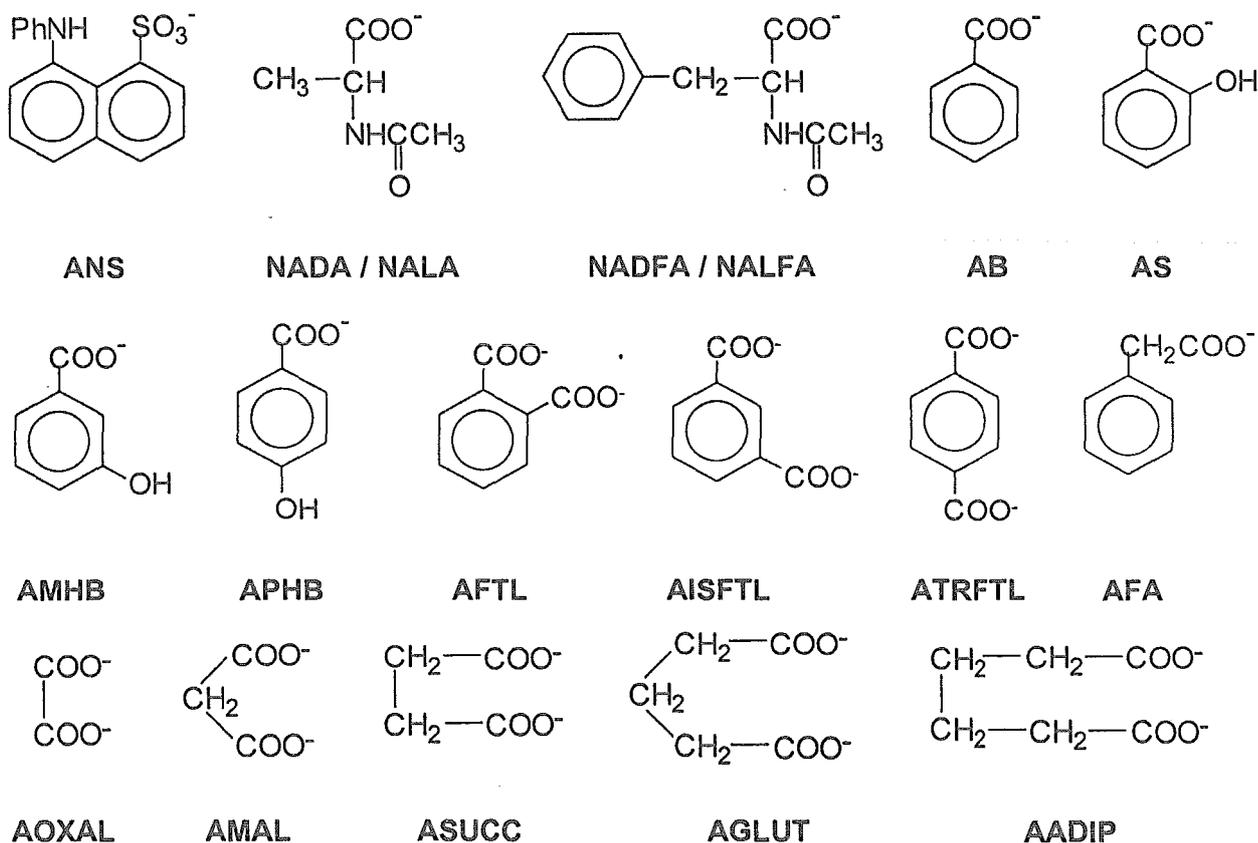
**NADA/NALA** Aminoácidos enantioméricos seleccionados para probar si la TC es capaz de un reconocimiento quiral.

**NADFA/NALFA** Aminoácidos enantioméricos elegidos con el mismo objetivo que los aminoácidos NADA y NALA además de que permitirán determinar la importancia del reemplazamiento de un átomo de hidrógeno por un anillo aromático hidrofóbico.

**AS, AMHB, APHB** Acidos hidroxibenzoicos isoméricos elegidos para determinar si la TC es capaz de diferenciar isómeros de posición.

**AB** Para complementar la serie de ácidos hidroxibenzoicos isoméricos y determinar así la importancia de la presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático.

**AFA** Este ácido a diferencia del AB contiene una unidad de metileno entre el carboxilato y el anillo aromático y una unidad de separación menos que en el caso de los aminoácidos NADFA/NALFA. Estas características del AFA permitirán determinar la importancia de la separación del anión carboxilato del fragmento aromático y la importancia de la separación adicional >CH-NHCOCH<sub>3</sub> contenida en los aminoácidos citados en la formación de los complejos de TC-huésped aniónico aromático.



**ANS** Acido 8-anilino-naftaleno sulfónico  
**NADA / NALA** N-acetil-D/L-alanina  
**NADFA / NALFA** N-acetil-D/L-fenilalanina  
**AB** Acido benzoico  
**AS** Acido salicílico  
**AMHB** Acido *meta*-hidroxibenzoico  
**APHB** Acido *para*-hidroxibenzoico  
**AFTL** Acido ftálico

**AISFTL** Acido iso-ftálico  
**ATRFTL** Acido tere-ftálico  
**AFA** Acido fenilacético  
**AOxAL** Acido oxálico  
**AMAL** Acido malónico  
**ASUCC** Acido succínico  
**AGLUT** Acido glutárico  
**AADIP** Acido adípico

**Figura 5.1.** Estructura química de los aniones empleados como huéspedes de la tubocurarina a pH 6.0 y 7.0.

**AFTL, AISFTL, ATRFTL** Moléculas aromáticas dianiónicas isoméricas para determinar los requerimientos de complementaridad entre sitios cargados.

**AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT, AADIP** Moléculas alifáticas dianiónicas, en las cuales los carboxilatos están sepados sistemáticamente a través de un número diferente de unidades de metileno. Al igual que las moléculas aromáticas citadas anteriormente, para determinar los requerimientos de complementaridad entre sitios cargados.

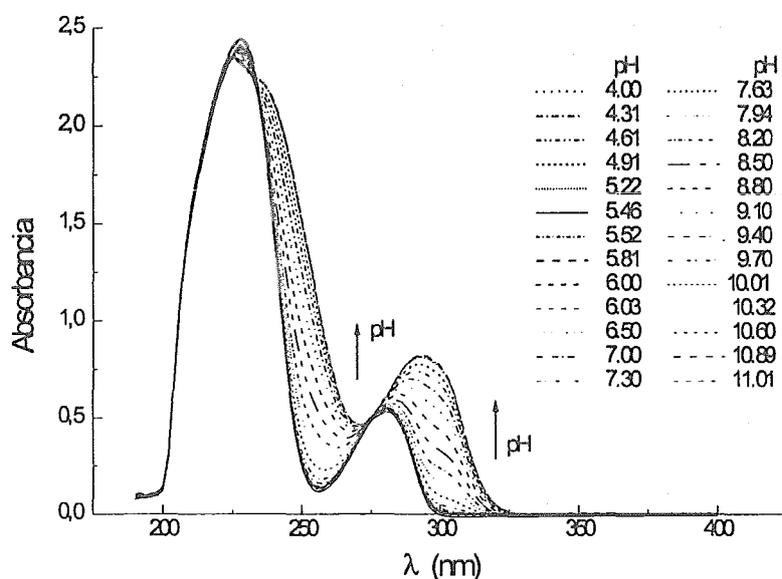
## **5.2 Determinación de los $pK_a$ 's de la tubocurarina por espectroscopia de absorción electrónica**

Los valores de los  $pK_a$ 's de la TC fueron determinados en disolución sin disoluciones amortiguadoras [Barlow *et al.*, 1982], las cuales en principio pueden afectar los  $pK_a$ 's por asociación iónica. Por esta razón se realizó la titulación de la TC en las condiciones de trabajo empleadas en estudio.

El espectro ultravioleta visible de la TC presenta dos máximos a 225 y 280 nm en disoluciones ácidas y neutras. Debido a que la región visible del espectro es sensible al cambio de pH de la TC, se empleó este método espectroscópico para determinar los  $pK_a$ 's de la TC.

El procedimiento experimental empleado para determinar los  $pK_a$ 's de la TC consistió en preparar 50 ml de una disolución  $3.57 \times 10^{-5}$  M de TC en una disolución amortiguadora universal (mezcla de ácidos acético, bórico y fosfórico) 0.032 M y NaCl 0.1 M como electrolito de soporte. La disolución de TC se mantuvo en agitación mientras se titulaba con NaOH 2.0 M, el cual se agregaba en cantidades de microlitros empleando una pipeta automática. Se inició la titulación a pH 4.0 y se fueron adicionando microlitros de NaOH suficientes para cambiar el pH en unidades de 0.3 y hasta un pH de 11.01. Los espectros UV-VIS de la TC registrados cada 0.3 unidades de pH se muestran en la Figura 5.2.

Terminada la titulación con NaOH, la misma disolución se tituló con HCl 5.0 M, siguiendo el mismo procedimiento que la titulación con NaOH, pero en este caso registrando los espectros UV-VIS de la TC a aproximadamente cada unidad de pH, en el intervalo de pH 11.01 a 3.98. La Figura 5.3 muestra los espectros de retitulación de TC con HCl.

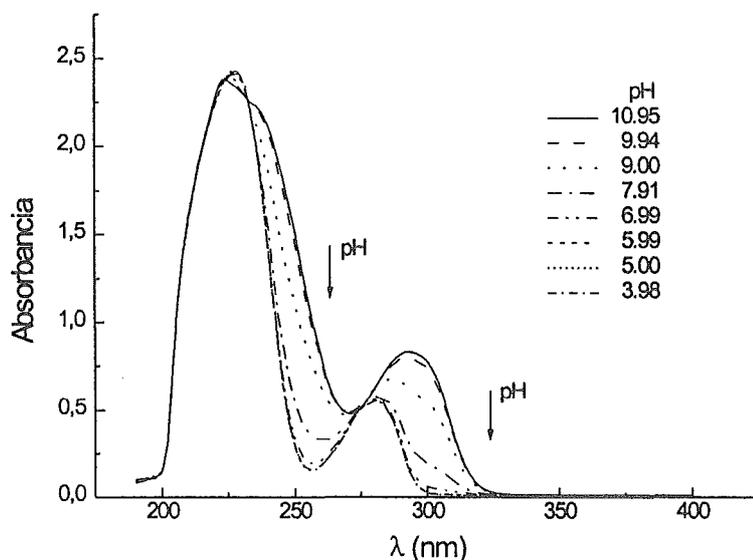


**Figura 5.2.** Espectros UV-VIS de la TC  $3.57 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal 0.032 M y NaCl 0.1 M titulada con NaOH 2.0 M. Los espectros fueron registrados a cada 0.3 unidades de pH, en el intervalo de pH de 4.00 a 11.01. En la figura la absorbancia crece conforme aumenta el pH.

En la Figura 5.2 se observa que el máximo a 280 nm se desplaza a longitudes de onda más altas, a 295 nm, conforme la TC va de pH's ácidos a alcalinos. La Figura 5.3 muestra el proceso en el cual la TC va de pH's alcalinos a ácidos, a pH's ácidos el espectro de la TC recupera su forma, indicando así que las modificaciones espectrales de la TC son función de un proceso de deprotonación-protonación reversible.

Para la determinación espectrofotométrica de los  $pK_a$ 's de la TC se eligieron tres longitudes de onda, aquellas en las cuales se detectaron los cambios de absorbancia más grandes. Las Figuras 5.4a, 5.4b y 5.4c muestran los cambios de absorbancia

observados en función de pH a las longitudes de onda de 254, 290 y 298 nm, respectivamente. Estas gráficas presentan también los puntos correspondientes al proceso de retitulación de la TC con HCl, en las cuales puede observarse la coincidencia a lo largo del intervalo de pH estudiado. El Apéndice B (Tablas B.28 y B.29) presenta las absorbancias observadas en función del pH para las tres longitudes de onda analizadas, para el proceso de titulación con NaOH y retitulación con HCl.



**Figura 5.3.** Espectros UV-VIS de la TC  $3.57 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal 0.032 M y NaCl 0.1 M (disolución obtenida de la titulación con NaOH 2.0 M), se presentan los espectros UV-VIS obtenidos de la retitulación con HCl 5.0 M. Los espectros fueron registrados a aproximadamente cada unidad de pH, en el intervalo de pH de 11.01 a 3.98. En la figura la absorbancia decrece conforme disminuye el pH.

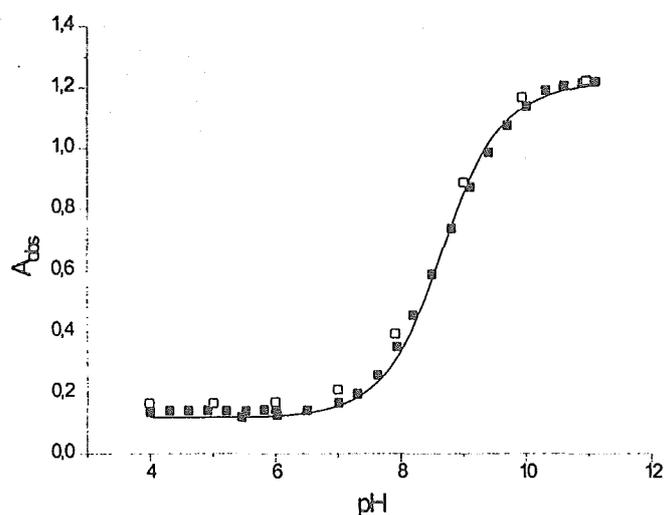


Figura 5.4a. Curva de titulación de la TC  $3.57 \times 10^{-5}$  M en disolución amortiguadora universal con NaOH 2.0 M (puntos sólidos) y retitulación de la misma disolución con HCl 5 M (puntos abiertos), absorbancia observada a  $\lambda = 254$  nm. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales para el cálculo de los  $pK_a$ 's de la TC mostrados en la Tabla 5.1.

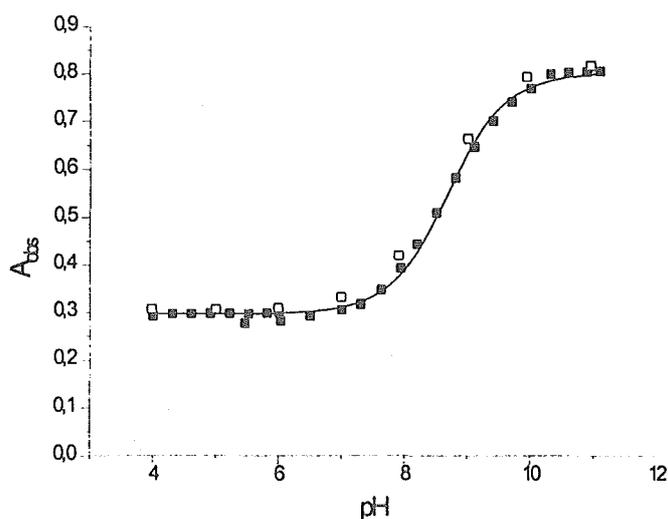


Figura 5.4b. Curva de titulación de la TC  $3.57 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal con NaOH 2.0 M (puntos sólidos) y retitulación de la misma disolución con HCl 5.0 M (puntos abiertos), absorbancia observada a  $\lambda = 290$  nm. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales para el cálculo de los  $pK_a$ 's de la TC mostrados en la Tabla 5.1.

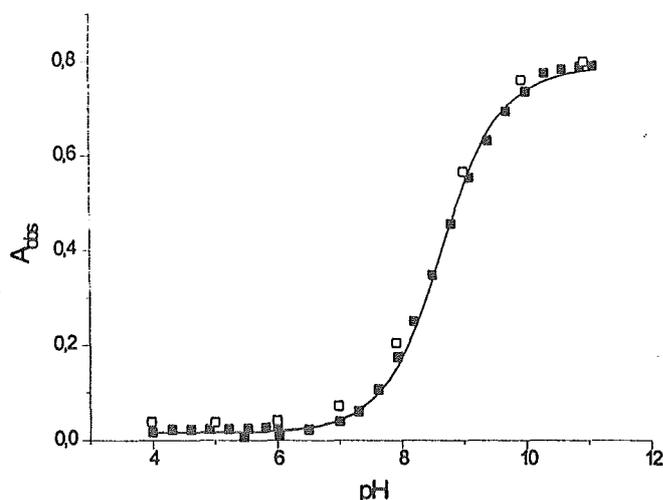
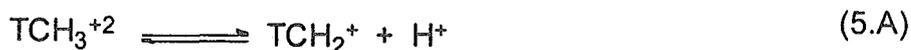


Figura 5.4c. Curva de titulación de la TC  $3.57 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal con NaOH 2.0 M (puntos sólidos) y retitulación de la misma disolución con HCl 5.0 M (puntos abiertos), absorbancia observada a  $\lambda = 298$  nm. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales para el cálculo de los  $pK_a$ 's de la TC mostrados en la Tabla 5.1.

Para el cálculo de los  $pK_a$ 's de la TC a partir de los datos experimentales hay que considerar que la TC tiene tres grupos ionogénicos susceptibles de ionización y por lo tanto se deben plantear tres equilibrios, los cuales involucran tres ionizaciones sucesivas de la TC.



Las constantes de acidez para los equilibrios (5.A), (5.B) y (5.C) son:

$$K_{a1} = \frac{[TCH_2^+][H^+]}{[TCH_3^{+2}]} \quad (5.1)$$

$$K_{a2} = \frac{[TCH][H^+]}{[TCH_2^+]} \quad (5.2)$$

$$K_{a3} = \frac{[TC^-][H^+]}{[TCH]} \quad (5.3)$$

Se considera que la absorbancia observada ( $A_{obs}$ ) es igual a suma de las absorbancias de cada una de las especies presentes. Para el análisis de los datos experimentales se expresa la  $A_{obs}$  en función de la concentración total de TC  $[TC]_T$  y la  $[H^+]$ , las únicas concentraciones conocidas, empleando las ecuaciones de balance de masa correspondientes. La ecuación final (ver Apéndice A.1) tiene la forma de la ecuación (5.4):

$$A_T = \frac{\frac{\varepsilon_1 \cdot 10^{-3X}}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_2 \cdot 10^{-2X}}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_3 \cdot 10^{-X}}{K_{a3}} + \varepsilon_4}{\frac{1}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{1}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{1}{K_{a3}} + 1} \cdot [TC]_T \quad (5.4)$$

donde  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $\varepsilon_3$  y  $\varepsilon_4$  son los coeficientes de absorbancia de las especies  $TCH_3^{+2}$ ,  $TCH_2^+$ ,  $TCH$  y  $TC^-$ , respectivamente y  $X = \text{pH}$  al cual se registró el espectro UV-VIS.

La Tabla 5.1 presenta los  $\text{pK}_a$ 's de la TC determinados en este trabajo y los publicados en la literatura para comparación.

**Tabla 5.1.** Valores de  $\text{pK}_a$ 's para la tubocurarina a 25 °C <sup>a</sup>.

Determinación	$\text{pK}_{a1}$ (O6)	$\text{pK}_{a2}$ (O2)	$\text{pK}_{a3}$ (N2)
Barlow <i>et al.</i> [1982]	7.6	8.65	9.65
Este trabajo a $\lambda = 254 \text{ nm}$	$7.15 \pm 0.52$	$8.66 \pm 0.06$	$10.27 \pm 0.44$
Este trabajo a $\lambda = 290 \text{ nm}$	$7.10 \pm 0.57$	$8.68 \pm 0.05$	$10.42 \pm 0.35$
Este trabajo a $\lambda = 298 \text{ nm}$	$7.24 \pm 0.47$	$8.66 \pm 0.05$	$10.10 \pm 0.46$
<b>Promedio (este trabajo)</b>	<b><math>7.16 \pm 0.52</math></b>	<b><math>8.67 \pm 0.05</math></b>	<b><math>10.29 \pm 0.42</math></b>

<sup>a</sup> Las asignaciones de los  $\text{pK}_a$ 's corresponden a las reportadas por Barlow *et al.* [1982] por medio de titulaciones electrométricas de la TC en NaCl 0.1 M. Barlow *et al.* también reporta los  $\text{pK}_a$ 's de la TC a 37°C: 7.4, 8.6 y 9.7, respectivamente. Ver la numeración de protones en la Figura 2.23 en el Capítulo 2).

En la Tabla 5.1 se observa que los valores de los  $pK_a$ 's determinados en este trabajo a diferentes longitudes de onda son consistentes. Comparando con los reportados en la literatura observamos que el valor del  $pK_{a1}$  es más bajo, hay un buen acuerdo para el valor de  $pK_{a2}$ , mientras que para el  $pK_{a3}$  obtuvimos un valor más alto.

### **5.3 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de emisión electrónica**

La TC presenta una fluorescencia relativamente débil con máximos de excitación y emisión en etanol a 280 y 317 nm, respectivamente [Gibson y Tumbull, 1979]. En disolución acuosa se encontró el máximo de excitación en 280 nm y el de emisión desplazado a 334 nm. La interacción de la TC con el anión altamente fluorescente, ANS fue seguida por su propia fluorescencia. Mientras que la interacción de la TC con aniones no fluorescentes fue estudiada por la fluorescencia de la TC.

La Tabla 5.2 presenta las condiciones experimentales empleadas para el estudio de las interacciones de la TC y algunos huéspedes aniónicos a pH 6.0 y 7.0, pH's en los cuales la TC se encuentra en forma dicatiónica. El Apéndice B (Tablas B.1-B.5) presenta la intensidad de fluorescencia observada de la mezcla TC-ligante para ANS, NADA, NALA, NADFA y NALFA.

En general la técnica consiste en preparar disoluciones TC-ligante en disolución amortiguadora de fosfatos 0.032 M al pH de estudio con una concentración fija de la especie fluorescente y diferentes concentraciones de la especie no fluorescente. Posteriormente se obtienen los espectros de la especie fluorescente y de cada disolución TC-ligante y se ajustan los datos experimentales obtenidos en los máximos de emisión.

**Tabla 5.2.** Condiciones experimentales para el estudio de las interacciones TC-ligante por fluorescencia.

Ligante	Fluoróforo	Máximos (nm)		Concentraciones (M)		pH
		Excitación	Emisión	TC	Huésped	
ANS	ANS	367	515	$1 \times 10^{-5}$ - $2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-6}$	6.0
NADFA / NALFA	TC	280	314 y 307	$1 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-3}$ - $4 \times 10^{-3}$	6.0
NADA / NALA	TC	280	339 y 307	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-3}$ - $3.5 \times 10^{-3}$	6.0
AB	TC	280	341 y 351	$5 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$	6.0
AS	AS	305	410	$5 \times 10^{-8}$ - $6 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-7}$ - $6 \times 10^{-7}$	7.0
APHB	TC	280	341 y 321	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$ - $4 \times 10^{-5}$	6.0

Los datos experimentales fueron ajustados con un modelo en el que se considera que la formación de un complejo TC-L con una estequiometría 1:1, de acuerdo a:



donde: TC = tubocurarina, L = ligante, TC-L = complejo tubocurarina-ligante

La constante de equilibrio,  $K$  para la formación del complejo TC-L es:

$$K = \frac{[TC-L]}{[TC][L]} \quad (5.5)$$

Se expresa la concentración en equilibrio de  $L$  en función de las concentraciones totales de  $L$  y  $TC$ , bajo la condición  $[TC] \gg [L]$  empleada en este estudio, en el cual  $[TC]$  es variable y la fluorescencia del ligante es el parámetro de medida. Debido a que se analiza el cambio de fluorescencia  $\Delta I$  i.e.,  $I_{obs}$  menos la intensidad de fluorescencia del ligante  $I_L$ , se obtiene la siguiente ecuación para el ajuste de los datos experimentales (ver Apéndice A.2):

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\infty} \cdot K \cdot [TC]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} \quad (5.6)$$

donde:  $[TC]_T$  es la concentración total de TC y  $\Delta I_{\infty} = I_{\infty} - I_0$ ,  $I_{\infty}$  e  $I_0$  corresponden a la intensidad de fluorescencia del anion enlazado a la TC y la intensidad de fluorescencia

del anion libre, respectivamente. El Apéndice A.2 presenta en forma detallada la deducción de la ecuación de ajuste.

La Figura 5.5 muestra el efecto de la TC en el espectro de fluorescencia del anion ANS. Evidentemente, la adición de TC aumenta y desplaza a longitudes de onda más cortas el máximo de fluorescencia de ANS, como es observado en la inclusión de ANS dentro de las regiones hidrofóbicas de varias moléculas anfitrión [Kanaoka, 1977; Murakami *et al.*, 1990]. El ajuste de  $\Delta I$  a la longitud de onda de emisión máxima con la ecuación (5.6) permite calcular el valor de  $K$  (Figura 5.6). Los valores de las constantes calculadas se muestran en la Tabla 5.8.

Las Figuras 5.7 y 5.8 muestran las gráficas de  $\Delta I$  vs concentración de NADFA y NADA, respectivamente, a la longitud de onda donde se observó el aumento máximo de fluorescencia inducido por el huésped. Para el ajuste de  $\Delta I$  se empleó la ecuación (5.7), la cual es una modificación de la ecuación (5.6), para el caso en el cual la concentración del huésped es variable y la fluorescencia del anfitrión es el parámetro de medida.

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\infty} \cdot K \cdot [Huesped]_T}{1 + K \cdot [Huesped]_T} \quad (5.7)$$

El análisis fluorimétrico de las interacciones de la TC con otros huéspedes aniónicos no proporcionó resultados satisfactorios ya que las señales base de los huéspedes fueron muy altas en el intervalo de las concentraciones de estudio.

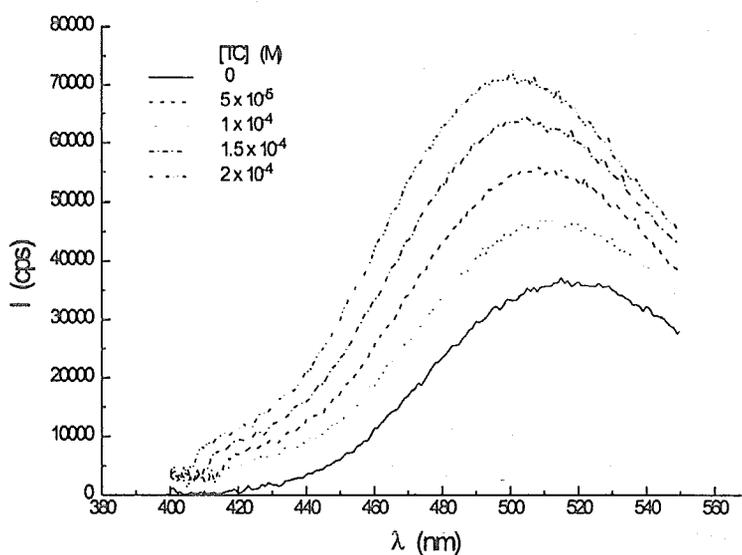


Figura 5.5. Espectros de fluorescencia de ANS  $2 \times 10^{-6}$  M (excitación a 367 nm ) a pH 6.0 en la presencia de 0,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1.5 \times 10^{-4}$  y  $2 \times 10^{-4}$  M de TC.

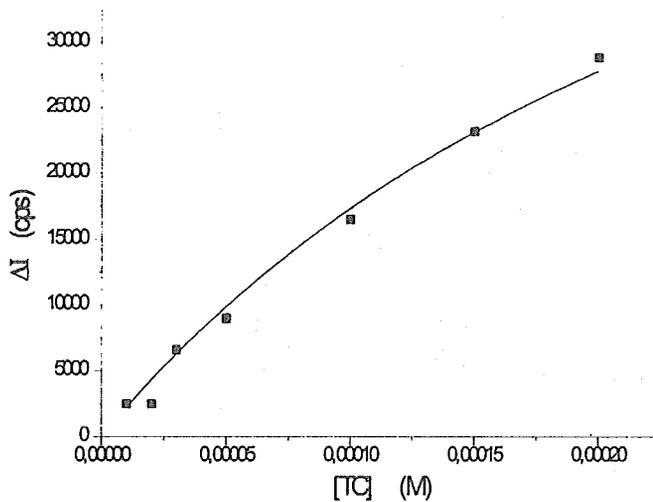


Figura 5.6. Intensidad de fluorescencia diferencial de ANS  $2 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 y emisión a 515 nm) como función de la concentración de TC a pH 6.0. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación (5.6).

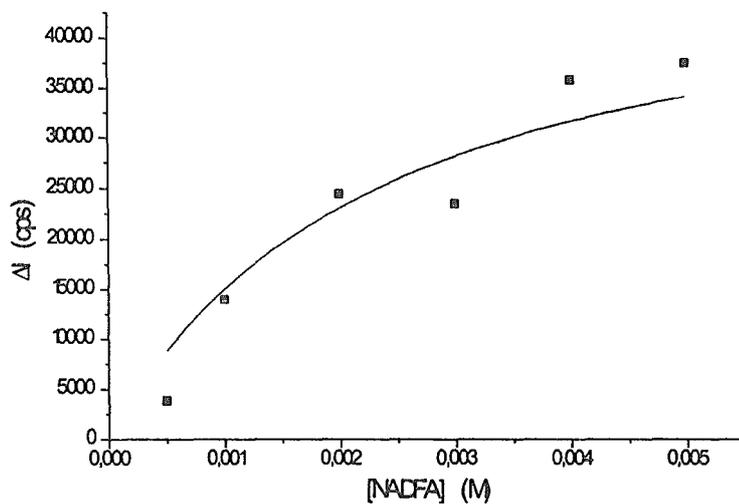


Figura 5.7. Intensidad de fluorescencia diferencial de TC  $1 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 y emisión a 314 nm) como función de la concentración de NADFA a pH 6.0. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación (5.7).

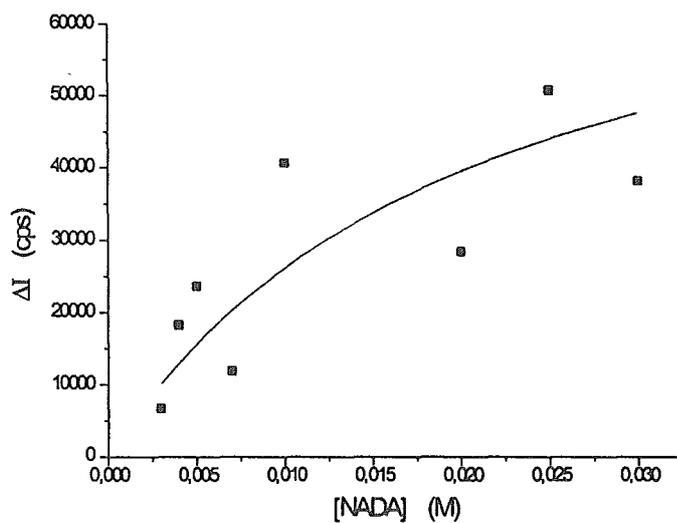


Figura 5.8. Intensidad de fluorescencia diferencial de TC  $1 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 y emisión a 339 nm) como función de la concentración de NADA a pH 6.0. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación (5.7).

## 5.4 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por conductometría

En disoluciones ácidas y neutras la TC existe en la forma dicatiónica protonada  $\text{TCH}_3^{+2}$  debido a que el primer  $\text{pK}_a$  de la TC es igual a 7.16 [este trabajo]. Esto hace posible medir sus interacciones con especies aniónicas por conductometría. Sin embargo, este método es de empleo limitado en la medición de constantes de equilibrio debido a las muchas dificultades involucradas en la interpretación de la dependencia de la conductividad con la concentración [Robinson y Stokes, 1968]. Aún así, se determinó que este método puede aplicarse en el estudio de las interacciones TC-huésped.

Todas las ecuaciones teóricas para la conductividad molar  $\Lambda$  de un electrolito no asociado pueden presentarse en forma general [Fernández-Prini y Justice, 1984] como:

$$\Lambda = \Lambda_0 - S\sqrt{I} + E \cdot I \cdot \ln I + J_1 \cdot I + J_2 \cdot I\sqrt{I} \quad (5.8)$$

la ecuación (5.8) es conocida también como la ecuación de Fuoss-Hsia [Fuoss y Hsia, 1967], donde los parámetros  $S$  y  $E$  dependen sólo del tipo de carga, movilidad iónica y propiedades del disolvente, mientras que  $J_1$  y  $J_2$  se calculan teóricamente. Esta ecuación es aplicable hasta valores de  $I$  muy altos, mayores que 0.1, pero en disoluciones más diluidas, es decir con  $I < 0.01$  M sólo los dos primeros términos de la ecuación, los cuales constituyen la ecuación límite de Onsager (A.3.14, ver Apéndice A.3), representan una aproximación satisfactoria, por ejemplo para los halogenuros de metales alcalinos, la diferencia entre los valores de  $\Lambda$  calculados con la ecuación completa y límite es 0.8% a una concentración de 0.01 M y 0.1% a una concentración de 0.03 M (la máxima utilizada en este estudio, ver abajo) claro que a concentraciones menores que 0.01 M pueden detectarse sólo constantes de asociación del orden de  $100 \text{ M}^{-1}$  o mayores, lo que representa un límite del uso de una ecuación simplificada pero una considerable incertidumbre en los cálculos de  $J_1$  y  $J_2$  hace el uso de la ecuación completa bastante problemático [Fernández-Prini, 1968].

Para calcular las constantes de enlace se empleó un procedimiento modificado de Tam y Williams [1984]. Las conductancias ( $\kappa$ ) de las sales de sodio de los aniones carboxilato NADA, NALA, NADFA, NALFA, AB, AS, AMHB, APHB, AFTL, AISFTL, ATRFTL, AFA, AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y AADIP y del cloruro de TC fueron medidas en agua en el intervalo de concentraciones mostrado en la Tabla 5.3. Los valores de las conductancias medidas se presentan en el Apéndice B (Tablas B.6-B.20).

**Tabla 5.3.** Condiciones experimentales para el estudio de las interacciones TC-ligante por conductividad.

Ligante	(Concentraciones, M) [TC] = [Ligante]
AMHB	$1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-3}$
APHB	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$
NADFA	$5 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
NALFA	$5 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
NADA	$5 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
NALA	$5 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AFA	$5 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AFTL	$1 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-3}$
AISFTL	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
ATRFTL	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AOXAL	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AMAL	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
ASUCC	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AGLUT	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$
AADIP	$1 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-3}$

El procedimiento experimental de estudio consiste en preparar disoluciones de la TC y de la especie aniónica que se analiza en forma independiente, medir la conductividad de cada especie a cada concentración. Después preparar una disolución que contenga ambas especies a la misma concentración que las que se prepararon independientemente y medir la conductividad.

En todos los casos la conductividad molar de las sales empleadas fue una función lineal de la raíz cuadrada de la fuerza iónica con una pendiente negativa de acuerdo a la forma límite de la ecuación de Onsager [Robinson y Stokes, 1968]. Así las

conductancias de las mezclas 1:1 del cloruro de TC y las sales de sodio de los aniones fueron medidas en el mismo intervalo de concentración y las diferencias entre las conductancias calculadas y observadas de estas mezclas ( $\Delta\kappa$ ) fueron graficadas vs la concentración total de TC (o huésped) y ajustadas a la ecuación teórica (5.9).

$$\Delta\kappa = \Delta\Lambda_0 \cdot \left( [TC]_T + \frac{0.5}{K} - \sqrt{\frac{[TC]_T}{K} + \frac{0.25}{K^2}} \right) + f \cdot (I) \quad (5.9)$$

donde  $[TC]_T$  es la concentración total de  $[TC]Cl_2$ ,  $K$  es la constante de enlace,  $\Delta\Lambda_0$  es la suma de conductividades molares del catión TC y un anion carboxilato a dilución infinita, suma a la cual se resta la conductividad molar del complejo a dilución infinita, y  $f(I)$  es un término de corrección el cual toma en cuenta la dependencia de la conductancia con la fuerza iónica de acuerdo a la ecuación de Onsager. El Apéndice A.3 presenta la deducción y empleo de la ecuación (5.9) para el cálculo de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por conductividad.

La Figura 5.9 muestra las gráficas de  $\Delta\kappa$  vs la concentración de TC para los huéspedes NADA, NALA, NADFA, NALFA, AMHB, APHB, AFTL, AISFTL, ATRFTL, AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y AADIP. El ajuste de estas gráficas con la ecuación (5.9) permite calcular las constantes de enlace mostradas en la Tabla 5.8. Los resultados obtenidos con los aniones AB y AS fueron poco reproducibles.

Las ecuaciones para el análisis de las interacciones TC-huésped fueron derivadas suponiendo una estequiometría 1:1. El ajuste satisfactorio de los resultados experimentales de estas ecuaciones es indicativo de que esta suposición es correcta. Para confirmar esta estequiometría fueron estudiados conductométricamente las interacciones de la TC con NADFA, APHB y ATRFTL por el método de Job.

El método de Job o de variaciones continuas proporciona la relación  $n/m$ , donde  $n$  y  $m$  corresponden al número de moléculas del sustrato y ligante, respectivamente en el complejo. El procedimiento experimental consiste en preparar una serie de disoluciones del sustrato y del ligante con la condición de que la suma de las

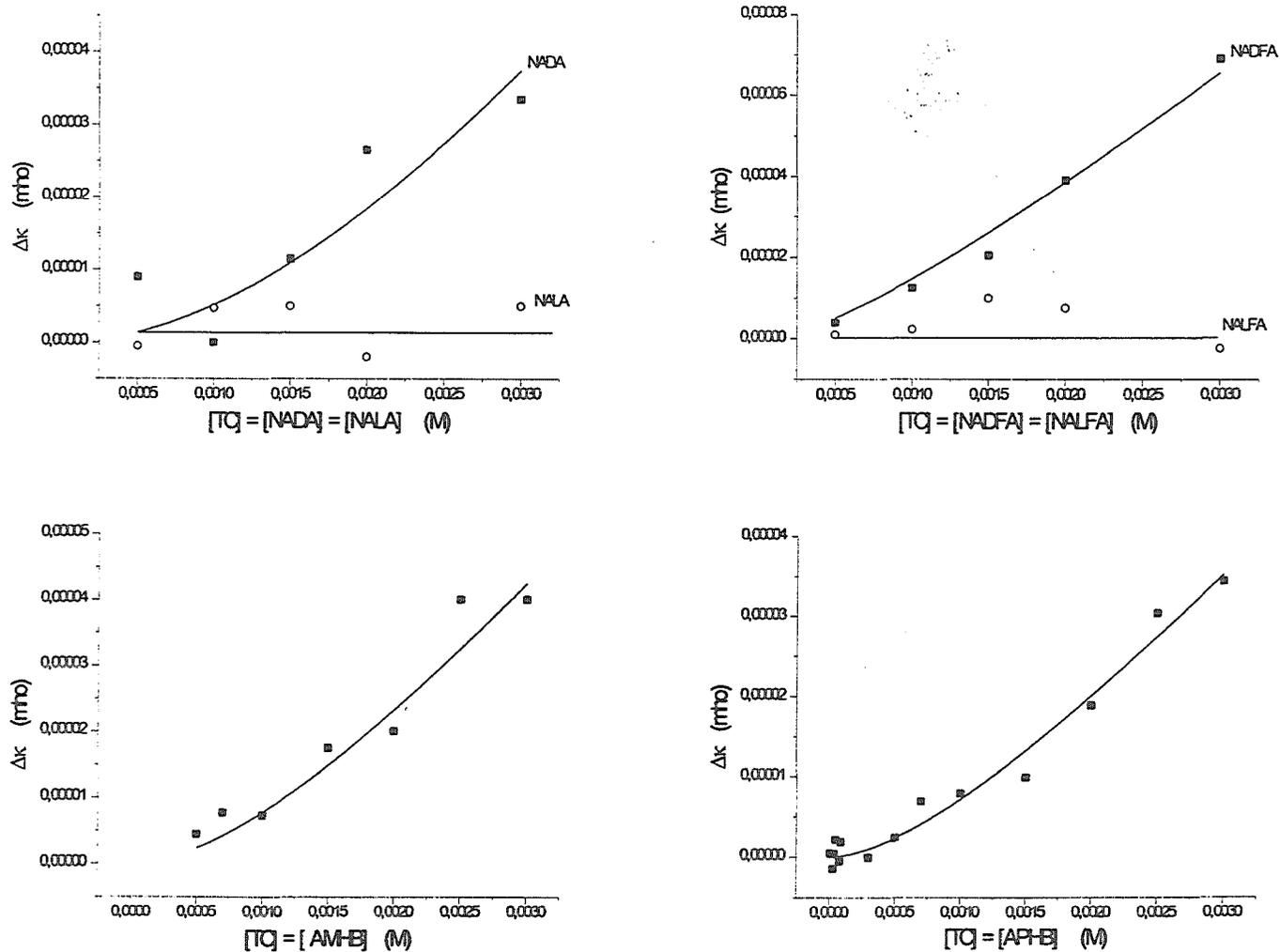


Figura 5.9. Gráficas que muestran las diferencias entre las conductancias calculadas y observadas de mezclas 1:1 de la TC y los aniones NADA, NALA, NADFA, NALFA, AMHB, APHB, AFTL, AISFTL, ATRFTL, AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y AADIP. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (5.9) y las constantes de enlace obtenidas se presentan en la Tabla 5.8.

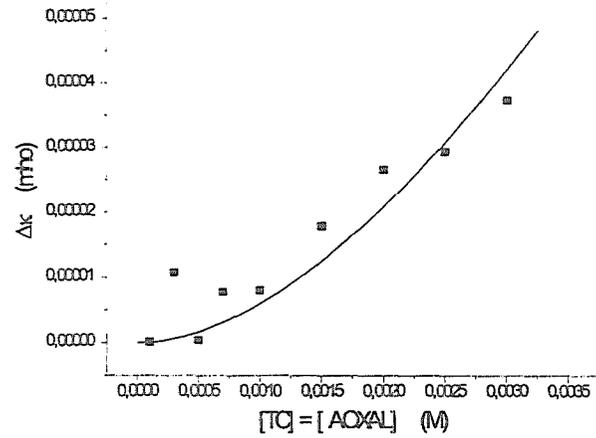
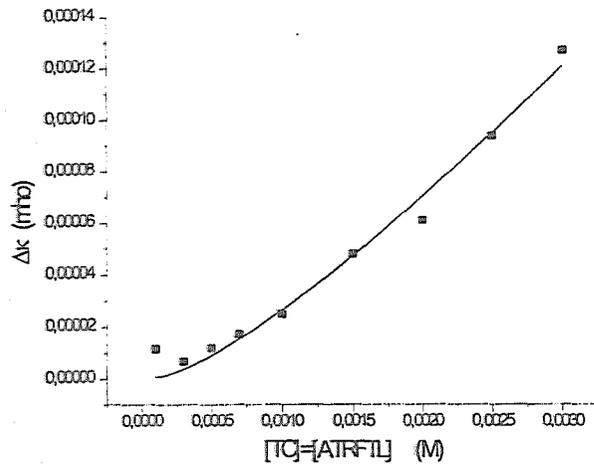
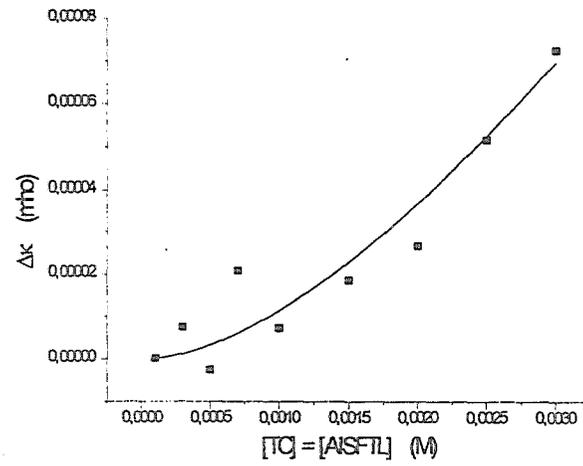
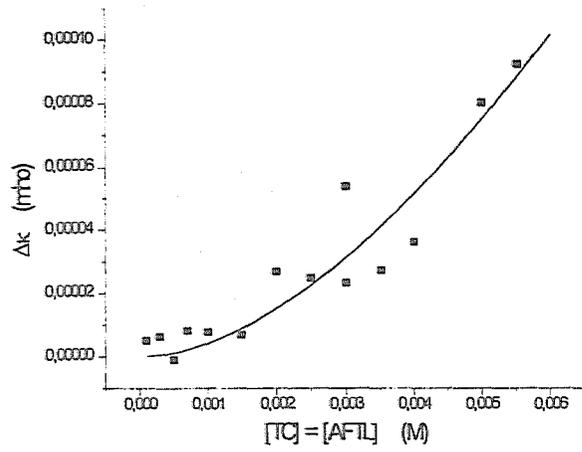


Figura 5.9. Continuación.

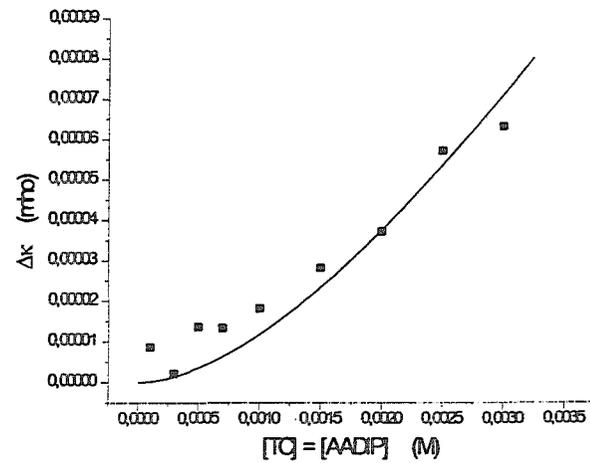
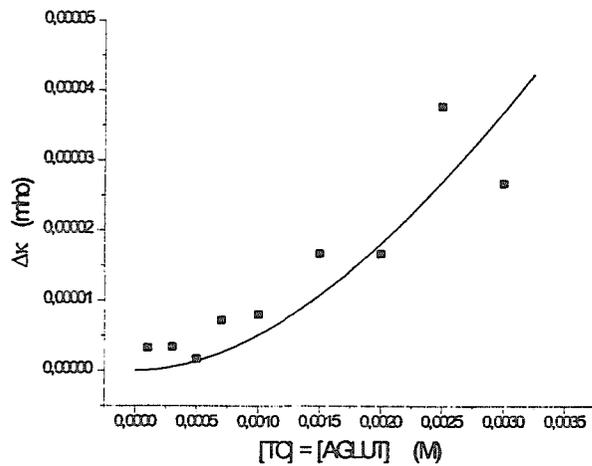
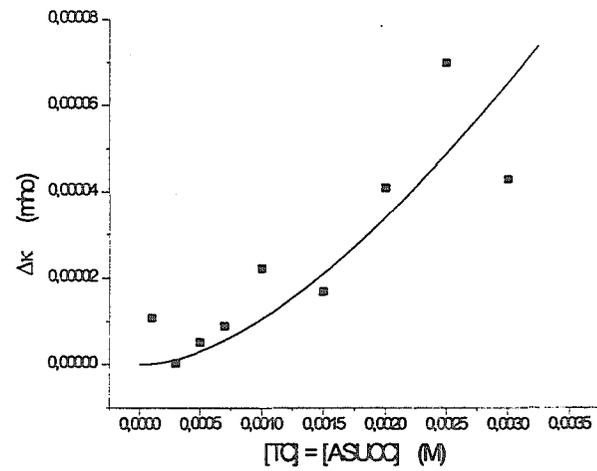
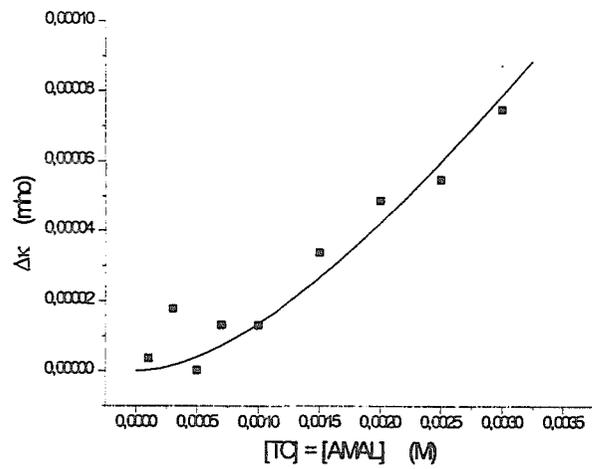


Figura 5.9. Continuación.

concentraciones totales de ambas especies sea constante y se mide alguna propiedad física. El análisis de los resultados experimentales consiste en graficar la diferencia de esa propiedad observada en la mezcla menos la observada en ausencia de complejación vs fracción molar del ligante. Así, se determina de la gráfica el valor máximo o mínimo de la fracción molar. Si ese valor está alrededor de 0.5 se tiene un complejo 1:1. La agudeza del máximo o mínimo y la exactitud con la cual puede determinarse el valor de la fracción molar depende la magnitud de la constante de enlace [Connors, 1987].

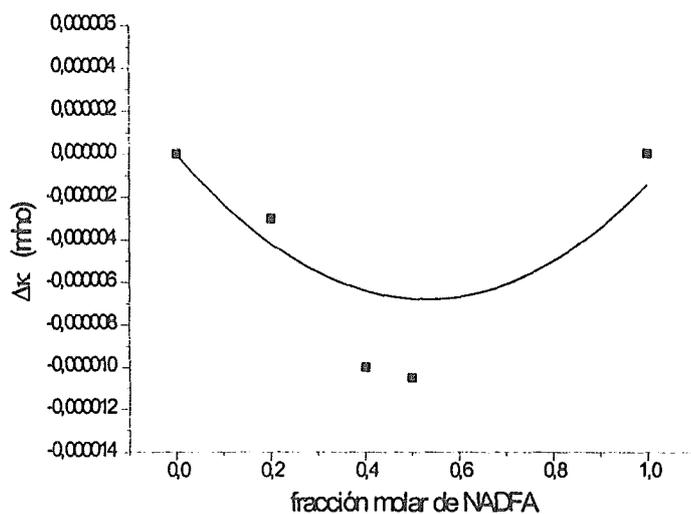
La Tabla 5.4 presenta las condiciones experimentales empleadas para determinación de la estequiometría de los complejos por el método de Job, para el cual se consideró una suma constante de concentraciones de 0.005 M. El Apéndice B (Tablas B.21-B.23) presenta las conductividades observadas, calculadas y su diferencia para los ligantes NADFA, APHB y ATRFTL y las Figuras 5.10a, 5.10b, 5.10c muestran las gráficas de Job correspondientes. El análisis de los resultados obtenidos (ajustados por una ecuación polinomial) muestra claramente la formación de complejos 1:1 en todos los casos.

Vale mencionar que en el experimento en el que se empleó el método de Job la concentración total del electrolito es constante y la desviación de aditividad observada no puede atribuirse al cambio de fuerza iónica y, entonces, seguramente refleja la formación de asociados.

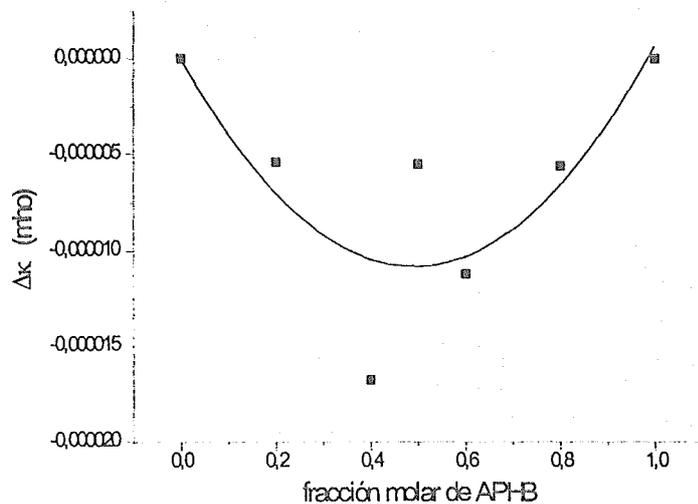
**Tabla 5.4.** Condiciones experimentales para la determinación conductométrica de la estequiometría de los complejos TC-ligante.

[TC] (M)	[Ligante] <sup>a</sup> (M)	f <sup>b</sup> Ligante <sup>b</sup>
$5.0 \times 10^{-3}$	0.0	0.0
$4.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	0.2
$3.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	0.4
$2.5 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3}$	0.5
$2.0 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-3}$	0.6
$1.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	0.8
0.0	$5.0 \times 10^{-3}$	1.0

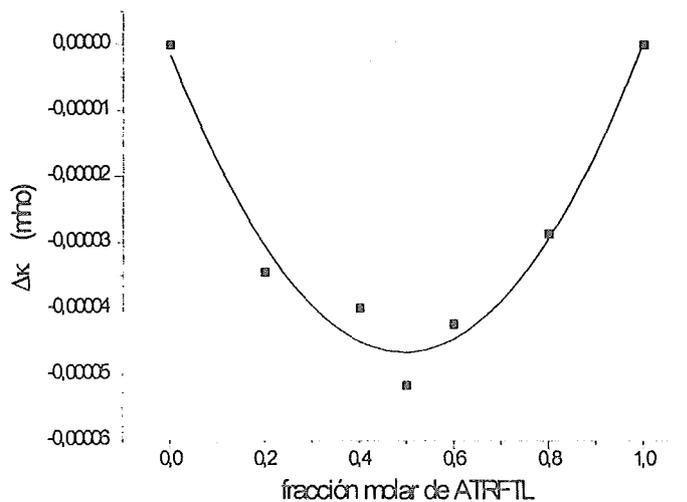
<sup>a</sup> Los ligantes estudiados fueron NADFA, APHB y ATRFTL. <sup>b</sup> Fracción molar del ligante =  $[L]_T / ([TC]_T + [L]_T)$



**Figura 5.10a.** Gráfica de Job para la interacción de TC con el anión NADFA.  $[TC] + [NADFA]=0.005$  M,  $\Delta\kappa$  es la diferencia entre las conductancias observadas y calculadas por interpolación lineal de las conductancias de la mezcla.



**Figura 5.10b.** Gráfica de Job para la interacción de TC con el anion APHB.  $[TC] + [APHB]=0.005$  M,  $\Delta\kappa$  es la diferencia entre las conductancias observadas y calculadas por interpolación lineal de las conductancias de la mezcla.



**Figura 5.10c.** Gráfica de Job para la interacción de TC con el anion ATRFTL.  $[TC] + [ATRFTL]=0.005$  M,  $\Delta\kappa$  es la diferencia entre las conductancias observadas y calculadas por interpolación lineal de las conductancias de la mezcla.

## 5.5 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por resonancia magnética protónica

Para determinar las regiones de interacción de la TC con algunos de los huéspedes estudiados se obtuvieron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las mezclas 1:1 de TC  $5 \times 10^{-3}$  M con AB, AS, AMHB, APHB, NADFA y NALFA. Para determinar las constantes de asociación TC-ligante se tituló una solución de TC  $5 \times 10^{-4}$  M en  $\text{D}_2\text{O}$  con soluciones concentradas del ligante, *i.e.*, AB, AS, AMHB o APHB, para obtener concentraciones finales en el tubo en el intervalo de concentraciones mostrado en la Tabla 5.5.

**Tabla 5.5.** Condiciones experimentales para la obtención de las constantes de asociación TC-ligante por RMN  $^1\text{H}$  ( $[\text{TC}] = 5 \times 10^{-4}$  M)<sup>a</sup>.

Ligante	(Concentraciones, M) [Ligante]
AB	$9.1 \times 10^{-4} - 2.86 \times 10^{-3}$
AS	$1.96 \times 10^{-4} - 3.98 \times 10^{-3}$
AMHB	$4.8 \times 10^{-4} - 1.7 \times 10^{-3}$
APHB	$5.26 \times 10^{-4} - 2.8 \times 10^{-3}$

<sup>a</sup> Sólo para el estudio de la interacción TC-APHB se empleó  $[\text{TC}] = 1 \times 10^{-3}$  M

La Figura 5.11 presenta el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la TC en  $\text{D}_2\text{O}$ . Las Figuras 5.12–5.15 muestran los espectros de las mezclas 1:1 TC:ligante y la Tabla 5.6 presenta los cambios de desplazamiento químico ( $\Delta\delta = \delta_{\text{TC-ligante}} - \delta_{\text{TC}}$ ) como resultado de la complejación. En la Tabla 5.6 se observa que los  $\Delta\delta$ 's máximos se presentan, en todos los sustratos analizados, en los protones H1, H16, H18a, H18b y H36a (ver Figura 2.23) principalmente, lo cual indica contactos o interacciones similares. Es importante señalar que aún cuando los protones que presentan los  $\Delta\delta$ 's máximos coinciden para NADFA y NALFA, la magnitud del cambio es mayor para NALFA que para NADFA, efecto que no se refleja en las constantes de enlace determinadas por fluorometría y conductometría, como veremos más adelante.

Comparando los espectros de la TC libre y en la mezcla 1:1 con los ligantes (Figuras 5.11–5.15) se observa pérdida de la estructura fina, *i.e.*, señales más amplias para los hidrógenos H3, H36b, H18a, H37, H19, H33, H16, H13, H14 y H35/17, para todos los sustratos en el siguiente orden decreciente AMHB > APHB > AB > AS > NADFA/NALFA. Por la mayor perturbación de las señales en el caso del AMHB se esperaría una interacción más fuerte con este ligante.

**Tabla 5.6.** Cambios de desplazamiento químico observados, [TC] = [ligante] =  $5 \times 10^{-3}$  M<sup>a</sup>.

LIGAN-TE	H1	H2	H3	H14	H16	H18a	H18b	H19	H20	H21	H33
AB	-0.019	-0.016	-0.011	<sup>b</sup>	-0.052	-0.045	<sup>b</sup>	-0.025	-0.019	-0.012	-0.019
AS	+0.007	-0.009	-0.020	<sup>b</sup>	-0.058	-0.066	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	-0.018	-0.009	-0.018
AMHB	-0.010	-0.004	-0.007	<sup>b</sup>	-0.024	-0.050	<sup>b</sup>	-0.019	-0.010	-0.003	-0.013
APHB	+0.004	-0.009	-0.003	-0.011	-0.068	-0.055	-0.042	-0.018	-0.012	-0.007	-0.012
NADFA	-0.019	-0.003	-0.007	-0.010	-0.033	-0.015	-0.015	-0.014	-0.007	-0.003	-0.007
NALFA	-0.032	-0.007	-0.008	-0.018	-0.044	-0.034	-0.025	-0.022	-0.013	-0.007	-0.017

<sup>a</sup> Ver la Figura 2.23 para la numeración de protones. <sup>b</sup> Traslapo de señales.

**Tabla 5.6.** (Continuación).

LIGAN-TE	H35 / H17	H36a	H36b
AB	-0.021	-0.022	-0.019
AS	-0.003	<sup>b</sup>	-0.008
AMHB	-0.009	<sup>b</sup>	-0.014
APHB	-0.002	-0.010	-0.014
NADFA	-0.020	-0.018	-0.013
NALFA	-0.020	-0.043	-0.020

La Figura 5.16 muestra los espectros correspondientes a la titulación de la TC con AS (como ejemplo). El Apéndice B (Tablas B.24-B.27) presenta los  $\Delta\delta$ 's en función de la concentración para aquellos protones con  $\Delta\delta$ 's máximos y la Figura 5.17 muestra las gráficas correspondientes.

Algunos cambios de desplazamiento químico inducidos por la molécula huésped en los protones de la TC fueron empleados para determinar las constantes de enlace con la ecuación (5.10), modificación de la ecuación (5.7).

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\infty} \cdot K \cdot [Huesped]}{1 + K \cdot [Huesped]} \quad (5.10)$$

Donde  $\Delta\delta_{\infty}$  es el cambio de desplazamiento infinito, valor límite de las gráficas de  $\Delta\delta$  vs concentración de la molécula huésped y  $K$  es la constante de enlace. Este método permite calcular las constantes de enlace para el AB y AS, las cuales no se pudieron determinar por otros métodos. La constante de enlace del AMHB determinada por titulación RMN es cercana a la encontrada por conductometría dentro del error experimental. En el caso del APHB las constantes de enlace calculadas de los desplazamientos de las señales inducidos por diferentes protones por el huésped varían en el límite de 200 a 600 M<sup>-1</sup>. Esto puede indicar una estequiometría más compleja de interacción de este anion con la TC, lo cual no se manifiesta en las gráficas de  $\Delta\kappa$  vs concentración de la TC (Figura 5.9).

La ecuación (5.10) permite también calcular los cambios de desplazamiento químico máximos ( $\Delta\delta_{\infty}$ ) inducidos por complejación (CIS) en los protones de la TC por las moléculas huésped estudiadas. Los valores CIS se calculan como los valores límite de las gráficas de cambio de desplazamiento químico vs concentración de la moléculas huésped. La Tabla 5.7 presenta los valores CIS de algunos protones de la TC calculados para sus interacciones con AB, AS, AMHB y APHB.

Tabla 5.7. Desplazamientos químicos de los protones de la TC inducidos por complejación (-CIS)<sup>a</sup> de la TC con diferentes moléculas huésped.

Protón	AB	AS	AMHB	APHB
H21	0.051	0.044	0.005	0.01
H19	0.106	- <sup>b</sup>	0.066	0.031
H33	0.081	0.088	0.045	0.02
H35	0.09	0.015	0.031	0.005
H36a	0.093	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	0.017
H36b	0.081	0.039	0.049	0.04
H3	0.047	0.098	0.024	0.005
H16	0.221	0.284	0.23	0.136
H18a	0.191	0.323	0.175	0.093
H37	> 0.17	0.10	> 0.22	0.074
H20	0.081	0.088	0.035	0.031
H1	0.068	0.044	0.014	0.01
H2	0.081	0.03	0.035	0.005

<sup>a</sup> Calculados como los valores límite de las gráficas de cambio de desplazamiento químicos vs concentración de la molécula huésped. Las señales fueron asignadas de acuerdo a Fraenkel *et al.* [1994].

<sup>b</sup> Traslape de señales.

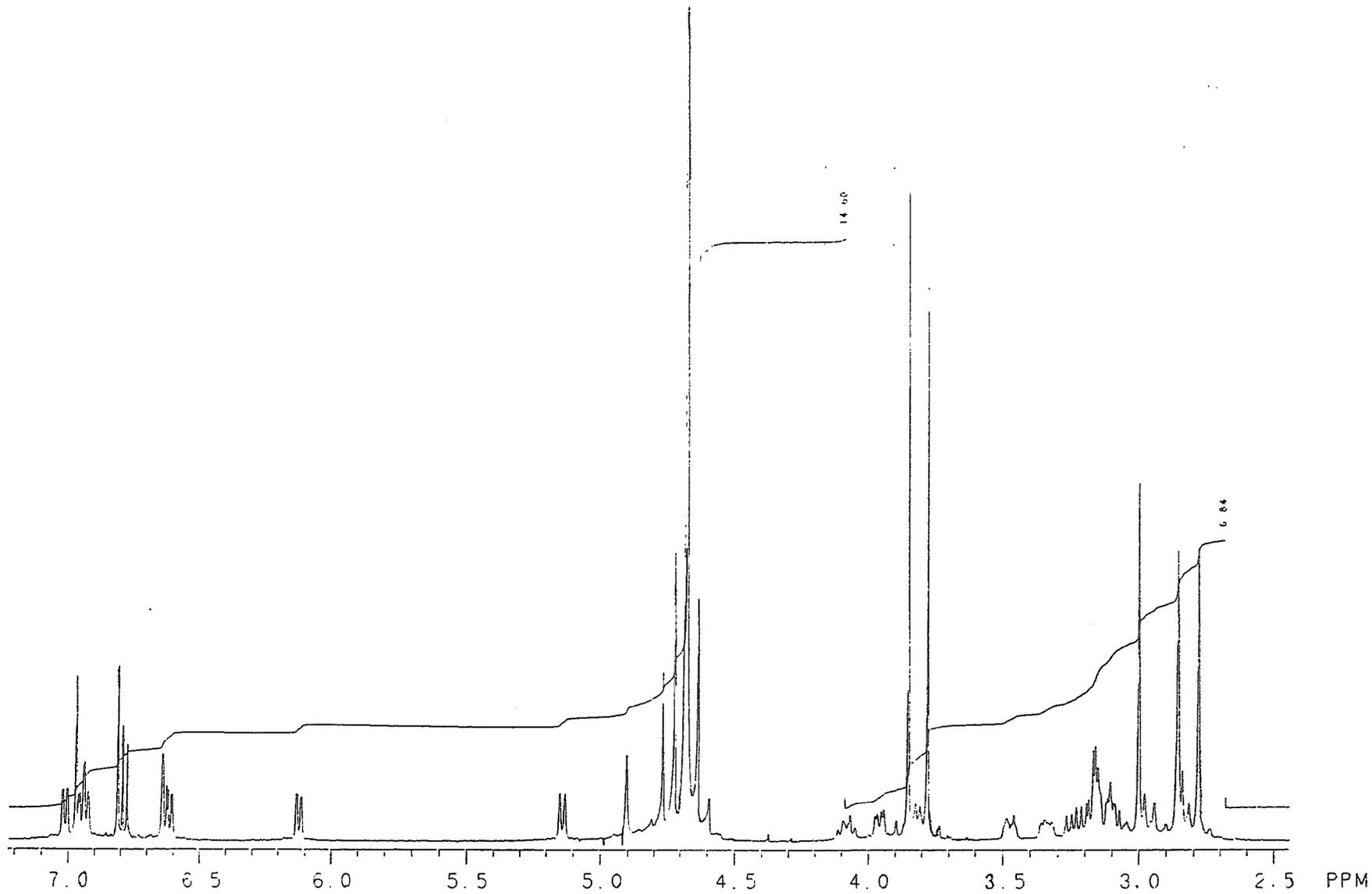


Figura 5.11. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la TC en  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $[\text{TC}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

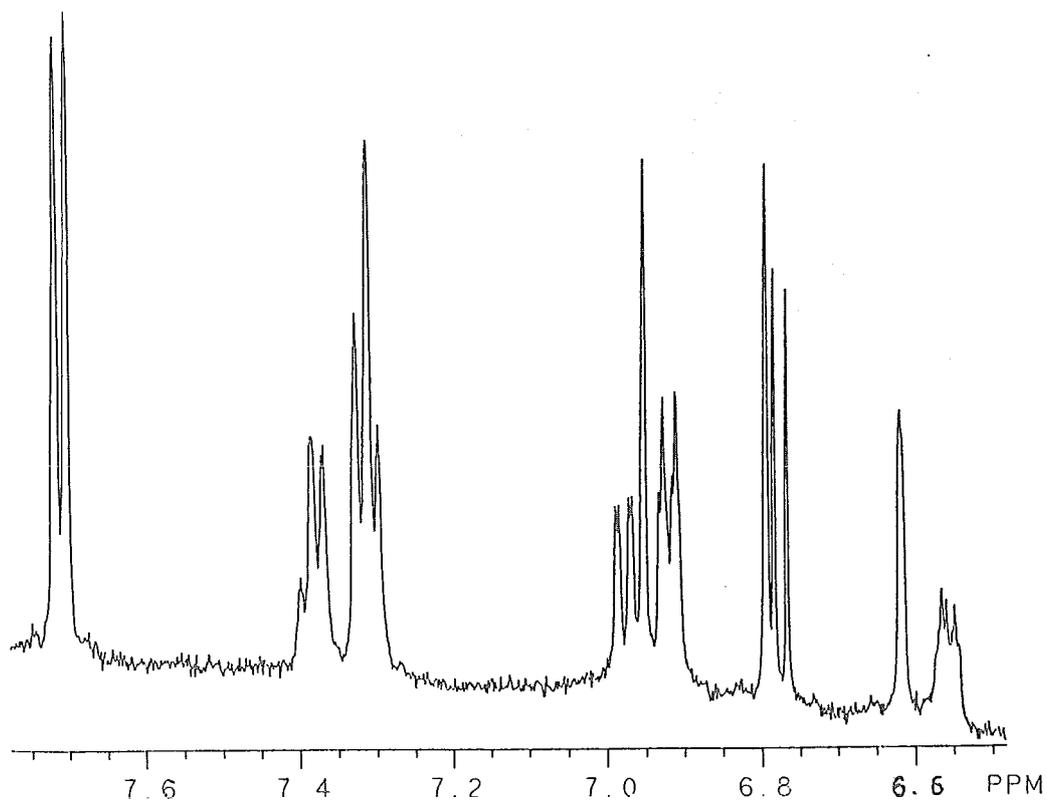
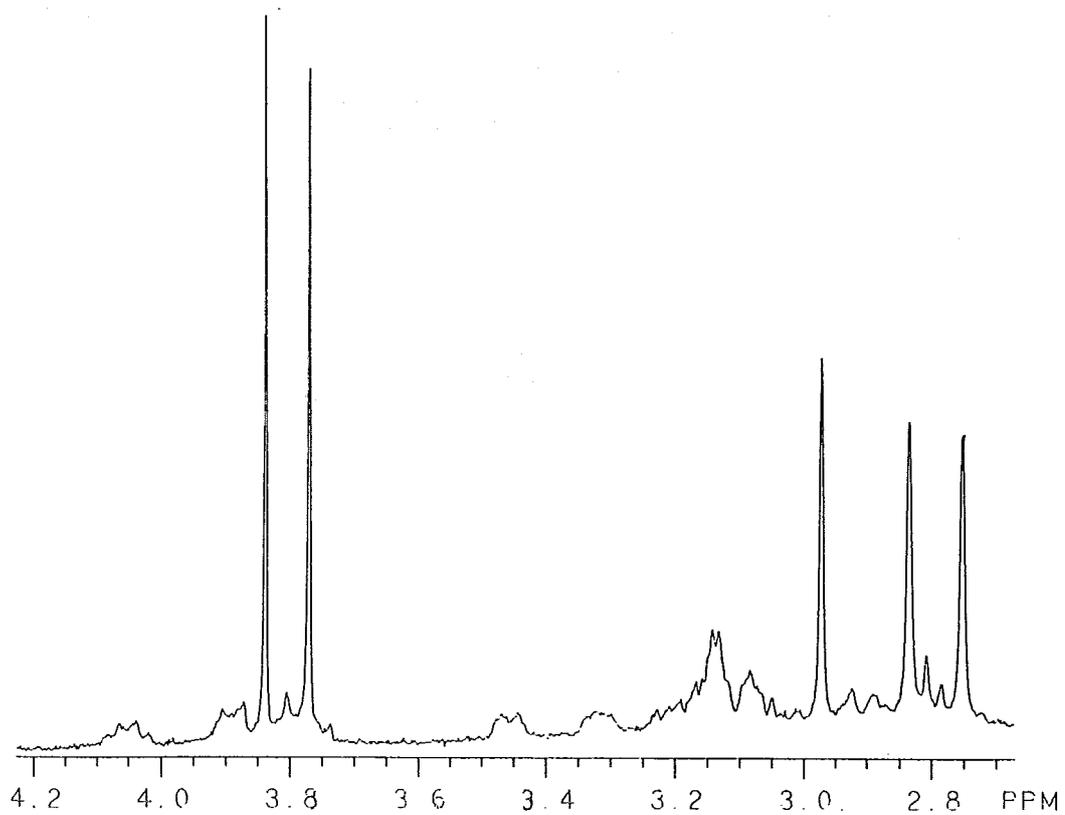


Figura 5.12. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de las mezclas 1:1 de  $5 \times 10^{-3}$  M de la TC y AB.

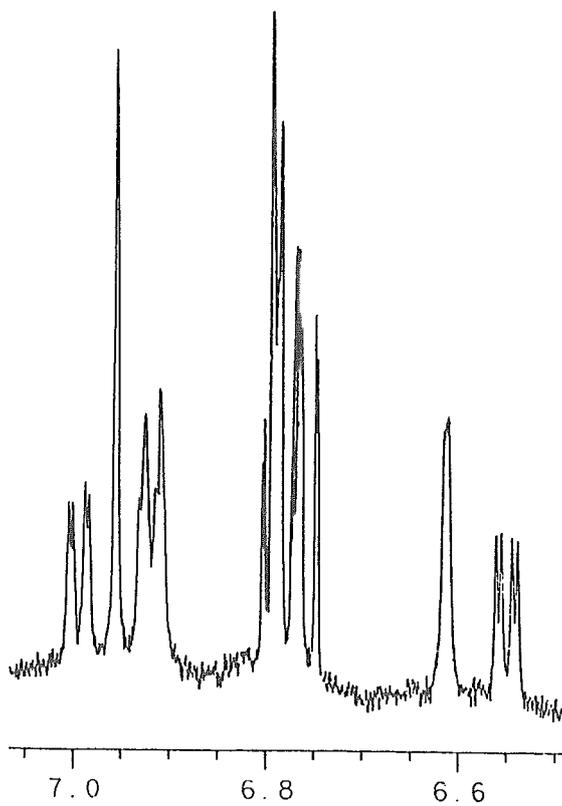
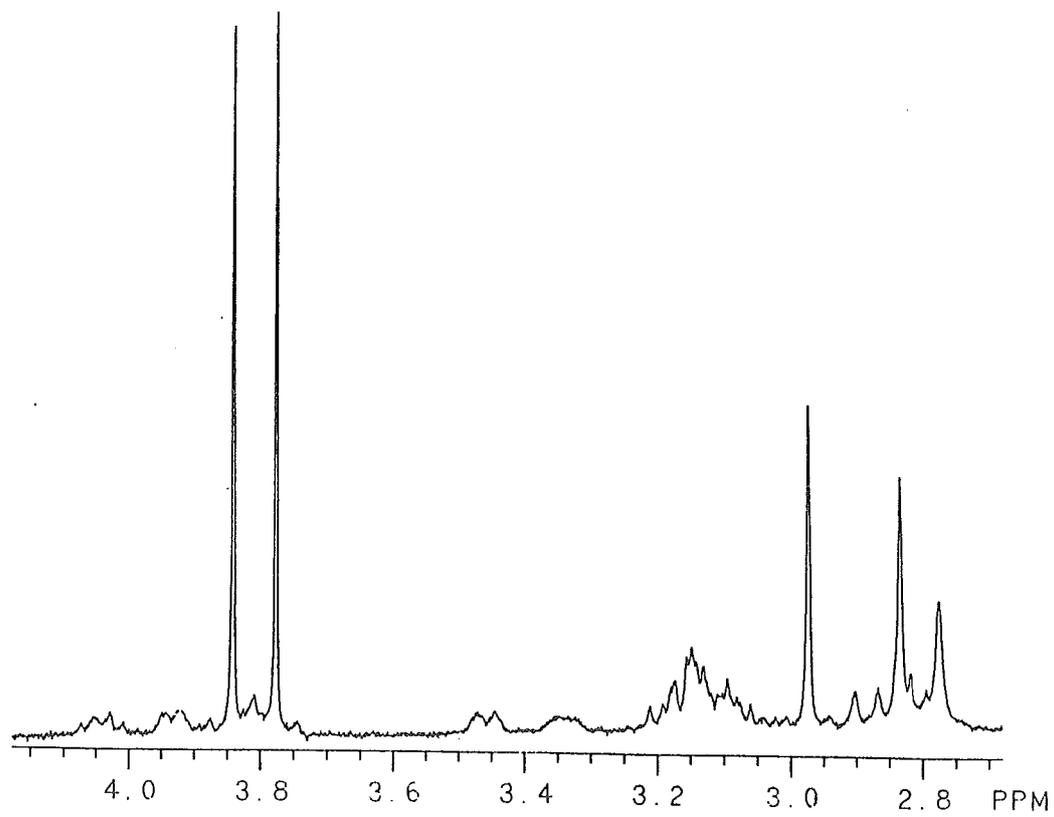


Figura 5.13. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de las mezclas 1:1 de  $5 \times 10^{-3}$  M de la TC y AS.

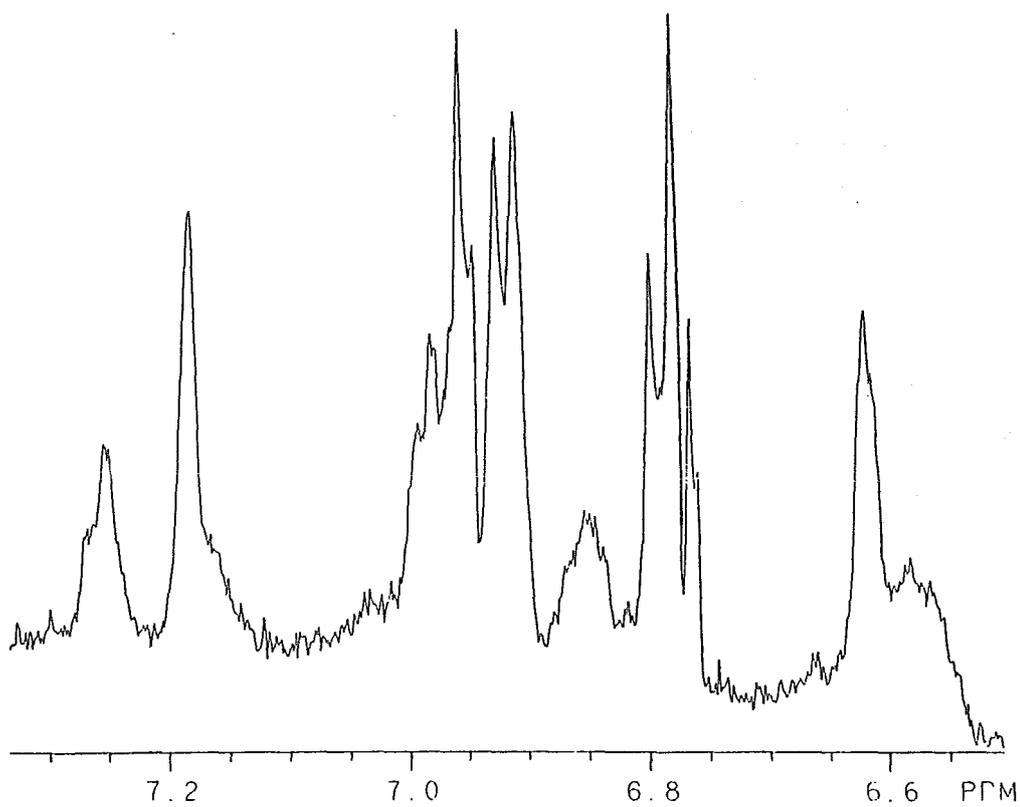
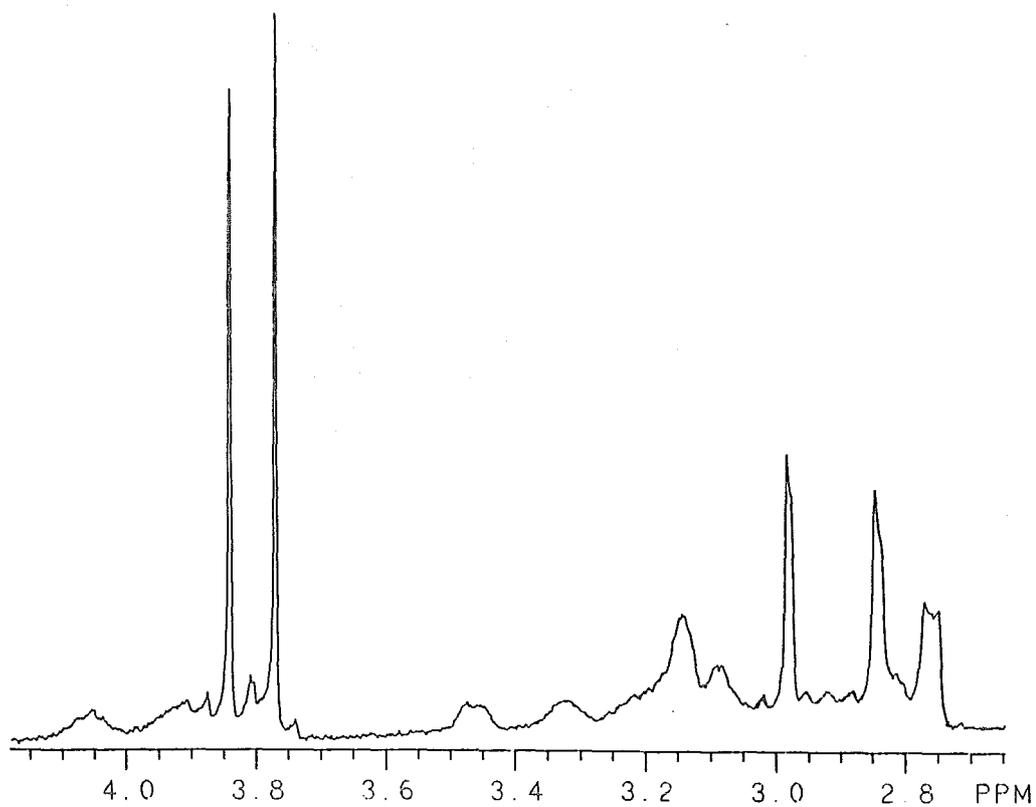


Figura 5.14. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de las mezclas 1:1 de  $5 \times 10^{-3}$  M de la TC y AMHB.

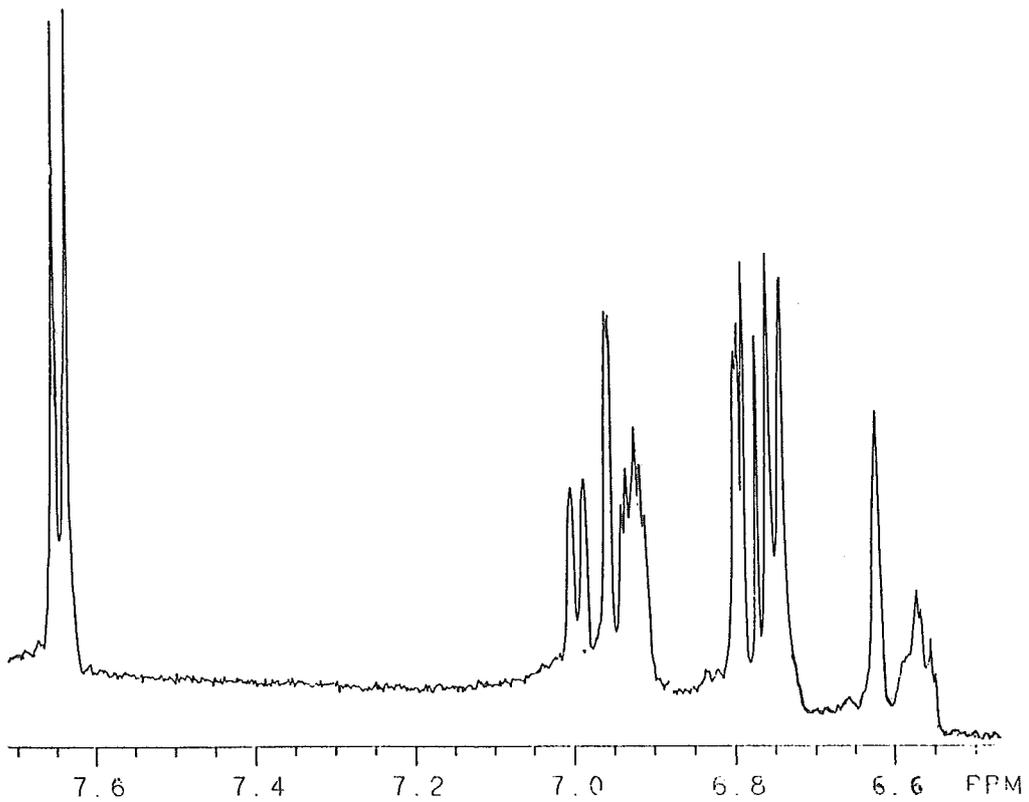
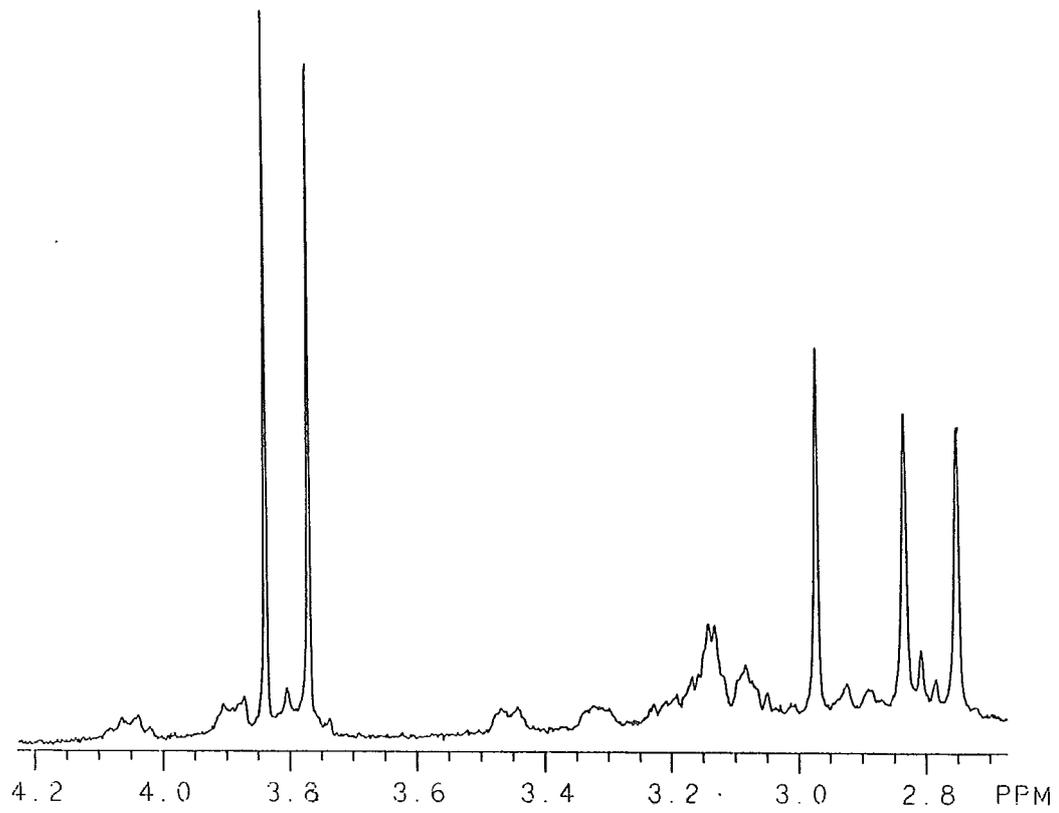


Figura 5.15. Espectro RMN <sup>1</sup>H de las mezclas 1:1 de  $5 \times 10^{-3}$  M de la TC y APHB.

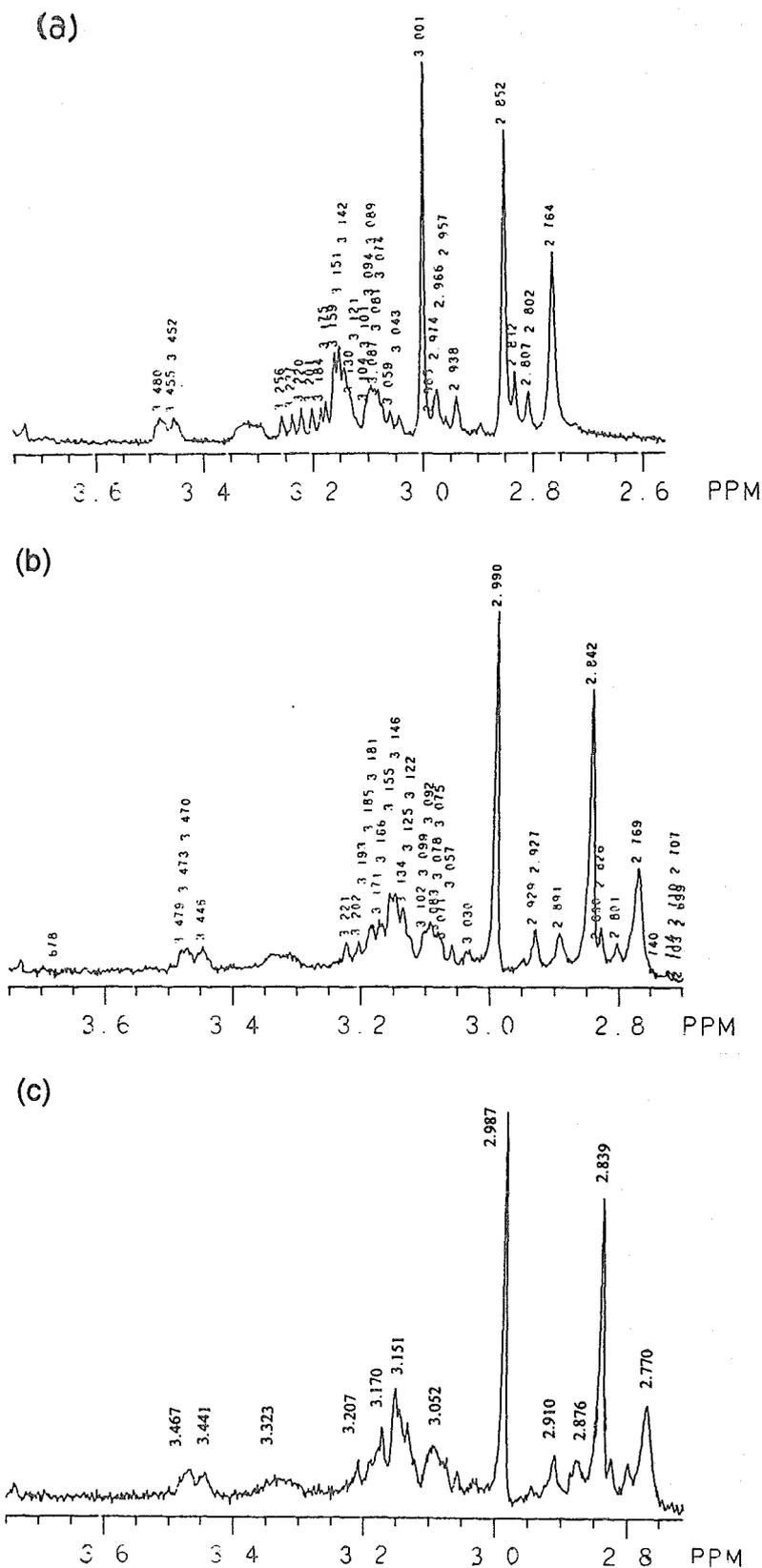


Figura 5.16. Parte de campo alto de los espectros RMN  $^1\text{H}$  de TC-AS a una concentración fija de TC ( $[\text{TC}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) y a)  $[\text{AS}] = 1.96 \times 10^{-4} \text{ M}$ , b)  $[\text{AS}] = 2.65 \times 10^{-3} \text{ M}$ , y c)  $[\text{AS}] = 3.98 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

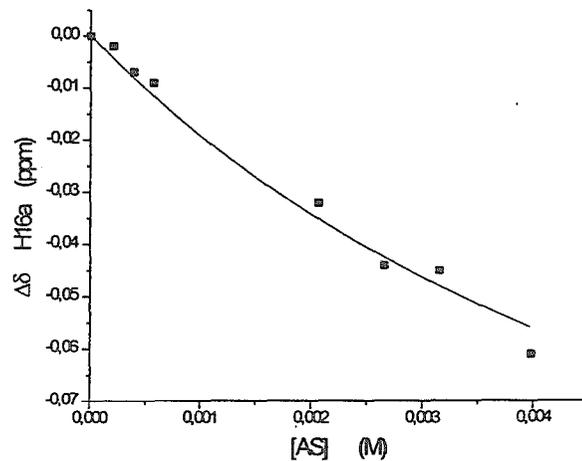
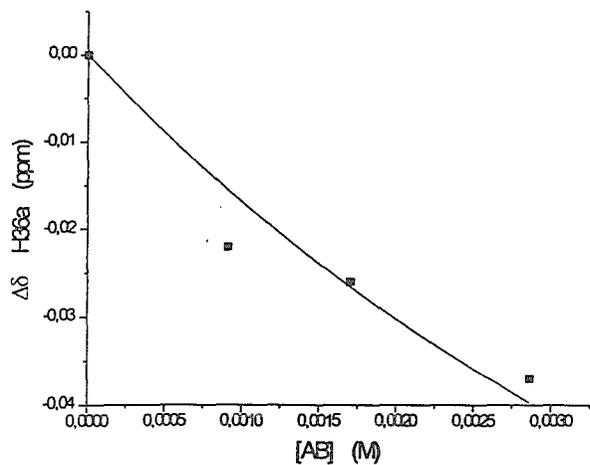
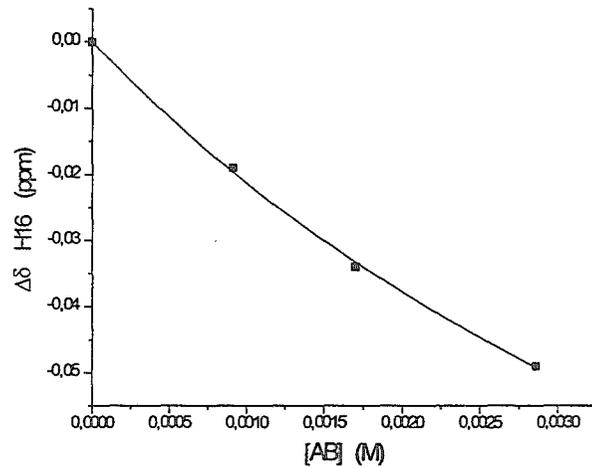
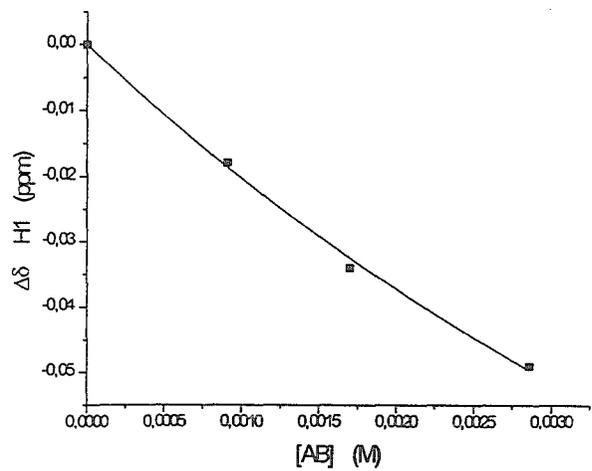


Figura 5.17. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de AB, AS, AMHB Y APHB. Las curvas son perfiles teóricos calculados de la ecuación 5.10. Las constantes de enlace calculadas están dadas en la Tabla 5.8.

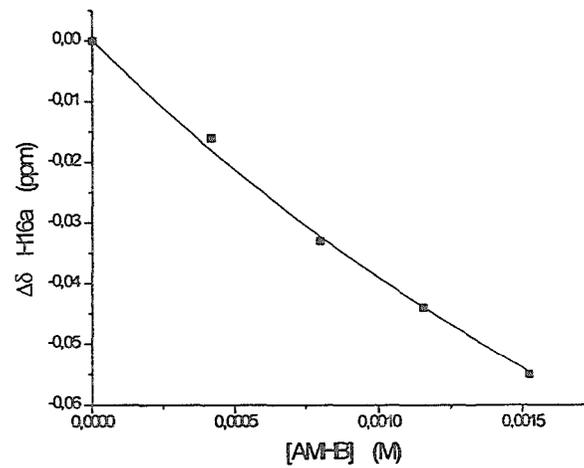
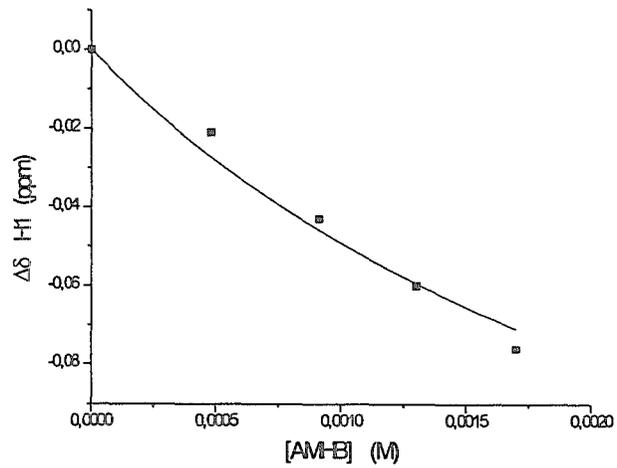
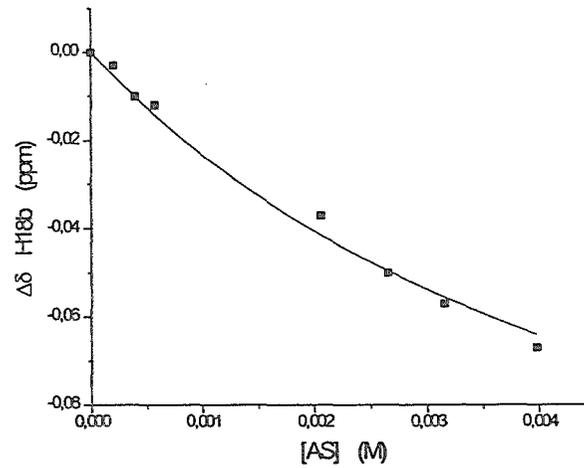
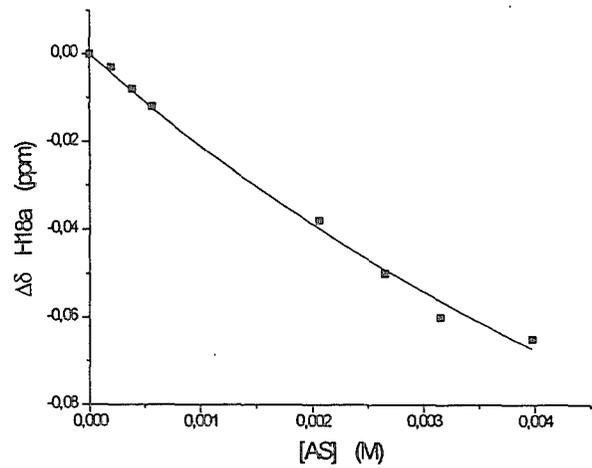


Figura 5.17. Continuación.

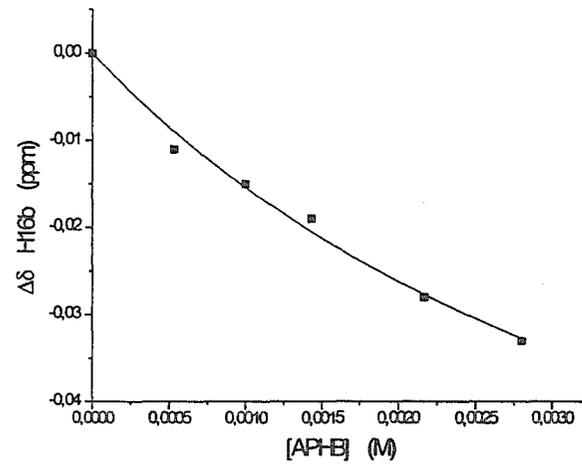


Figura 5.17. Continuación.

## 5.6 Discusión de los datos experimentales, constantes de enlace e información obtenida para las interacciones tubocurarina-huésped a pH 6.0 y 7.0

Los resultados presentados demuestran la habilidad de la TC para unirse a aniones orgánicos de estructuras diversas. El estudio más reciente de RMN de la TC en disolución acuosa [Fraenkel *et al.*, 1994] mostró la existencia de una cavidad hidrofóbica en este macrociclo, la cual se hace más profunda conforme se neutralizan las cargas positivas de la TC. El enlace de los aniones estudiados como huéspedes de la TC podría ser resultado de la formación de un complejo de inclusión, es decir, que involucre la penetración de fragmentos no polares de los aniones dentro de la cavidad de la TC o bien podrían formar asociaciones de pares iónicos acompañados por interacciones de van der Waals de las partes no polares de los aniones con la superficie de la molécula de TC.

Los estudios de fluorescencia y RMN realizados en este trabajo dan evidencias de la interacción TC-anion.

La molécula de ANS es ampliamente utilizada como prueba fluorogénica para detectar sitios de enlace hidrofóbicos en proteínas y algunas moléculas que actúan como anfitriones [Kanaoka, 1977; Murakami *et al.*, 1990]. Como ya fue mencionado en la sección 5.3, los cambios inducidos por complejación en la fluorescencia del anion ANS fueron los característicos para la transferencia de este anion de agua a un ambiente no polar. La interacción de la TC con los aniones NADA y NADFA también aumenta la fluorescencia de la TC. Tal aumento de fluorescencia frecuentemente acompaña la formación de complejos anfitrión-huésped en disoluciones acuosas y es resultado de la reducción de polaridad del microambiente en la cavidad del anfitrión [Frankewich *et al.*, 1991]. Estas observaciones indican, al menos una interacción parcial entre la parte aromática de los aniones y la cavidad hidrofóbica de la TC.

Los valores CIS de RMN  $^1\text{H}$  para los complejos de la TC con el anion del AB y sus derivados (Tabla 5.7) proporcionan información estructural valiosa acerca de las formas de enlace. La formación de complejos con AB, AS, AMHB y APHB causa un desplazamiento a campo alto de muchas de las señales de la TC, lo cual muy

probablemente resulta del efecto pantalla de los anillos aromáticos y de los benzoatos. Sin embargo, la magnitud de los desplazamientos es menor de lo que podría esperarse para una interacción estrecha entre los anillos aromáticos del anfitrión y huésped [Schneider y Pohmann, 1987].

En el enlace de los huéspedes AB, AS, AMHB y APHB a la TC, los valores CIS consistentemente más altos, corresponden a las señales observadas para los protones H37, H16 y H18a de la TC (ver Figura 2.23 y Tabla 5.7). Los valores CIS para otros protones de la TC son más pequeños y podrían atribuirse a cambios conformacionales de la TC después de la complejación. El protón H37 está orientado dentro de la cavidad de la TC, adyacente al nitrógeno cuaternario, por lo cual podría verse fuertemente afectado por la formación del puente salino entre la TC y los aniones (ver abajo). Los desplazamientos de las señales de los protones H16 y H18a son probablemente causadas por el efecto de la corriente de los anillos aromáticos de las moléculas huésped. Los protones H16 y H18a se encuentran relativamente lejos de los grupos iónicos y sus cambios de desplazamiento no podrían explicarse como resultado de interacciones electrostáticas.

Para tratar de determinar la geometría probable del complejo TC-anion, se realizaron cálculos de acoplamiento (docking) del complejo de la TC con el anion benzoato de AB. La estructura inicial de la TC [Coddington y James, 1973] se obtuvo del Cambridge Data Bank. Los cálculos de acoplamiento (docking) y las minimizaciones de energía se hicieron con el software SYBYL/TRIPOS y los parámetros estándar (default) del programa para una estación de trabajo de la Silicon Graphics.

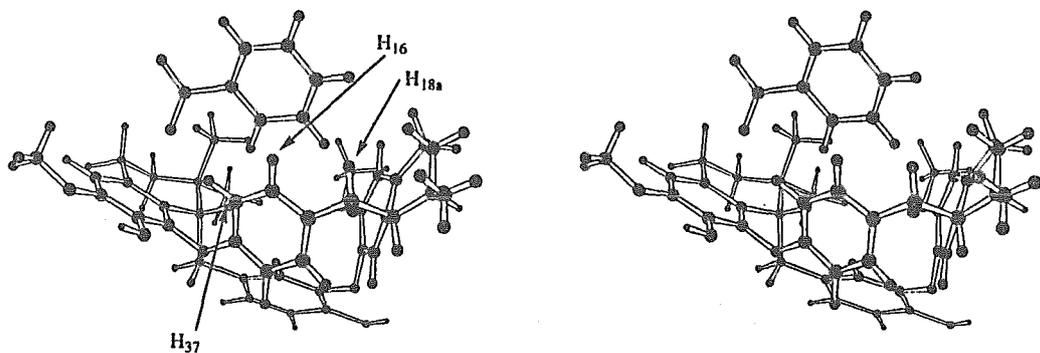
En la primera serie de cálculos se exploró la posibilidad de la inclusión del anillo aromático dentro de la cavidad de la TC. Sin embargo, los cálculos de acoplamiento (docking) de este tipo de complejo dieron como resultado una energía de tensión del sistema muy alta (hasta 100 kcal/mol) después de la minimización de energía. La continuación del estudio de minimización de energía trae como consecuencia la expulsión de la molécula huésped de la cavidad del macrociclo de la TC. De esta forma parece poco probable que la complejación pudiera involucrar la inclusión completa de la

molécula huésped. Esta conclusión podría obtenerse también de los valores CIS relativamente pequeños que fueron obtenidos en la titulación RMN  $^1\text{H}$ .

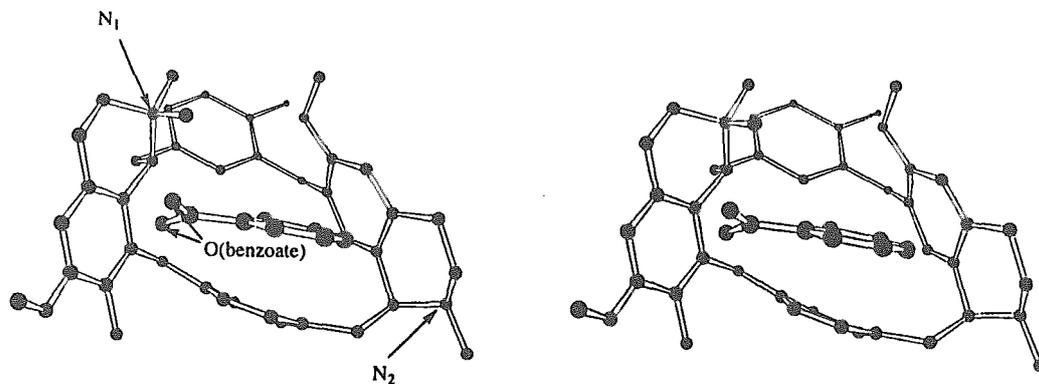
Los resultados de RMN y el análisis de las constantes de enlace (ver abajo) indican la interacción entre las partes hidrofóbicas del anfitrión y del huésped. Basándose cualitativamente en los valores CIS se ha simulado la estructura probable del complejo entre el anion benzoato AB y la TC (ver Figura 5.18). En esta estructura, el enlace electrostático está dado por la formación de un puente salino entre el nitrógeno cuaternario de la TC, el cual causa el desplazamiento de la señal del protón H37 vecino. El anillo aromático del huésped es extraído parcialmente del medio polar (agua) por interacciones del tipo hidrofóbico/van der Waals con la TC y probablemente se ubica cerca de los protones H16 y H18a, los cuales experimentan los efectos de apantallamiento más grandes.

Las constantes de enlace determinadas en este estudio están resumidas en la Tabla 5.8. Algunas constantes de enlace de los mismos aniones a macrociclos catiónicos sintéticos (ver las estructuras desarrolladas de los macrociclos en la sección 2, Tabla 2.5) están dadas también en la Tabla 5.8 para comparación. Evidentemente la TC tiene una habilidad comparable a la de otras moléculas anfitrión parecidas. La Tabla 5.9 presenta los cambios de energía libre obtenidos a partir de las constantes de enlace determinadas en este estudio.

Especificidad general de enlace de la TC. Entre los monoaniones el enlace más fuerte se observa para aquellos sustratos que contienen uno o más anillos aromáticos, la constante de enlace decrece en el orden: NADFA > NADA y ANS > AB, AS, AMHB y APHB. Esto significa que los grupos aromáticos participan en el enlace por medio de algún tipo de fuerzas intermoleculares, las cuales frecuentemente son atribuidas a interacciones de tipo hidrofóbico o de van der Waals [Schneider *et al.*, 1992a]. Sorprendentemente, no fue detectado el enlace para el anion fenilacetato AFA. Evidentemente la distancia entre el anillo de fenilo y el grupo carboxílico aniónico es un factor importante: el anillo fenílico aumenta el enlace cuando está directamente conectado o si está separado por dos carbonos del grupo carboxilo, pero no contribuye al enlace cuando está separado del grupo carboxilo por un carbono únicamente.



a)



b)

**Figura 5.18.** Vistas estereoscópicas: a) lateral y b) superior del complejo simulado entre el AB y la TC (átomos de hidrógeno omitidos por claridad).

**Tabla 5.8.** Constantes de enlace ( $M^{-1}$ ) de aniones orgánicos a la d-tubocurarina en disolución acuosa a 25°C.

Huésped	Fluorometría	Conductometría	Titulación RMN $^1H^a$	Otros macrociclos catiónicos <sup>b</sup>
ANS	$(3.3 \pm 0.25) \times 10^3$	$85 \pm 20$		$\approx 10^2$ a $\approx 10^{6d}$
NADA				
NALA	$50 \pm 20$	$< 20^c$		
NADFA	$370 \pm 50$	$270 \pm 70$		
NALFA				
AB		$< 20^c$	$100 \pm 20$ (H1,H16,H36)	$2.75^e$
AS			$90 \pm 2$ (H18a,H18b,H16)	$665^f$
AMHB		$300 \pm 40$	$200 \pm 40$ (H1,H16,H34)	$470^g$
APHB		$440 \pm 70$		
AFTL		$135 \pm 10$		$8.1^e$
AISFTL		$160 \pm 30$		
ATRFTL		$650 \pm 80$		$\approx 10^4^h$
AFA		$< 20^c$		$560^f$
AOXAL		$72 \pm 7$		$79^d$
AMAL		$252 \pm 25$		$22^d$
ASUCC		$160 \pm 30$		$282^d$
AGLUT		$92 \pm 12$		$316^d$
AADIP		$225 \pm 20$		$45^d$

<sup>a</sup> Valores medios calculados de las gráficas del cambio de desplazamiento químico vs concentración del anion obtenidos con las señales de los protones indicados entre paréntesis.

<sup>b</sup> Ver las estructuras químicas de los macrociclos en la sección 2, Tabla 2.5.

<sup>c</sup> Valor mínimo de la constante de enlace detectado por el conductometría bajo las condiciones empleadas en este estudio.

<sup>d</sup> Izatt *et al.* [1991].

<sup>e</sup> Schmidtchen [1981].

<sup>f</sup> Schneider *et al.* [1989b].

<sup>g</sup> Kimura *et al.* [1983].

<sup>h</sup> Jazwinski *et al.* [1987].

**Tabla 5.9.** Cambios de energía libre calculados y experimentales de diversos sustratos con la d-tubocurarina.

Huésped	n <sup>a</sup>	m <sup>b</sup>	- ΔG (kJ/mol) <sup>c</sup>	- ΔG (kJ/mol) <sup>d</sup>
ANS	1	6	13.76	20.19
NADA	1	0	4.85	10.41
NALA	1	0	4.85	< 7.47
NADFA	1	3	9.19	13.95
NALFA	1	3	9.19	< 7.47
AB	1	3	9.19	11.48
AS	1	3	9.19	11.22
AMHB	1	3	9.19	13.71
APHB	1	3	9.19	15.17
AFTL	2	3	14.13	12.23
AISFTL	2	3	14.13	12.65
ATRFTL	2	3	14.13	16.14
AFA	1	3	9.19	< 7.47
AOXAL	2	0	9.75	10.66
AMAL	2	0	9.75	13.78
ASUCC	2	0	9.75	12.65
AGLUT	2	0	9.75	11.27
AADIP	2	0	9.75	13.50

<sup>a</sup> n es el número de contactos iónicos posibles. <sup>b</sup> m es el número de anillos de fenilo en ambas moléculas. <sup>c</sup> Cambios de energía libre calculados con la ecuación (5.11). <sup>d</sup> Cambios de energía libre calculados a partir de las constantes de la Tabla 5.8.

Atracción electrostática. La atracción electrostática del anion a la TC<sup>+2</sup>, representa otra contribución al enlace. La contribución Coulómbica de un solo puente salino a la energía libre de enlace en disolución acuosa fue evaluada como -5 kJ/mol [Schneider, 1994; Schneider *et al.*, 1992a], la cual equivale a un factor de ca. 7 en la constante de enlace. Por lo tanto para los dianiones ftalato AFTL, AISFTL y ATRFTL se espera que formen complejos considerablemente más estables que el benzoato. Sin embargo, este es el caso sólo para el dianion ATRFTL, en el cual los grupos carboxilo están separados por una distancia de 5.8 Å. El *orto*-ftalato con una distancia entre carbonos carboxílicos de 3.0 Å forma un complejo de prácticamente la misma estabilidad que el benzoato y el *meta*-isómero con la distancia entre carbonos carboxílicos de 5.0 Å tiene una constante de enlace sólo ligeramente más alta que el benzoato. Claramente, la complementaridad entre las cargas positivas de la d-TC y las cargas negativas del huésped es un factor importante para el enlace.

Fraenkel *et al.* [1994] mostraron que la distancia  $N_1 - N_2$  en la *d*-TC decrece de 9 Å en la molécula libre a 6 Å en su complejo con el receptor acetilcolina debido a la neutralización de las cargas positivas de la *d*-TC por los centros aniónicos del receptor. Un acortamiento similar de la distancia entre los centros catiónicos del anfitrión puede ser inducido por los huéspedes aniónicos, y desde este punto de vista el fuerte enlace del dianion ATRFTL puede resultar de una complementaridad inducida de los grupos carboxilo del huésped a los grupos amonio de la *d*-TC.

Las constantes de enlace de los dianiones AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y ADIP son típicos de una asociación puramente iónica entre un dianion y un dicatión. Si se calcula el cambio de energía libre esperado con la ecuación de ajuste de la Figura 2.2 empleando la aproximación del producto de cargas de los iones, es decir la ecuación  $-\Delta G = 2.82 + 2.67 z_+ \cdot z_-$  y sustituyendo en ella  $z_+ = z_- = 2$ , se obtiene  $-\Delta G = 13.5$  kJ/mol, valor que se encuentra entre el intervalo de cambios de energía libre obtenidos en este estudio para AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y AADIP (-10.66 a -13.78 kJ/mol, ver Tabla 5.9). Por ejemplo, las constantes de enlace de los dianiones AOXAL, ASUCC, AADIP a  $^+H_3N(CH_2)_3NH_3^+$  es igual a 151, 130 y 72  $M^{-1}$ , respectivamente [Tam y Williams, 1984]. Las constantes de los dianiones AOXAL, AMAL, ASUCC, AGLUT y AADIP a un azamacrociclo tetraprotonado están dadas en la Tabla 5.8 y son también cercanas a las encontradas en este estudio. La constante de enlace más alta fue observada para el malonato con una distancia entre carbonos carboxílicos de 2.5 Å, pero en general, las constantes de enlace de los dianiones  $^-OOC(CH_2)_nCOO^-$  no muestra ninguna tendencia simple (monótona o con un extremo) como función de "*n*". Una inspección de los datos para el enlace de tales dianiones a diversos macrociclos hecha por Izatt *et al.* [1991], muestra patrones igualmente complicados. Los datos para el enlace de dianiones de ácidos dicarboxílicos a un dicatión rígido como el paraquate (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4' bipyridilio) demuestra muy poca variación en la constante de enlace con la distancia entre grupos carboxilo: las constantes de enlace para los ácidos oxálico, glutárico y subérico son iguales a 87, 71 y 60  $M^{-1}$ , respectivamente [Tam

y Williams, 1984]. Evidentemente la complementaridad no es el único factor que determina las constantes de enlace de los dianiones de ácidos dicarboxílicos alifáticos.

Si para el caso de la interacción TC (dicación) con los monoaniones AFA, NALA y NALFA se calcula el cambio de energía libre esperado con la ecuación de ajuste  $-\Delta G = 2.82 + 2.67 z_+ \cdot z_-$  (ver Figura 2.2) y se sustituye en ella  $z_+ = 2$  y  $z_- = 1$ , se obtiene  $-\Delta G = 8.16$  kJ/mol, valor muy cercano al obtenido experimentalmente en este estudio ( $< 7.47$  kJ/mol, ver Tabla 5.9).

Atracción hidrofóbica. Si al cambio de energía libre obtenido experimentalmente para NADA (-11.01 kJ/mol, ver Tabla 5.9) se le resta la contribución electrostática por la interacción de un dicación con un monoanion -8.16 kJ/mol (ver evaluación de la contribución electrostática en el párrafo anterior) se obtiene -2.91 kJ/mol que podría considerarse como una contribución hidrofóbica diferente de fenilo. Sin embargo, si al cambio de energía libre obtenido para NADFA (ver Tabla 5.9) se le resta la contribución electrostática y la contribución hidrofóbica diferente de fenilo, *i.e.*,  $-(13.95 - 8.16 - 2.91)$  kJ/mol se obtiene: - 2.88 kJ/mol como contribución hidrofóbica de fenilo al cambio de energía de energía libre total.

La contribución hidrofóbica por fenilo al cambio de energía libre total también puede evaluarse a partir de los cambios de energía libre determinados en este estudio para el AB (-11.48 kJ/mol, ver Tabla 5.9) y para el AS (-11.22 kJ/mol, Tabla 5.9). Si a cada uno de estos valores se les resta la contribución electrostática por la interacción de un dicación (TC) con un monoanion (AB ó AS), -8.16 kJ/mol se obtiene: -3.32 y -3.06 kJ/mol, respectivamente, como contribuciones hidrofóbicas de fenilo al cambio de energía libre total. Si se promedian los tres valores obtenidos -2.88 kJ/mol (NADFA), -3.32 kJ/mol (AB) y -3.06 kJ/mol (AS) se obtiene -3.10 kJ/mol.

Se ha señalado [Costas *et al.*, 1994 y referencias citadas allí] que para muchos solutos no polares los valores de sus entalpías y capacidades caloríficas de transferencia son proporcionales al área superficial de contacto de la molécula de soluto. De lo anterior podría esperarse que el valor obtenido por la contribución hidrofóbica proporcionara una aproximación cualitativa del área de contacto para los sistemas estudiados. Así, si se calcula la superficie del benceno por el método de Bondi

[Costas *et al.*, 1994 y referencias citadas allí] se obtiene:  $101.28 \text{ \AA}^2$ .

De la Tabla 2.2 se puede observar que las evaluaciones del incremento de  $\Delta G$  hidrofóbico se dividen en dos valores aproximadamente  $-0.10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  [Chothia, 1975] y  $-0.24 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  [Costas *et al.*, 1994] si se multiplican estos valores por el área superficial del benceno  $101.28 \text{ \AA}^2$ , se obtiene:  $-10.128 \text{ kJ/mol}$  y  $-24.307 \text{ kJ/mol}$ , respectivamente. Dividiendo los valores anteriores entre el valor promedio de la contribución hidrofóbica por fenilo obtenida en este estudio  $-3.1 \text{ kJ/mol}$  da aproximadamente 3 y 8, respectivamente, lo que indicaría que una tercera parte o bien una octava parte del fenilo se incluye o esta en contacto con la TC, dependiendo de la evaluación que sea considerada. Independientemente de la evaluación considerada se puede proponer un contacto parcial del fenilo con la superficie de la TC como lo sugieren las vistas estereoscópicas del complejo simulado entre el AB y la TC (ver Figura 5.18).

Reconocimiento enantioselectivo. El enlace de los  $\alpha$ -aminoácidos N-acetilo es enantioselectivo con un factor de discriminación D/L ca. 10 (calculado a partir de las constantes de enlace determinadas en este trabajo, bajo las condiciones indicadas en la Tabla 5.8). Este factor fue evaluado basándose en el hecho de que no se detectó ninguna interacción de L-enantiómeros con TC por conductometría (Figura 5.9). Bajo las condiciones empleadas esto significa que las constantes de enlace no exceden el valor de  $20 \text{ M}^{-1}$ . Tentativamente, el enlace enantioespecífico puede ser racionalizado como resultado de una interacción de tres puntos de los aniones de  $\alpha$ -aminoácidos con la TC: un puente salino entre el grupo carboxilo del huésped y el nitrógeno cuaternario de la TC, una interacción hidrofóbica de TC con un grupo fenilo o metilo del huésped y, probablemente, un enlace de hidrógeno del grupo N-acetilo a un átomo de oxígeno o hidroxilo de la TC. La discriminación de los enantiómeros de los aminoácidos y sus derivados es objeto de mucho interés actualmente [Galán *et al.*, 1992]. La TC podría tener una aplicación como discriminador quiral para este tipo de moléculas.

Interacciones por puente de hidrógeno. Las constantes de enlace del benzoato y los benzoatos sustituidos con hidroxilos a la TC (Tabla 5.8) demuestra un notable

incremento en el enlace de los isómeros *meta*- y *para*-. Hay una correlación aproximada entre las constantes de enlace de los aniones AB, AS, AMHB y APHB y los valores de  $pK_a$  para sus ácidos conjugados, los cuales se incrementan de 3.0 para el ácido salicílico a 4.7 para el ácido *para*-hidroxibenzoico. Por lo tanto, la tendencia en las constantes de enlace refleja probablemente un incremento efectivo de la carga negativa del grupo carboxilo aniónico de los aniones en la serie AS < AB < AMHB < APHB.

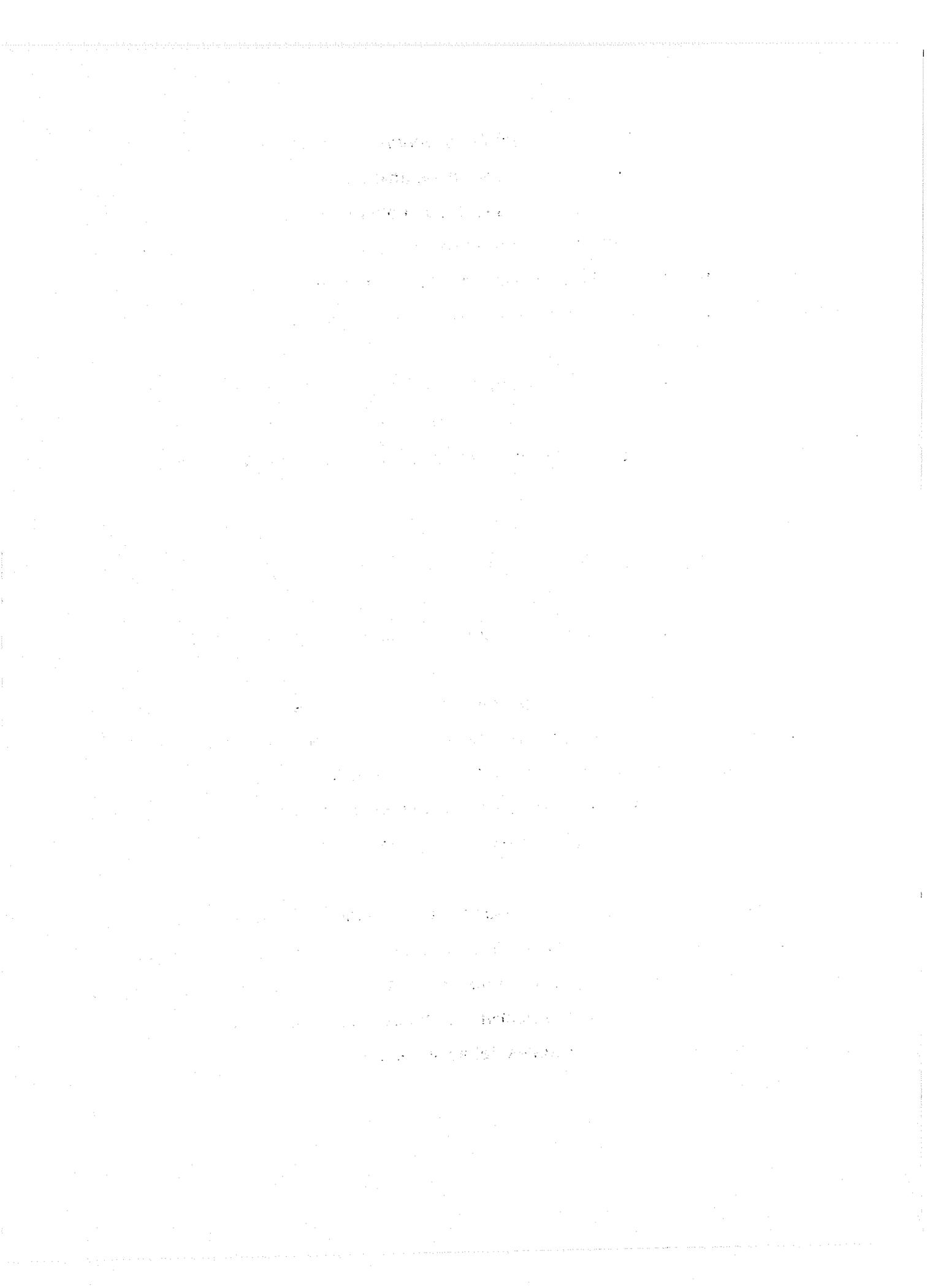
La ecuación empírica de Schneider *et al.* [1992a] para calcular el cambio de energía libre de la formación de un complejo que involucra sólo interacciones electrostáticas mas contactos de anillos aromáticos sin inclusión tiene la forma siguiente:

$$\Delta G^0 = 4.8n + 1.5m \quad (kJ/mol) \quad (5.11)$$

donde  $n$  es el número de contactos iónicos posibles y  $m$  es el número de anillos de fenilo en ambas moléculas.

Con la ecuación (5.11) se pueden evaluar las constantes de enlace que corresponden sólo a estos dos tipos de interacción (Tabla 5.9). Y ya que la asociación de la TC con los huéspedes empleados no involucra inclusión, se esperaría que los valores calculados fueran similares a los experimentales; sin embargo, son muy diferentes, lo que se debe a las sobresimplificaciones hechas en la derivación de la ecuación (5.11).

Es importante señalar que los resultados presentados demuestran por primera vez la capacidad de una molécula del tipo ciclofano-natural a actuar como anfitrión. Puede observarse que la TC posee cierto grado de selectividad hacia los aniones orgánicos, en particular enantioselectividad hacia los aminoácidos N-acetilo y selectividad hacia isómeros posicionales del ácido benzoico sustituido.



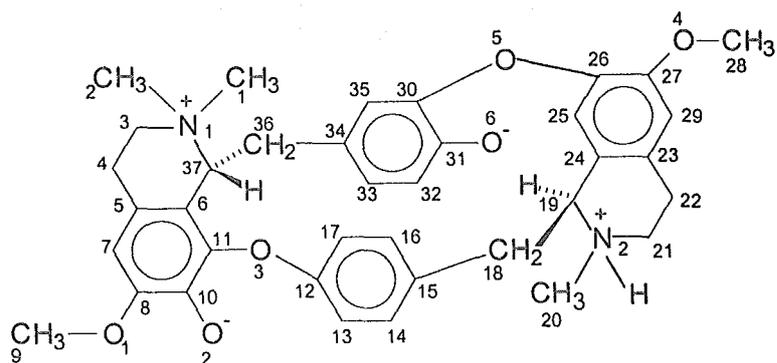
## 6. Estudios de la tubocurarina en forma zwitteriónica

### 6.1 Sustratos estudiados

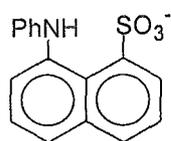
A pH 9.0 la TC existe en forma bi-zwitteriónica debido a que sus tres grupos ionogénicos con  $pK_a$ 's a 25°C :  $pK_{a1} = 7.6$ ,  $pK_{a2} = 8.65$  y  $pK_{a3} = 9.65$ , están ionizados [Barlow, 1982]. El primer y segundo  $pK_a$  corresponden a los grupos fenólicos de los oxígenos O6 y O2, respectivamente y el tercer  $pK_a$  al grupo amonio N2 (ver Figura 6.1). La neutralización de las cargas positivas cambia notablemente la conformación del alcaloide [Fraenkel *et al.*, 1994] y puede por lo tanto afectar sus propiedades de reconocimiento. Además, la presencia de ambas cargas positivas y negativas puede convertir a la TC zwitteriónica en un receptor efectivo para una variedad más amplia de huéspedes aniónicos y catiónicos.

Los huéspedes seleccionados, a excepción de ANS, empleado como prueba fluorogénica; fueron aminoácidos enantioméricos aniónicos (NADA, NALA, NADFA y NALFA), neutros (DFAME y LFAME) y zwitteriónicos (DFA y LFA), así como un sustrato catiónico (FEA), Figura 6.1. Estas especies fueron seleccionadas para determinar la habilidad de la TC, en su forma zwitteriónica, para enlazar algunos aniones y cationes enantioméricos.

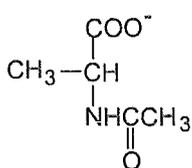
Otro aspecto de la TC zwitteriónica es su habilidad potencial para actuar como un nucleófilo debido a la presencia de dos hidroxilos aromáticos desprotonados. Es conocido que los aniones fenolato son nucleófilos capaces de hidrolizar ésteres activados, tales como el acetato del *para*-nitrofenilo [Ba-Saif *et al.*, 1987]. Ante tal posibilidad, se espera la TC zwitteriónica pueda actuar como un reactivo quiral potencialmente útil o bien como catalizador de la ruptura de ésteres de aminoácidos. En este trabajo se presenta el estudio de la ruptura del acetato del *para*-nitrofenilo y de los ésteres enantioméricos del *para*-nitrofenilo N-carbobenciloxi-fenilalanina por la TC (Figura 6.1).



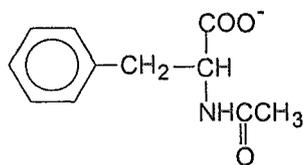
Forma bi-zwitteriónica de la TC



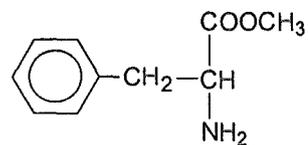
ANS



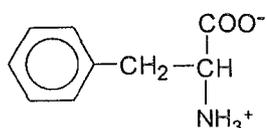
NADA / NALA



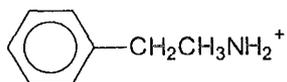
NADFA / NALFA



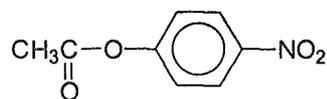
DFAME / LFAME



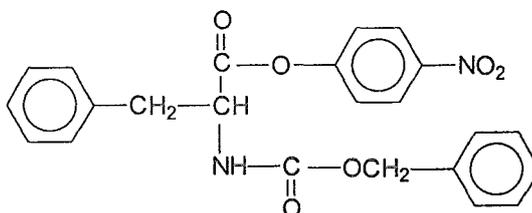
DFA / LFA



FEA



APNF



PNFNCDFa/PNFNCLFA

ANS Acido 8-anilino-naftaleno sulfónico

NADA / NALA N-acetil-D/L-alanina

NADFA / NALFA N-acetil-D/L-fenilalanina

APNF Acetato de *para*-nitrofenilo

PNFNCDFa/PNFNCLFA *para*-nitrofenilo N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina

DFAME / LFAME D/L-fenilalanina metil éster

DFA / LFA D/L-fenilalanina

FEA  $\beta$ -feniletilamina

Figura 6.1. Estructura química de la TC en su forma bi-zwitteriónica, de las moléculas empleadas como huéspedes en sus formas iónicas dominantes a pH 9.0 y de los ésteres estudiados como sustratos de hidrólisis de la tubocurarina.

## 6.2 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de emisión electrónica

Se empleó la técnica de fluorescencia para estudiar a pH 9.0 las interacciones de la TC en su forma zwitteriónica con diferentes tipos de moléculas huésped en forma aniónica o neutra. Se realizaron estudios de fluorescencia directa, en los cuales se empleó la fluorescencia de la TC y de ANS para la interacción TC-ANS, y por competencia con el ligante fluorogénico ANS, en cuyo caso se utilizó la fluorescencia de ANS. La Tabla 6.1 resume las condiciones experimentales empleadas en estos estudios. Las disoluciones del huésped fueron preparadas a concentraciones de 0.005, 0.05 y 0.15 M y se ajustaron a pH 9.0 con disoluciones de NaOH 1.0 y 0.1 N y HCl 0.1 N. Las concentraciones de las disoluciones de las moléculas huésped fueron recalculadas por dilución.

**Tabla 6.1.** Condiciones experimentales para el estudio de las interacciones TC-huésped por fluorescencia a pH 9.0.

Huésped	Fluoróforo	Máximos (nm)		Concentraciones (M)		
		Excitación	Emisión	TC	Huésped	ANS <sup>a</sup>
ANS	ANS	367	337, 363 y 389	$2 \times 10^{-4}$ – $2.86 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-5}$	–
NADFA	TC	280	337, 363 y 389	$1.17 \times 10^{-5}$	$1.12 \times 10^{-4}$ – $5.01 \times 10^{-3}$	–
DFAME	TC	280	337, 363 y 389	$1.17 \times 10^{-5}$	$1.12 \times 10^{-4}$ – $5.01 \times 10^{-3}$	–
LFAME	TC	280	337, 363 y 389	$1.17 \times 10^{-5}$	$1.12 \times 10^{-4}$ – $5.01 \times 10^{-3}$	–
NADFA	ANS	367	500, 516 y 540	$9.1 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-5}$ – $1.54 \times 10^{-2}$	$5.04 \times 10^{-6}$
NALFA	ANS	367	500, 516 y 540	$9.1 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-5}$ – $1.53 \times 10^{-2}$	$5.04 \times 10^{-6}$
DFAME	ANS	367	500, 516 y 540	$9.1 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-5}$ – $1.53 \times 10^{-2}$	$5.04 \times 10^{-6}$
LFAME	ANS	367	500, 516 y 540	$9.1 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-5}$ – $1.50 \times 10^{-2}$	$5.04 \times 10^{-6}$

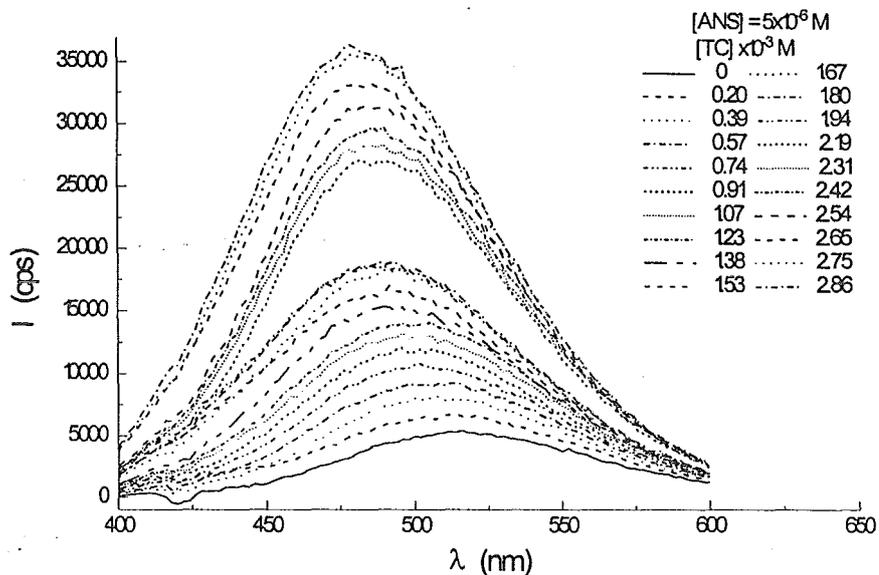
<sup>a</sup> Los experimentos que indican la concentración de ANS en esta columna corresponden a los experimentos de fluorescencia por competencia.

### 6.2.1 Estudios de fluorescencia directa

Los estudios por fluorescencia directa se llevaron a cabo según el procedimiento experimental y de cálculo de constantes descrito en la sección 4.8.A de la Metodología.

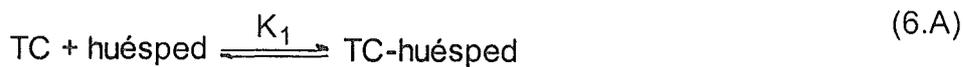
#### *Estudio ANS-TC*

La Figura 6.2 presenta el efecto de la TC en el espectro de fluorescencia del anion ANS, la adición de TC aumenta en casi un orden de magnitud y desplaza el máximo de fluorescencia de ANS de 516 a 480 nm, lo cual es indicativo del enlace de ANS a la región hidrofóbica del macrociclo. Es importante señalar que a pH 9.0 y con una longitud de onda de excitación de 367 nm, la TC presenta un máximo a 490 nm y su intensidad de fluorescencia aumenta con el tiempo. La Figura 6.3 muestra el cambio de intensidad de fluorescencia ( $\Delta I$ ) de ANS a las longitudes de onda de emisión de 490, 516, y 540 nm como función de la concentración de TC, bajo la condición  $[TC] \gg [ANS]$ , el Apéndice C (Tabla C.1) presenta la intensidad de fluorescencia de TC y de la mezcla TC-ANS, para diferentes concentraciones de TC. Los puntos mostrados en las gráficas tienen una curvatura "cóncava" típica para la formación de complejos de más alta estequiometría, es decir cuando se forman complejos 1:1 y 1:2 por asociación sucesiva de una y dos moléculas de TC.



**Figura 6.2.** Espectros de fluorescencia de ANS  $5 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 nm) a pH 9.0 en la presencia de TC en el intervalo de concentraciones de  $2 \times 10^{-4}$  a  $2.86 \times 10^{-3}$  M (espectros en forma creciente). El espectro con intensidad de fluorescencia más baja corresponde al espectro de ANS libre, *i.e.*, sin TC.

Para el análisis de los datos mostrados se consideró la formación de un complejo de estequiometría 1:2, *i.e.*, una molécula de ANS y dos moléculas de TC, de acuerdo a los siguientes equilibrios:



Los equilibrios (6.A) y (6.B) contemplan la formación de dos complejos 1:1, la diferencia entre ellos surge de que fragmento aromático esté en contacto con la TC, el fenilo o bien el naftaleno. Independientemente de la estructura del complejo 1:1, al asociarse con una segunda molécula de TC se establece un contacto con el otro fragmento aromático al que no estaba asociado la primer molécula de TC, equilibrio (6.C). Para el ajuste de los datos experimentales obtenidos se empleó la ecuación (6.1):

$$\Delta I = \frac{[ANS] \cdot [(\Delta_i^1 \cdot K_1 + \Delta_i^2 \cdot K_2) \cdot X + \Delta_i^3 \cdot K_1 \cdot K_3 \cdot X^2]}{1 + (K_1 + K_2) \cdot X + K_1 \cdot K_3 \cdot X^2} \quad (6.1)$$

donde  $X$  es la concentración de TC ( $0 - 2.86 \times 10^{-3}$  M);  $\Delta_i^1$ ,  $\Delta_i^2$  y  $\Delta_i^3$ , son las diferencias de la fluorescencia de las formas enlazadas menos la fluorescencia de las especies no-enlazadas en los equilibrios (6.A), (6.B) y (6.C), respectivamente; y  $K_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$ , son las constantes de enlace para los equilibrios (6.A), (6.B) y (6.C), respectivamente.

Previo al empleo la ecuación (6.1), los datos experimentales fueron ajustados con una ecuación polinomial de grado 2:  $Y = A_0 + A_1 \cdot X + A_2 \cdot X^2$  .... donde  $A_1 = [ANS] \cdot [\Delta_i^1 \cdot K_1 + \Delta_i^2 \cdot K_2]$  y  $A_2 = [ANS] \cdot \Delta_i^3 \cdot K_1 \cdot K_3$ . Los parámetros de ajuste  $A_1$  y  $A_2$  se presentan en la siguiente Tabla.

$\lambda$ (nm)	$A_1 (x 10^6)$	$A_2 (x 10^9)$
490	4.18	2.69
516	3.76	1.99
540	3.57	0.53

Posteriormente se empleó el parámetro de ajuste  $A_1$  como dato en la ecuación (6.1), resultando así tres parámetros de ajuste en la ecuación (6.1):  $P_1 = [ANS] \cdot \Delta_i^3$ ,  $P_2 = K_1 \cdot K_3$ , y  $P_3 = K_1 + K_2$ . La siguiente Tabla presenta los valores obtenidos para estos parámetros:

$\lambda$ (nm)	$P1 = [ANS] \cdot \Delta_i^3 (x 10^7)$	$P2 = K_1 \cdot K_3$	$P3 = K_1 + K_2$
490	3.22	105.06	51.76
516	3.42	78.55	66.22
540	2.98	41.78	131.72

La ausencia de una tendencia de "saturación" en la dependencia de la concentración con la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija (Figura 6.3) demuestra, que el grado de complejación de ANS, en el intervalo de concentraciones empleadas, es bajo y lo único que puede decirse es que se realiza de acuerdo a un esquema que lleva a la formación de un complejo 1:2.

#### ***Estudio TC-NADFA, TC-DFAME y TC-LFAME***

El enlace del anión NADFA y de las moléculas DFAME y LFAME a la TC fue estudiado empleando la fluorescencia de la TC y una longitud de onda de excitación de 280 nm. La adición de NADFA, DFAME y LFAME a la TC, disminuye la intensidad de fluorescencia de la TC sin desplazar su máximo de emisión (ver por ejemplo la Figura 6.4). La concentración de TC se fijó en  $1.17 \times 10^{-5}$  M y su enlace a NADFA, DFAME y LFAME fue estudiado por titulación de la TC, pero para evitar la interferencia por el aumento de fluorescencia de la TC con el tiempo, cada disolución con diferente concentración del huésped ( $0 - 4 \text{ ó } 5 \times 10^{-3}$  M) fue preparada por separado.

El Apéndice C (Tablas C.2 a C.5) presenta las intensidades de fluorescencia a tres longitudes de onda de los huéspedes y de las mezclas TC-huésped, para las diferentes concentraciones del huésped estudiadas.

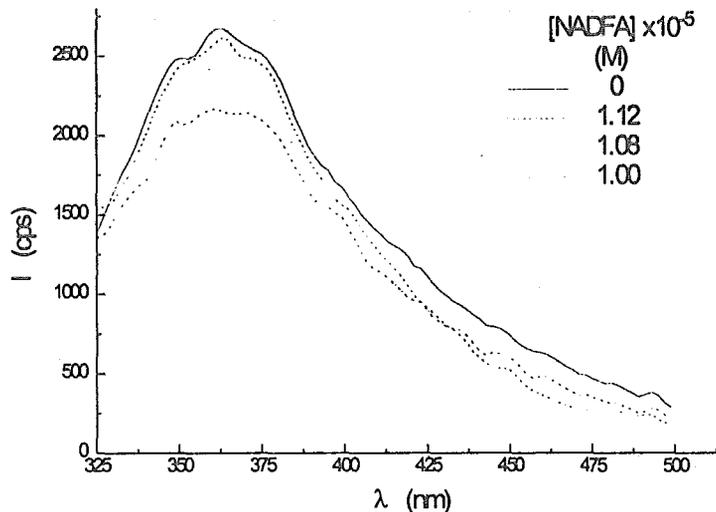


Figura 6.4. Espectros de fluorescencia de TC  $1.17 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 nm) a pH 9.0 en la presencia de NADFA.

La Figuras 6.5 y 6.6 muestran el cambio de intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de emisión fija como función de la concentración de NADFA y DFAME. Estas gráficas fueron ajustadas con la ecuación (6.2a) para NADFA y con la ecuación (6.2b) para DFAME y LFAME. Las ecuaciones (6.2a) y (6.2b) consideran la formación de un complejo de estequiometría 1:1:

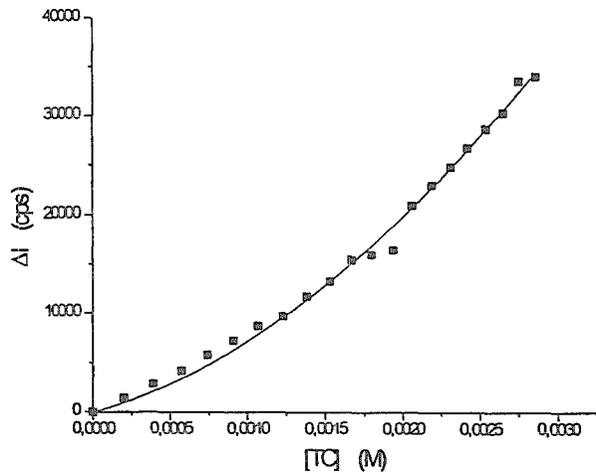
$$I = \frac{I_{TC} + I_{\infty} \cdot K \cdot X}{1 + K \cdot X} \quad (6.2a)$$

$$\frac{I}{I_{TC}} = \frac{1 + \frac{I_{\infty}}{I_{TC}} \cdot K \cdot X}{1 + K \cdot X} \quad (6.2b)$$

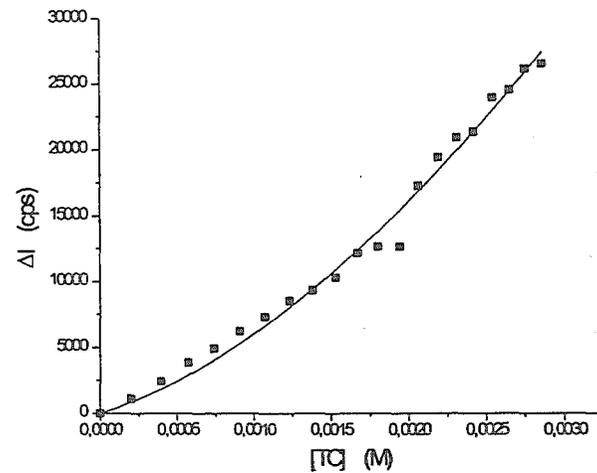
donde  $I_{TC}$  es la intensidad de fluorescencia de la TC,  $I_{\infty}$  es la intensidad de fluorescencia de la TC libre y enlazada y  $K$  es constante de enlace.

Las Figuras (6.5) y (6.6) (Continuación), muestran las barras de error calculadas para los datos experimentales a cada longitud de onda de estudio a partir de las derivadas de las ecuaciones (6.2a) y (6.2b), empleando como variables los dos parámetros de ajuste:  $I_{\infty} K$  y  $K$  además de  $I_{\infty} I_{TC} K$  y  $K$ , respectivamente, los cuales incluyen sus errores asociados de acuerdo al ajuste no lineal de los datos experimentales. Las barras de error muestran que el modelo empleado para el ajuste de los datos experimentales es correcto.

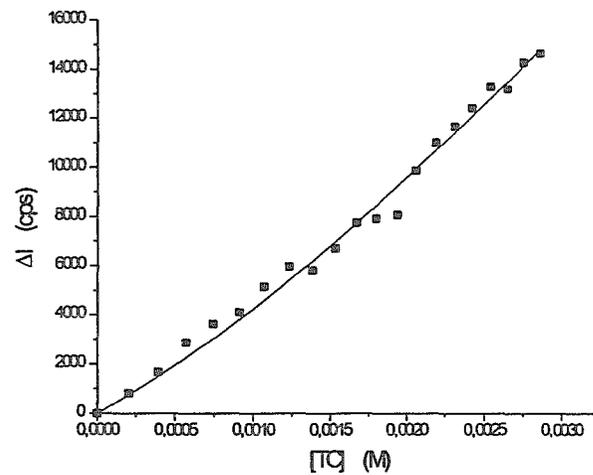
La ecuación (6.2b) tiene la ventaja de reducir las fluctuaciones en  $I_{TC}$  ya que utiliza los valores relativos y fue empleada en los casos cuando estas fluctuaciones fueron muy grandes. Las constantes de enlace calculadas con las ecuaciones (6.2a) y (6.2b) se presentan en la Tabla 6.6, ver más adelante en la Discusión.



(a)

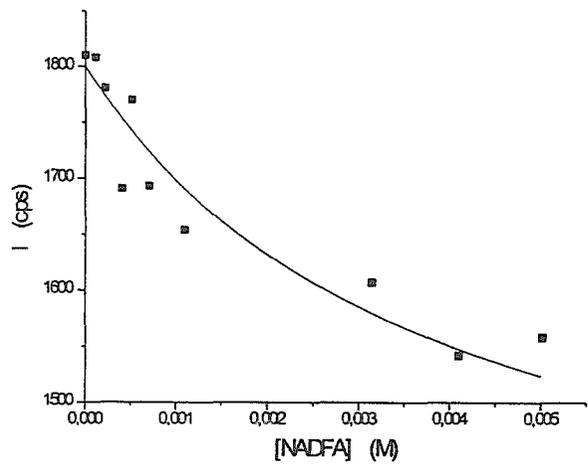


(b)

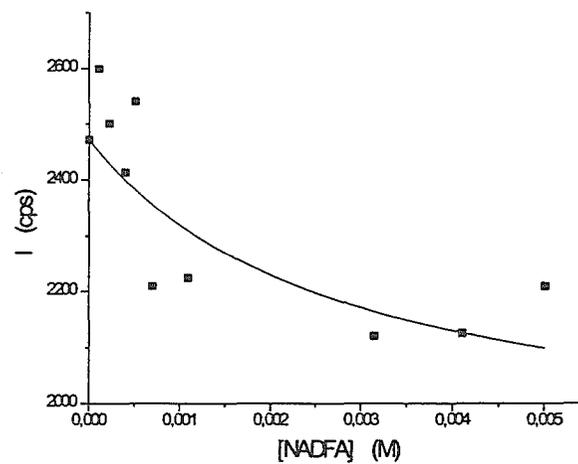


(c)

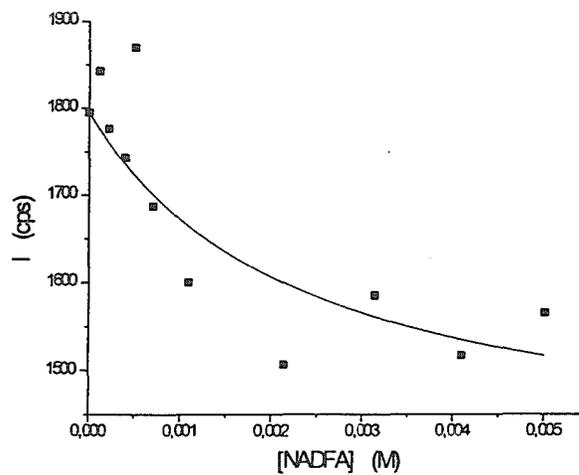
**Figura 6.3.** Intensidad de fluorescencia diferencial de ANS  $5.04 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 nm) y emisión a (a) 490 nm, (b) 516 nm y (c) 540 nm como función de la concentración de TC a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.1).



(a)

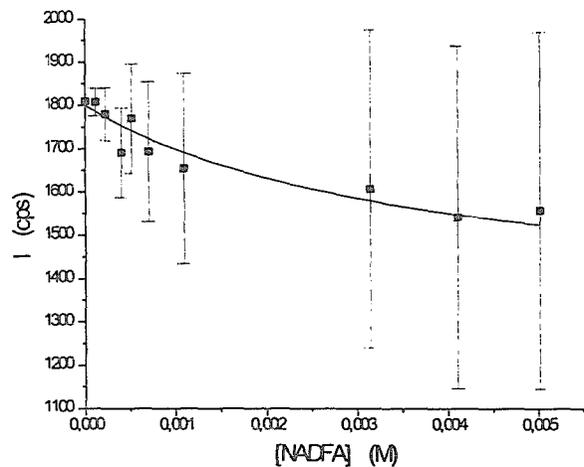


(b)

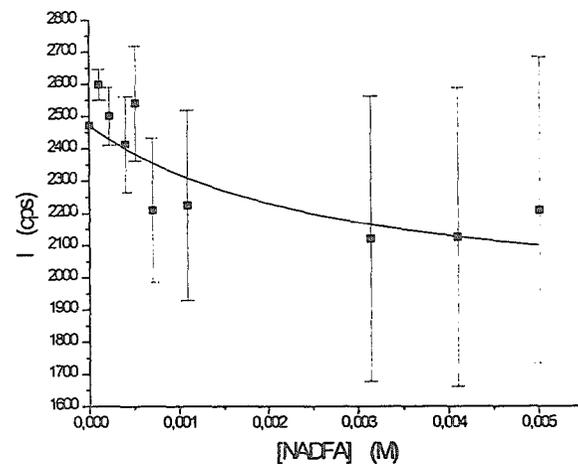


(c)

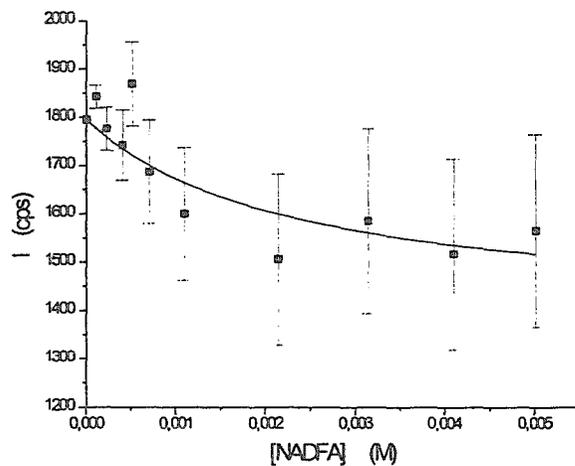
**Figura 6.5.** Intensidad de fluorescencia de TC  $1.17 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 nm) y emisión a (a) 337 nm, (b) 367 nm y (c) 389 nm como función de la concentración de NADFA a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.2a).



(α)

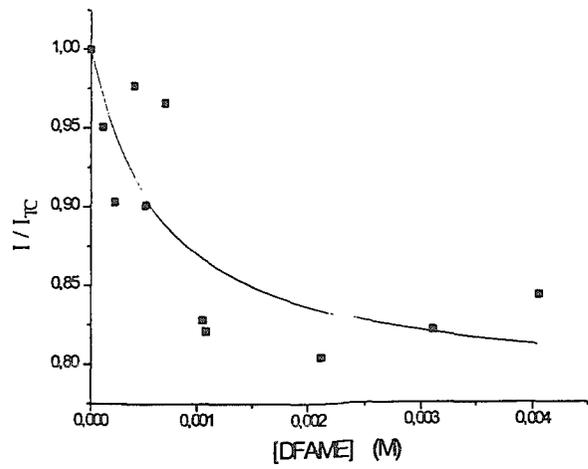


(β)

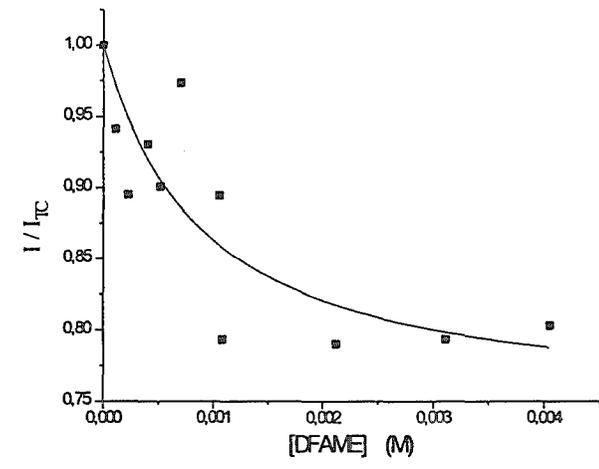


(γ)

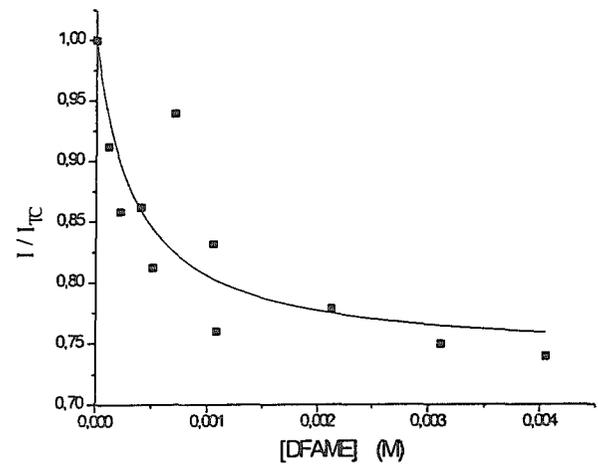
Figura 6.5. (Continuación). Intensidad de fluorescencia de TC  $1.17 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 nm) y emisión a (α) 337 nm, (β) 367 nm y (γ) 389 nm como función de la concentración de NADFA a pH 9.0 mostrando las barras de error correspondientes.



(a)

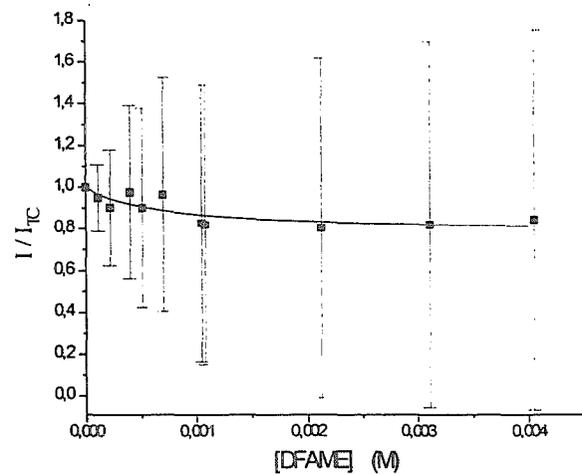


(b)

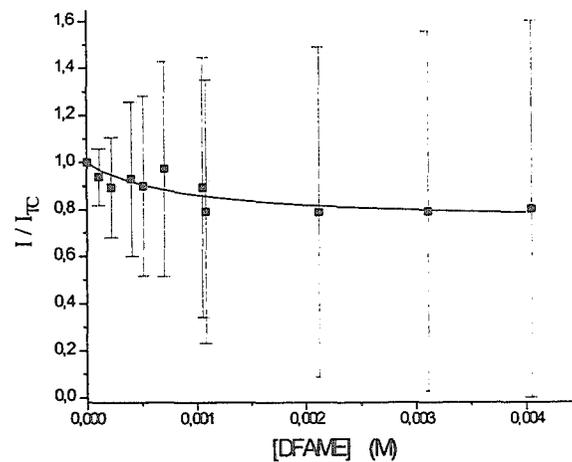


(c)

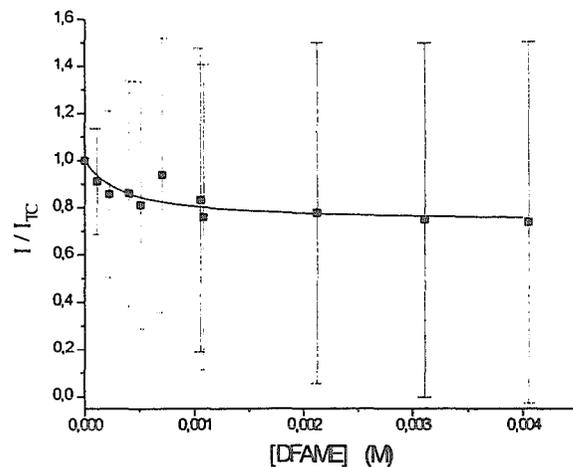
**Figura 6.6.** Intensidad de fluorescencia de TC  $1.17 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 nm) y emisión a (a) 337 nm, (b) 363 nm y (c) 389 nm como función de la concentración de DFAME a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.2b).



(α)



(β)



(γ)

Figura 6.6. (Continuación). Intensidad de fluorescencia de TC  $1.17 \times 10^{-5}$  M (excitación 280 nm) y emisión a (α) 337 nm, (β) 363 nm y (γ) 389 nm como función de la concentración de DFAME a pH 9.0 mostrando las barras de error correspondientes.

## 6.2.2 Estudios de fluorescencia por competencia

Los estudios por fluorescencia por competencia se llevaron a cabo según el procedimiento experimental y de cálculo de constantes descrito en la sección 4.8.B de la Metodología.

El enlace de NADFA, NALFA, DFAME y LFAME a la TC también puede ser estudiado a través de su competencia con el anion ANS por el sitio de unión en la TC, de acuerdo a los equilibrios (6.D) y (6.E):



Sólo se considera un equilibrio 1:1 porque a la concentración de TC empleada, la contribución del término cuadrático es despreciable.



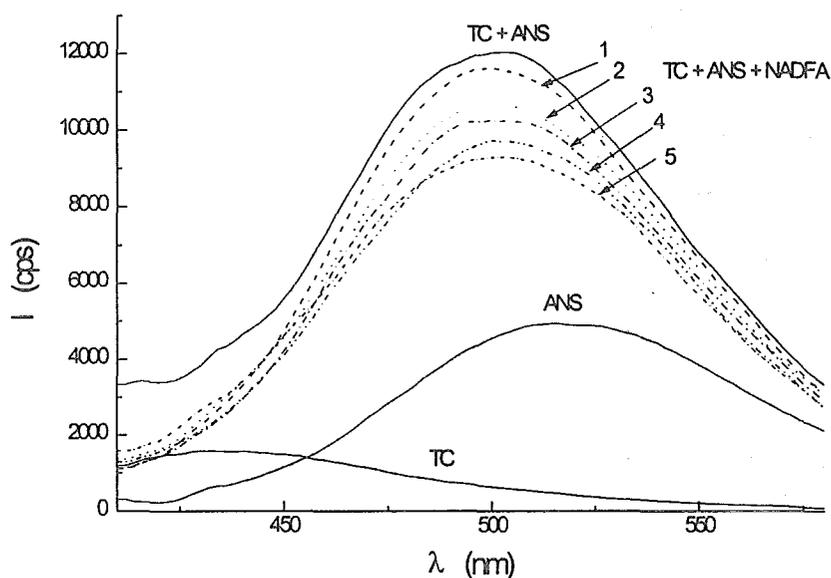
Además se tomó en cuenta la formación de un complejo ternario:



En estos estudios la concentración de ANS y TC se fijó en  $5 \times 10^{-6}$  M y  $9.1 \times 10^{-4}$  M (concentraciones iniciales), respectivamente; mientras que la concentración del huésped se varió en el intervalo  $8 \times 10^{-5} - 1.52 \times 10^{-2}$  M. En estos experimentos también fueron tomadas en cuenta las precauciones mencionadas antes con respecto al aumento de fluorescencia de la TC en el tiempo. El Apéndice C (Tablas C.6 a C.8) presenta la intensidad de fluorescencia a tres longitudes de onda del huésped,

ANS+huésped y TC+ANS+huésped para diferentes concentraciones de los huéspedes estudiados.

La Figura 6.7 muestra como ejemplo los espectros de fluorescencia de TC, ANS y TC + ANS y de la mezcla TC + ANS + NADFA con diferentes concentraciones de NADFA. Como se esperaría, la adición del ligante causa la disminución de la fluorescencia por competencia. Sin embargo, en otros casos se observa un incremento de  $I$ , lo que puede explicarse sólo por la formación de un complejo ternario TC-ANS-huésped.



**Figura 6.7.** Espectros de fluorescencia de TC  $9.9 \times 10^{-4}$  M, ANS  $5.04 \times 10^{-6}$  M, TC + ANS y de la mezcla TC + ANS + NADFA con concentraciones de NADFA de  $8 \times 10^{-5}$  (1),  $1.6 \times 10^{-4}$  (2),  $3.1 \times 10^{-4}$  (3),  $5.8 \times 10^{-4}$  (4) y  $1.54 \times 10^{-2}$  (5) M, donde los números entre paréntesis se refieren a los números indicados en la gráfica.

Las Figuras 6.8, 6.9 y 6.10 muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia de ANS a la longitud de onda de excitación de 367 nm y diferentes longitudes de onda de emisión fija como función de la concentración de NADFA, NALFA y DFAME, respectivamente. Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación (6.3) la

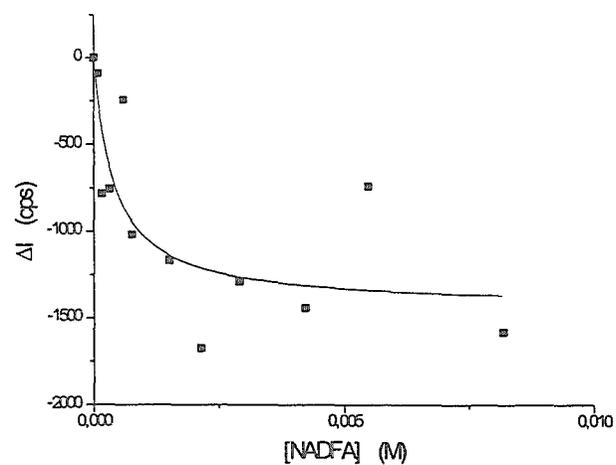
cual considera la formación de un complejo de estequiometría 1:1, *i.e.*, el equilibrio (6.D) seguido por (6.E) o por (6:F).

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\infty} \cdot K \cdot X}{1 + K \cdot X} \quad (6.3)$$

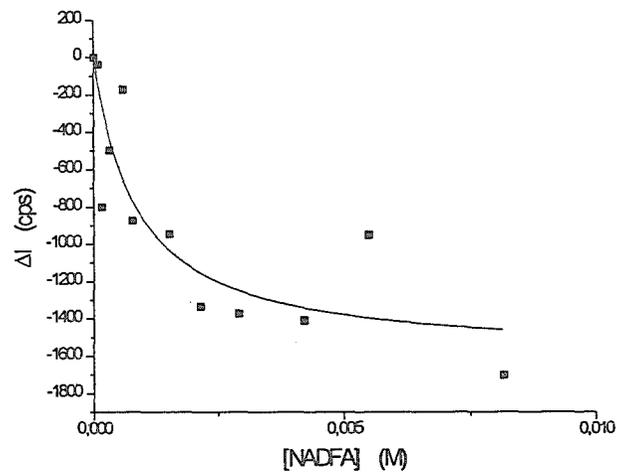
Donde  $\Delta I_{\infty}$  es la diferencia de la fluorescencia de la especie enlazada y libre o enlazada en un complejo binario y ternario,  $K$  es la constante para el equilibrio (6.E) y  $X$  es la concentración del huésped.

Las constantes de enlace para TC-NADFA, TC-NALFA y TC-DFAME obtenidas por experimentos de competencia se presentan en la Tabla 6.6.

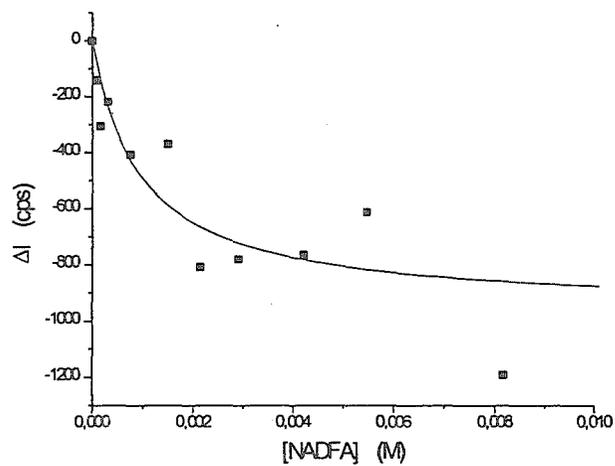
Aunque estos experimentos de fluorescencia por competencia con NADFA y NALFA revelan notables respuestas espectrales enantioselectivas (Figuras 6.8 y 6.9) como se discutirá más adelante, la interacción involucra probablemente la formación de complejos de tres moléculas que no proveen ningún valor de constantes de enlace confiables. Realmente, el desplazamiento de ANS de su complejo con TC debe dar lugar a la restauración de la intensidad de fluorescencia observada para ANS en ausencia de TC, es decir debería observarse un decremento de *ca.* 2.5 veces en la intensidad de fluorescencia. En lugar de esto, la adición de NALFA causa un incremento en la intensidad de fluorescencia (Figura 6.9), lo que indica la formación de un complejo ternario huésped-TC-ANS y como razón física el aumento de hidrofobicidad del sistema. Mientras que la adición de NADFA causa el decremento esperado (Figura 6.8), pero en este caso la intensidad de fluorescencia tiende a "saturarse" a un nivel más alto que el ANS libre.



(a)

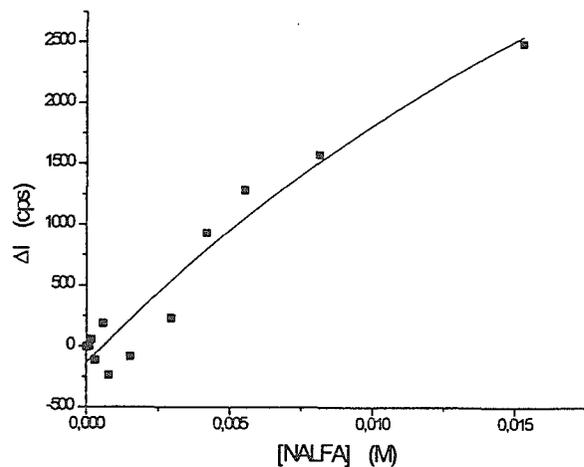


(b)

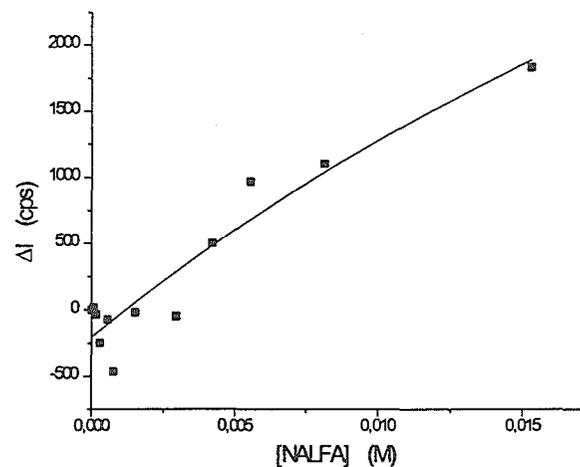


(c)

Figura 6.8. Intensidad de fluorescencia diferencial de ANS  $5.04 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 nm), TC  $9.1 \times 10^{-4}$  M y emisión a (a) 500 nm, (b) 516 nm y (c) 540 nm como función de la concentración de NADFA a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.3).

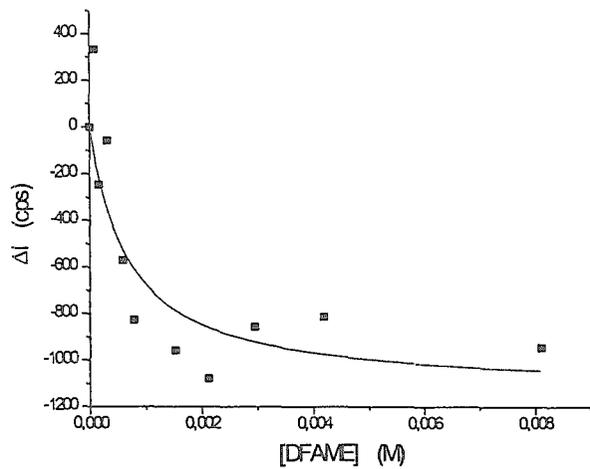


(a)

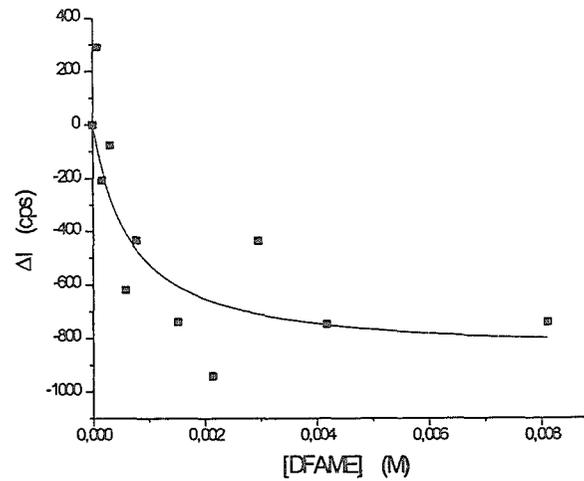


(b)

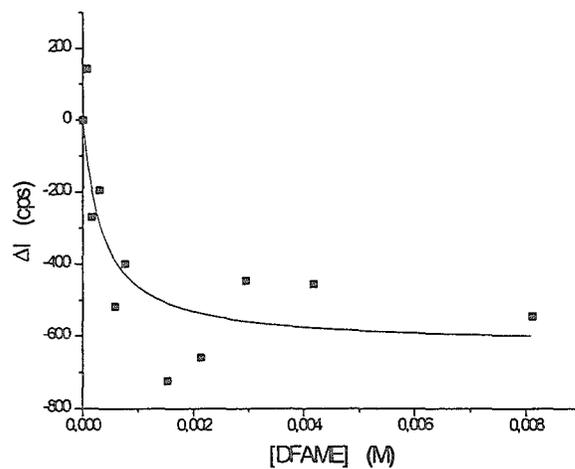
**Figura 6.9.** Intensidad de fluorescencia diferencial de ANS  $5.04 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 nm), TC  $9.1 \times 10^{-4}$  M y emisión a (a) 500 nm y (b) 516 nm como función de la concentración de NALFA a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.3).



(a)



(b)



(c)

**Figura 6.10.** Intensidad de fluorescencia diferencial de ANS  $5.04 \times 10^{-6}$  M (excitación 367 nm), TC  $9.1 \times 10^{-4}$  M y emisión a (a) 500 nm, (b) 516 nm y (c) 540 nm como función de la concentración de DFAME a pH 9.0. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.3).

### 6.3 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por espectroscopia de absorción electrónica

Se empleó la espectroscopia ultravioleta-visible para estudiar la interacción de la TC a pH 9.0, *i.e.*, en su forma zwitteriónica con los aminoácidos aniónicos quirales, NADA, NALA, NADFA y NALFA.

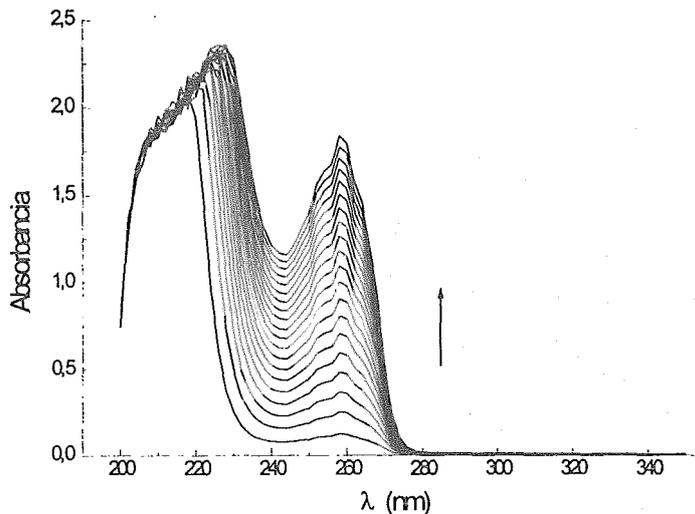
El procedimiento experimental consiste en dos series de experimentos. En el primero de ellos se lleva a cabo la titulación de 2.5 ml de TC  $4 \times 10^{-5}$  M en disolución amortiguadora de pH 9.0, mediante adiciones de 0.05 ml de una disolución aproximadamente 0.05 M del huésped, ajustada previamente a pH 9.0, para obtener concentraciones finales en la celda en el intervalo  $0 - 1.2 \times 10^{-2}$  ó  $0 - 1.4 \times 10^{-2}$  M. Después de cada adición se agita la disolución, se deja estabilizar y registra el espectro UV-VIS. En la segunda serie de experimentos a 2.5 ml de la disolución amortiguadora de pH 9.0 se adicionan volúmenes de 0.05 ml de la disolución concentrada del huésped, de tal forma que se obtengan concentraciones finales en la celda en el mismo intervalo que en el caso de la titulación de la TC, después de cada adición se agita la disolución, se deja estabilizar y se registra el espectro UV-VIS.

Las Figuras 6.11 y 6.12 muestran como ejemplo los espectros de absorbancia de NADFA y de la mezcla TC-NADFA en función de la concentración de NADFA.

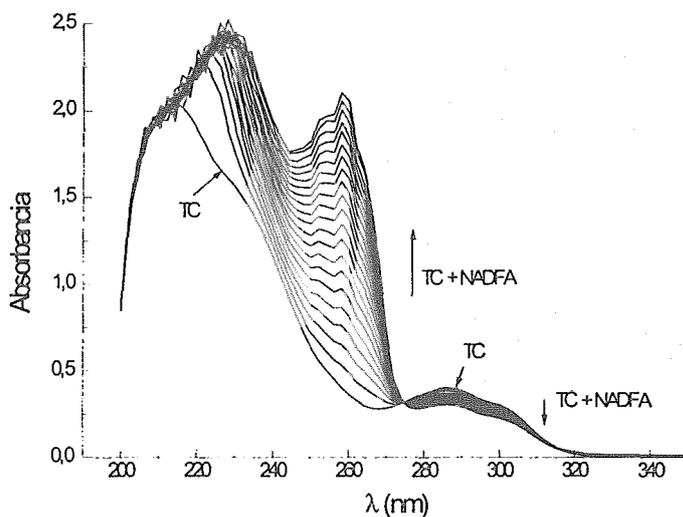
La Figura 6.13 muestra la relación de absorbancias a las longitudes de onda fija de 242, 260, 290, 294 y 300 nm como función de la concentración de NADFA. La Figura 6.14 presenta las relaciones de absorbancia a las longitudes de onda de 242, 244, 286, 290, 294 y 300 nm como función de la concentración de NALFA. Los cambios en las absorbancias para NADA y NALA se detectaron en los límites del error experimental. El Apéndice C (Tablas C.9-C.12) presenta las absorbancias del huésped y de la mezcla TC-huésped a diferentes longitudes de onda para los huéspedes estudiados

Es importante señalar que las titulaciones monitoreadas por esta técnica mostraron cambios muy sutiles en los espectros del anfitrión y huésped después de la

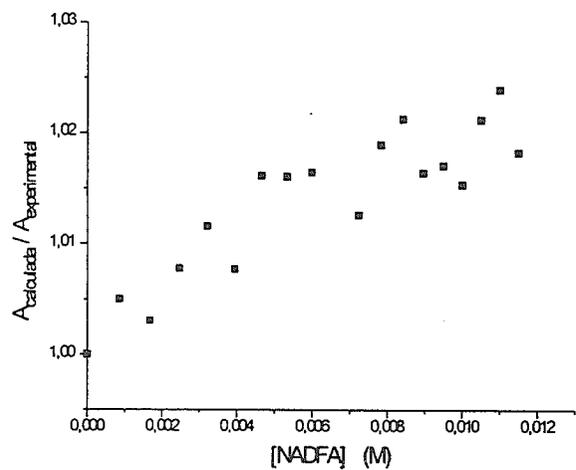
complejación, lo cual no permitió obtener valores confiables de las constantes de enlace y por tal razón no fueron estudiados otros huéspedes por esta técnica.



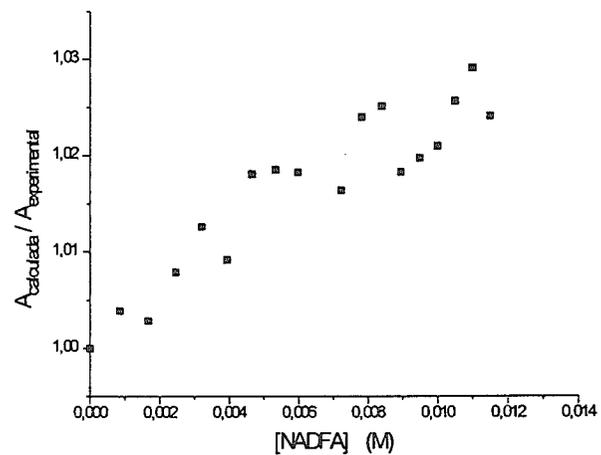
**Figura 6.11.** Espectros de absorbancia de NADFA en el intervalo de concentraciones  $8.5 \times 10^{-5}$  –  $1.2 \times 10^{-2}$  M, obtenidos por adiciones sucesivas de 0.05 ml de NADFA 0.043 M a 2.5 ml de una disolución amortiguadora de pH 9.0.



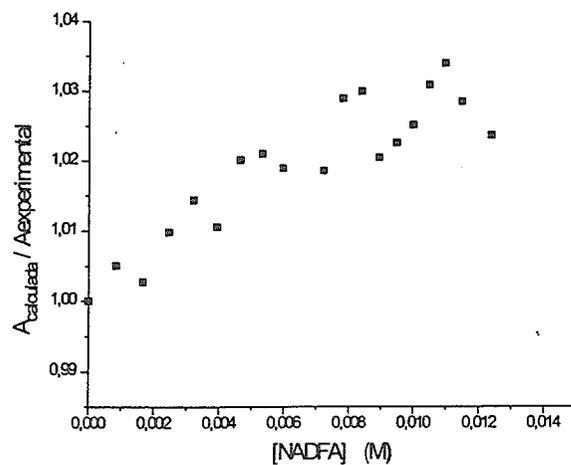
**Figura 6.12.** Espectros de absorbancia de TC  $4 \times 10^{-5}$  M y la mezcla TC-NADFA en el intervalo de concentraciones de NADFA  $8.5 \times 10^{-5}$  –  $1.2 \times 10^{-2}$  M, obtenidos por adiciones sucesivas de 0.05 ml de NADFA 0.043 M a 2.5 ml de una disolución de TC  $4 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora de pH 9.0.



(a)

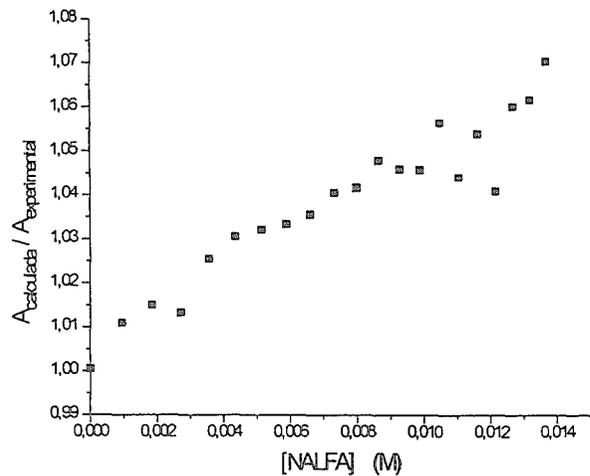


(b)

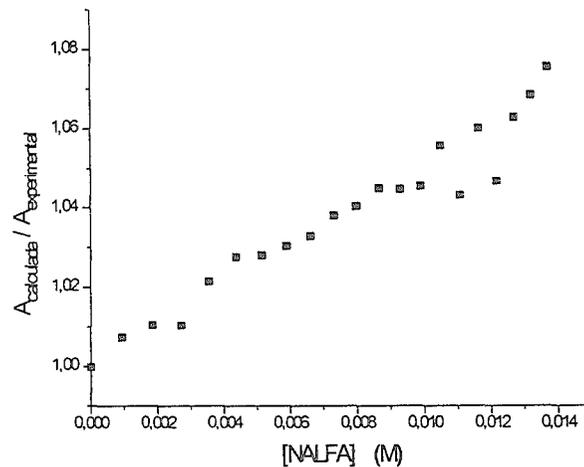


(c)

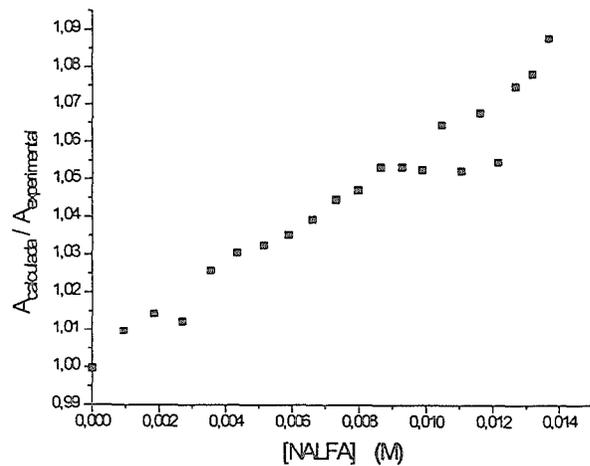
**Figura 6.13.** Relación entre absorbancias calculada y experimental de TC  $4 \times 10^{-5}$  M en solución amortiguadora a pH 9.0 como función de la concentración de NADFA a (a) 290, (b) 294 y (c) 300 nm.



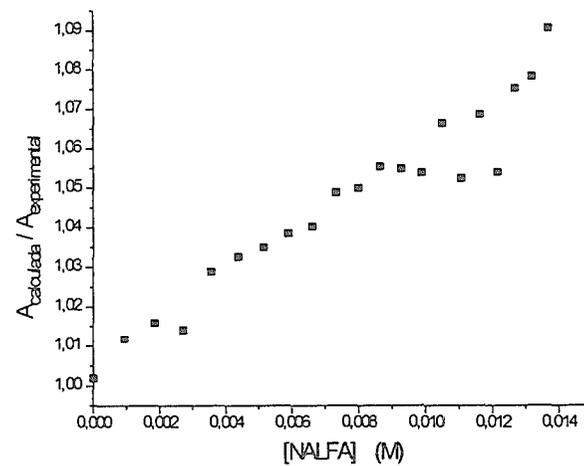
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6.14. Relación entre absorbancias calculada y experimental de TC  $4 \times 10^{-5}$  M en solución amortiguadora a pH 9.0 como función de la concentración de NALFA a (a) 286, (b) 290, (c) 294 y (d) 300 nm.

## 6.4 Determinación de las constantes de enlace tubocurarina-huésped por resonancia magnética protónica

Para el estudio de las interacciones y cálculo de las constantes de la TC con diferentes huéspedes a pH 9.0 por RMN  $^1\text{H}$ , las disoluciones de TC y aniones, cationes y especies zwitteriónicas fueron ajustadas a pH 9.0 con disoluciones concentradas de carbonato de sodio y ácido trifluoroacético en  $\text{D}_2\text{O}$  o bien con hidróxido de sodio deuterado en  $\text{D}_2\text{O}$ . Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  fueron registrados en espectrómetros Varian *Gemini* de 300 MHz (TC- NADFA y NALFA) y Varian *Unity* 400 MHz (TC- DFAME, LFAME, DFA, LFA y FEA).

Para determinar las constantes de asociación TC-huésped, se tituló una disolución de TC de concentración fija,  $5 \times 10^{-4}$  ó  $2 \times 10^{-3}$  M en  $\text{D}_2\text{O}$  mediante adiciones de disoluciones concentradas del huésped (NADFA 0.089 M, NALFA 0.086 M, DFAME 0.26 M, LFAME 0.28 M, DFA 0.15 M, LFA 0.17 M, FEA 0.28 M) para obtener entre 7 u 8 concentraciones finales del huésped en el tubo, en el intervalo de concentraciones indicadas en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2.** Condiciones experimentales para la obtención de las constantes de asociación TC-huésped a pH 9.0 por RMN  $^1\text{H}$ .

Huésped	[Huésped] (M)	[TC] (M)
NADFA	$2.49 \times 10^{-3}$ - $1.85 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-4}$
NALFA	$1.72 \times 10^{-4}$ - $4.79 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$
DFAME	$1.0 \times 10^{-3}$ - $5.3 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-3}$
LFAME	$1.1 \times 10^{-3}$ - $5.7 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-3}$
DFA	$1.1 \times 10^{-3}$ - $4.76 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-3}$
LFA	$1.0 \times 10^{-3}$ - $4.7 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-3}$
FEA	$1.0 \times 10^{-3}$ - $5.7 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-3}$

### 6.4.1 Cálculo de la constante de asociación

Para el análisis de los espectros se comparan los cambios de desplazamiento químico de la TC libre y en cada uno de los espectros registrados durante la titulación

para los huéspedes estudiados. Se seleccionan, para el cálculo de la constante de asociación, aquellos protones para los cuales se encontraron los cambios de desplazamiento más grandes.

Los cambios de desplazamiento químico obtenidos de la diferencia del desplazamiento químico del complejo TC-huésped menos el desplazamiento químico de la TC,  $\Delta\delta$  ( $\delta_{\text{TC-huésped}} - \delta_{\text{TC}}$ ), se grafican vs [huésped] y se ajustan con la ecuación (6.4), la cual considera la formación de un complejo de estequiometría 1:1.

$$\Delta\delta = \frac{a + \Delta\delta_{\infty} \cdot K \cdot X}{1 + K \cdot X} \quad (6.4)$$

Donde  $a$  es un parámetro inicial de ajuste que toma en cuenta un error en  $\delta$  en ausencia del huésped,  $\Delta\delta_{\infty}$  es el cambio de desplazamiento químico máximo inducido por complejación,  $X$  es la concentración del huésped y  $K$  es la constante de enlace.

El Apéndice C (Tablas C.13-C.18) presenta los desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento inducidos por complejación de la TC con cada uno de los huéspedes estudiados en función de la concentración del huésped.

Las Figuras 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20 y 6.21, muestran las gráficas de los cambios de desplazamiento químico de algunos protones como función de la concentración de NADFA, NALFA, DFAME, LFAME, DFA, LFA y FEA, respectivamente. La Tabla 6.6 presenta las constantes promedio obtenidas del análisis de diversos protones de la TC. La ecuación (6.4) también permite el cálculo de los valores límite de los desplazamientos químicos inducidos por complejación ( $\Delta\delta_{\infty}$ , complexation-induced chemical shifts, CIS), Tabla 6.7. Las direcciones de los desplazamientos inducidos varían para los diferentes protones de la TC, como es de esperarse por el efecto pantalla de la parte aromática del huésped. Los valores de CIS de hasta 0.03 ppm corresponden frecuentemente a los observados para la complejación no covalente en disolución acuosa [Godoy-Alcántar *et al.*, 1995,1996].

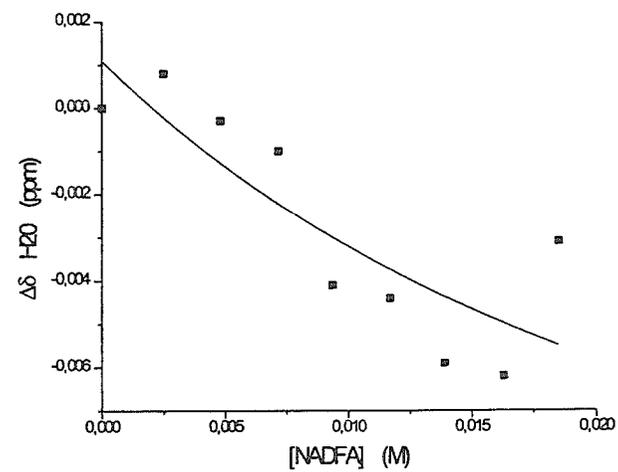
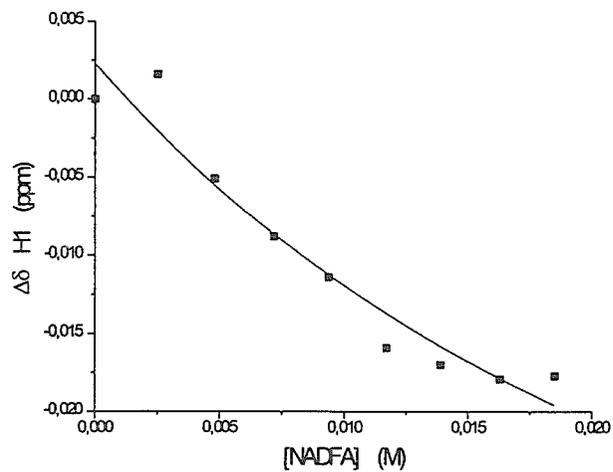


Figura 6.15. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de NADFA a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

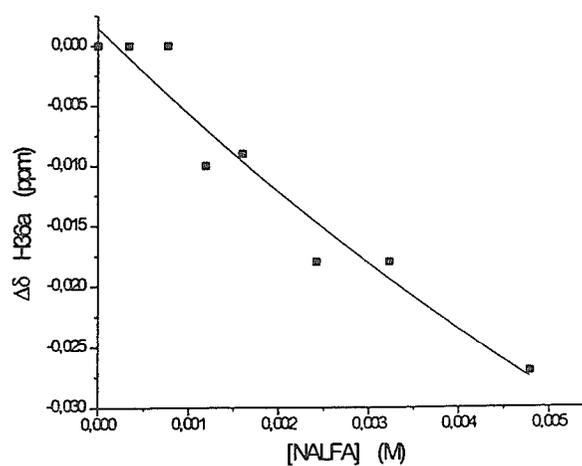
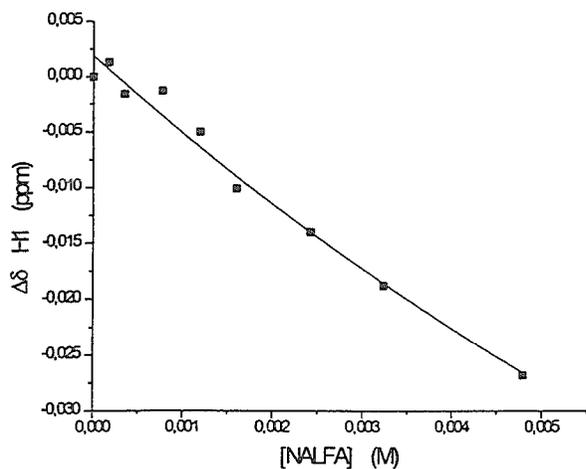


Figura 6.16. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de NALFA a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

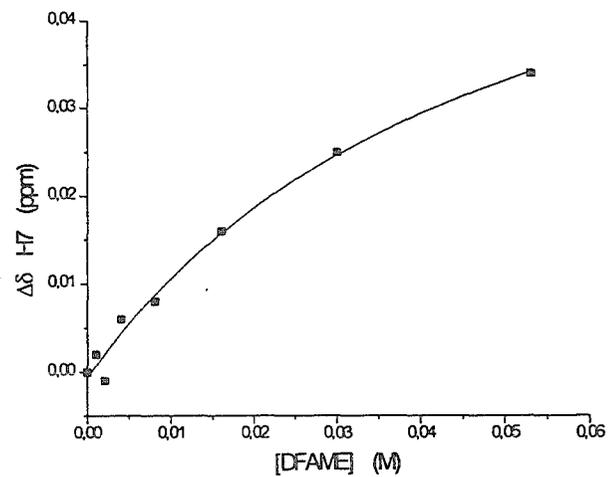
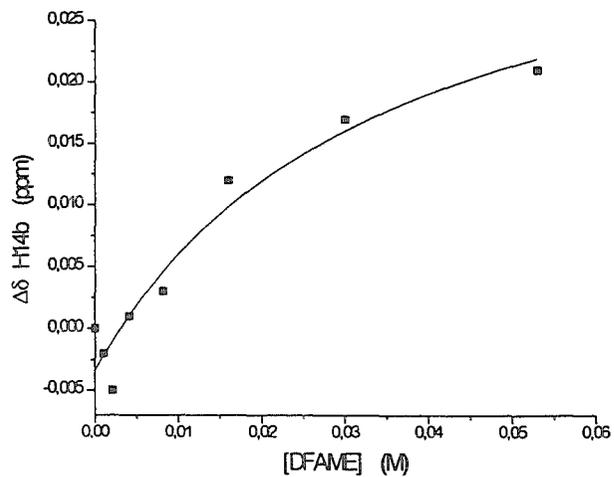
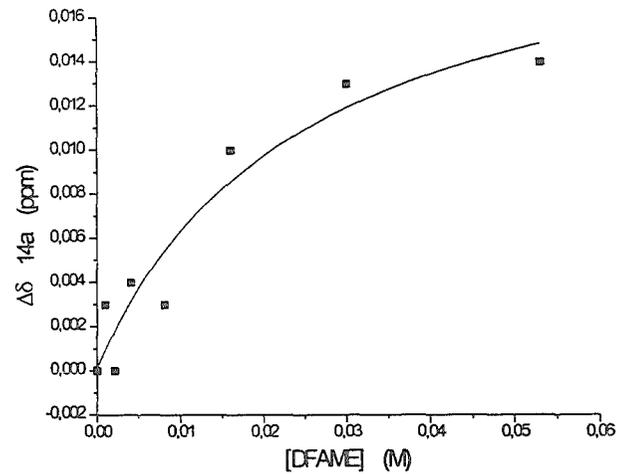
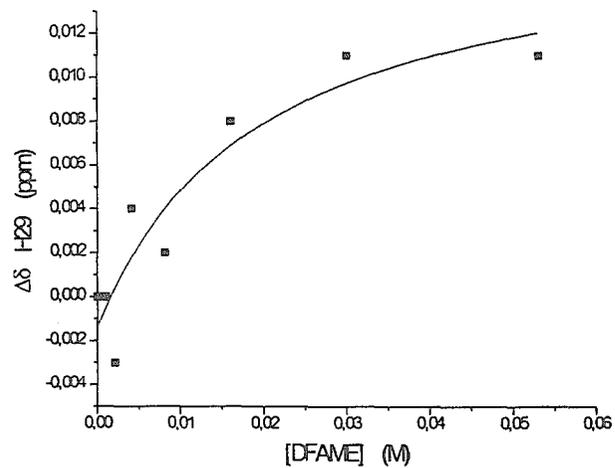


Figura 6.17. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de DFAME a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

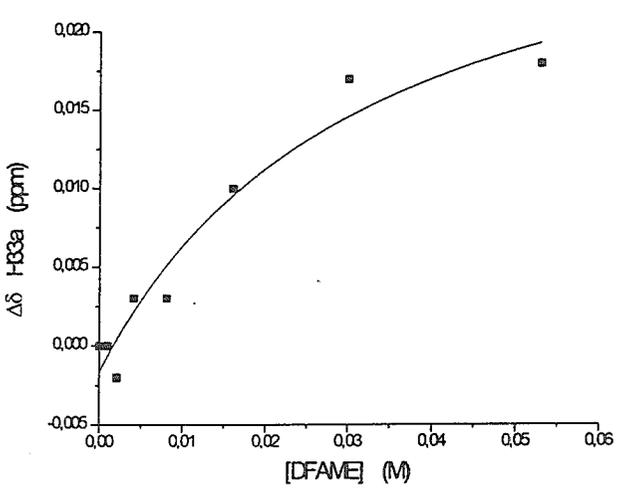
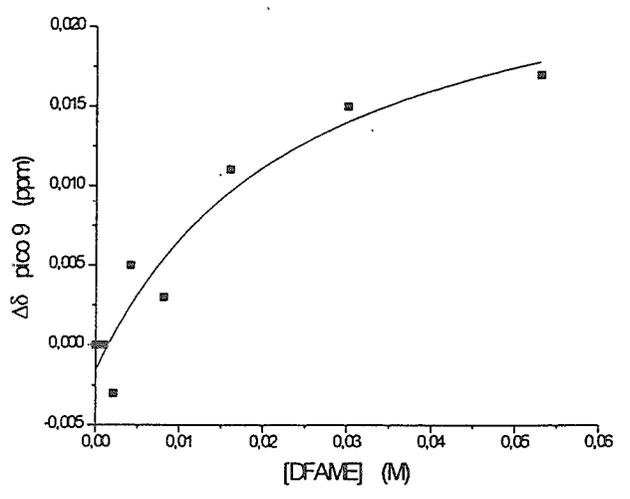
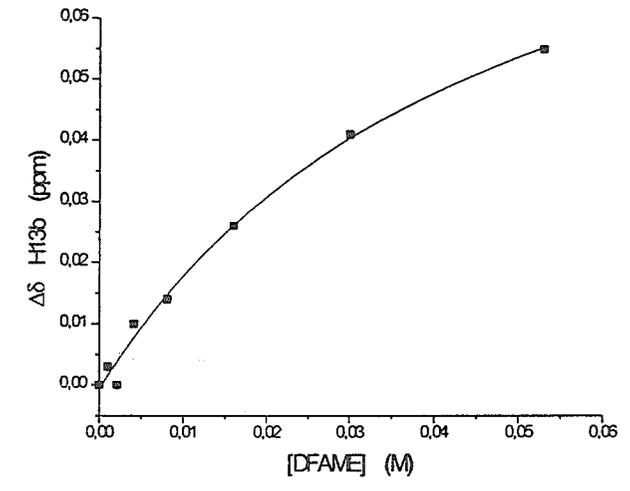
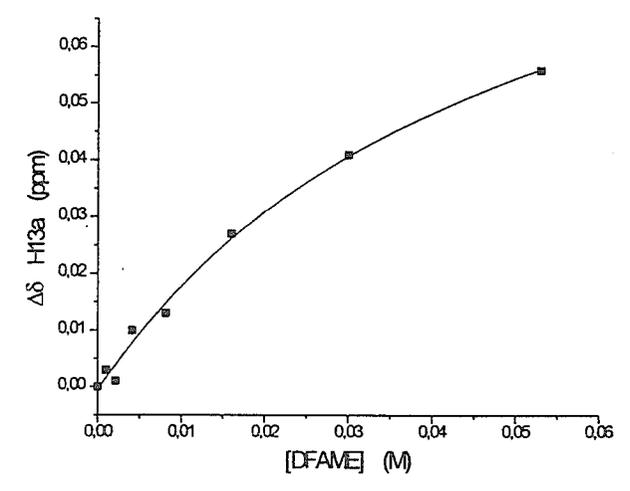


Figura 6.17. (Continuación).

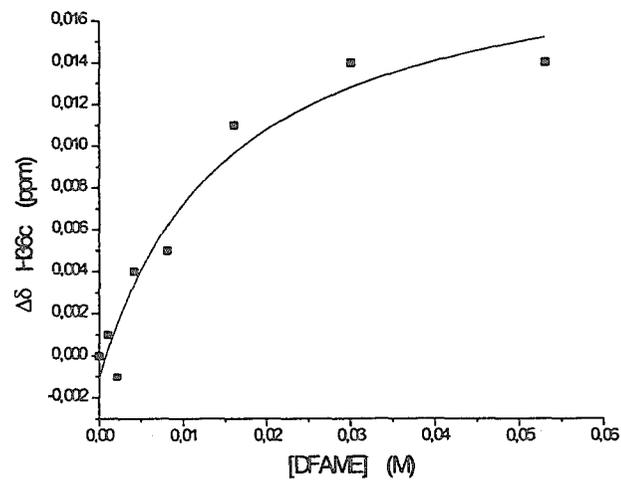
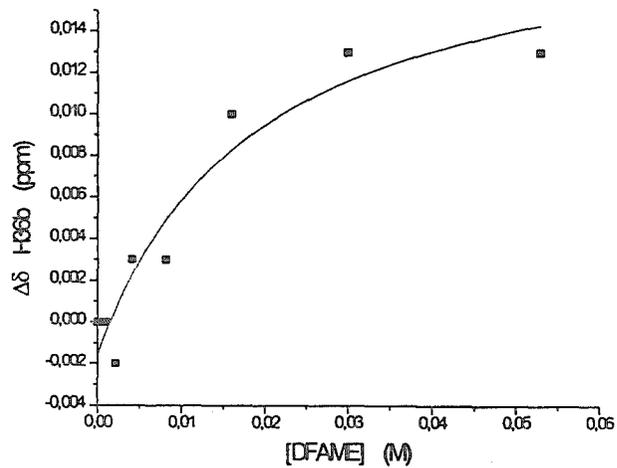
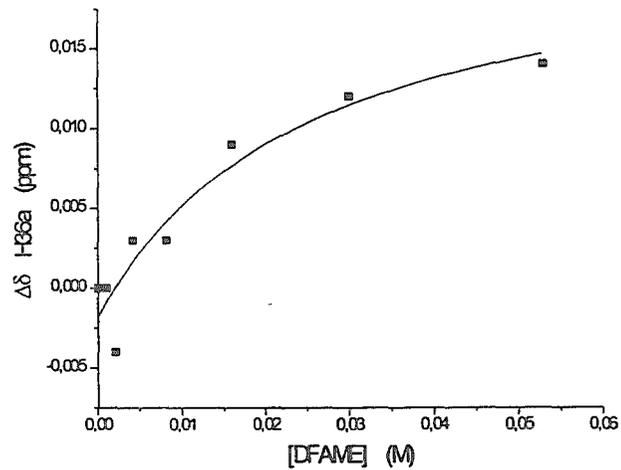
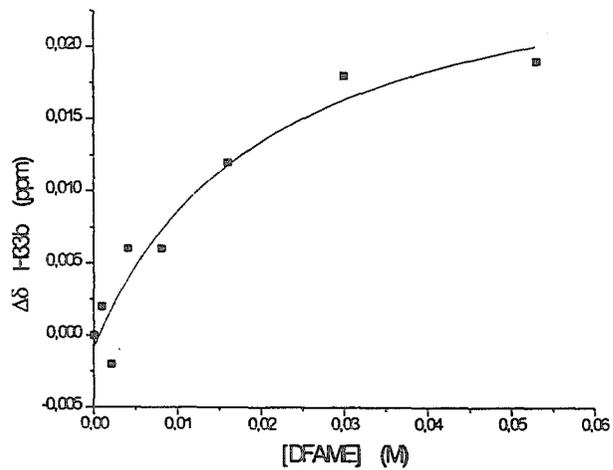


Figura 6.17. (Continuación).

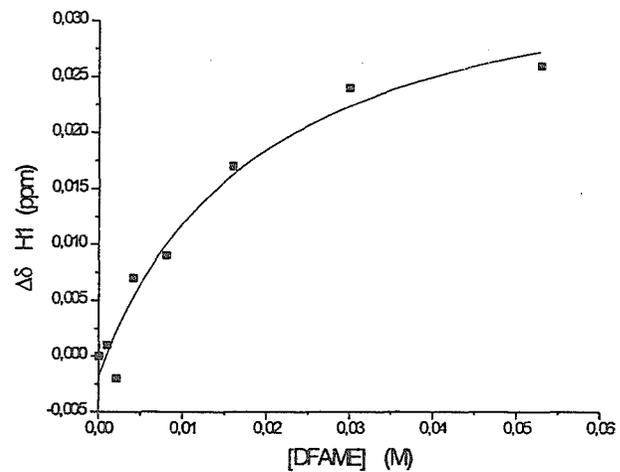


Figura 6.17. (Continuación).

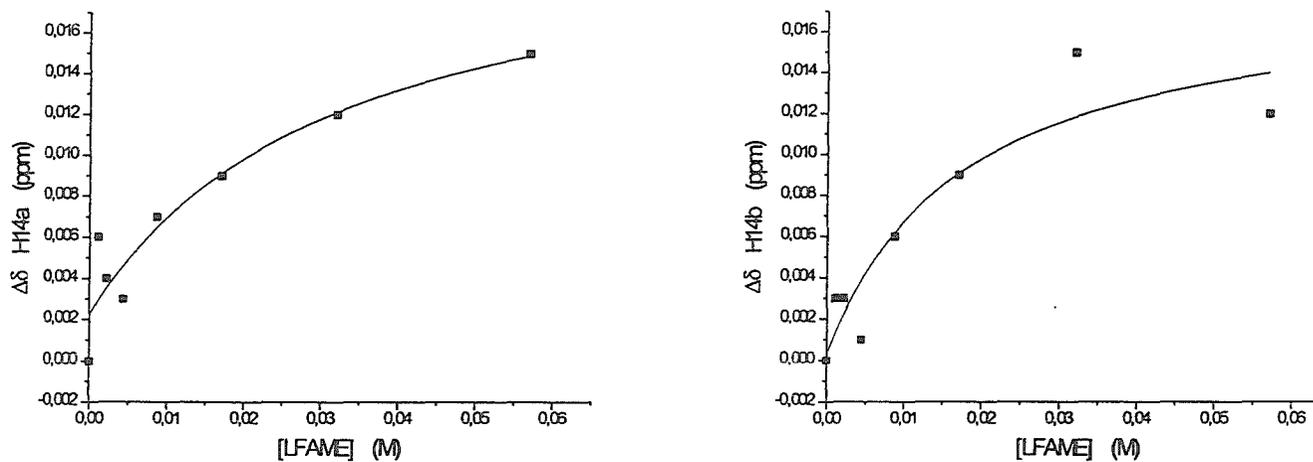


Figura 6.18. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de LFAME a pH 9.0 en  $D_2O$ . Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

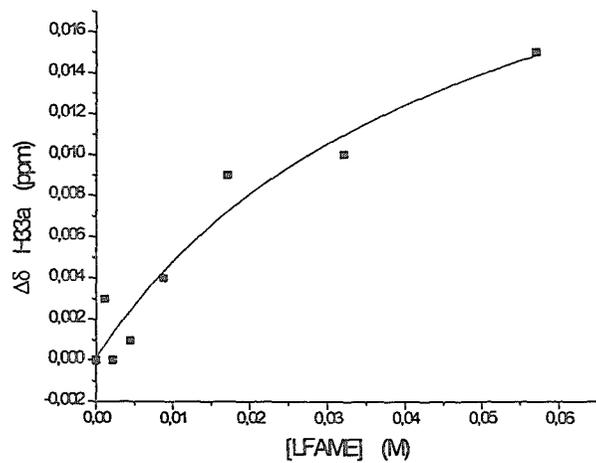
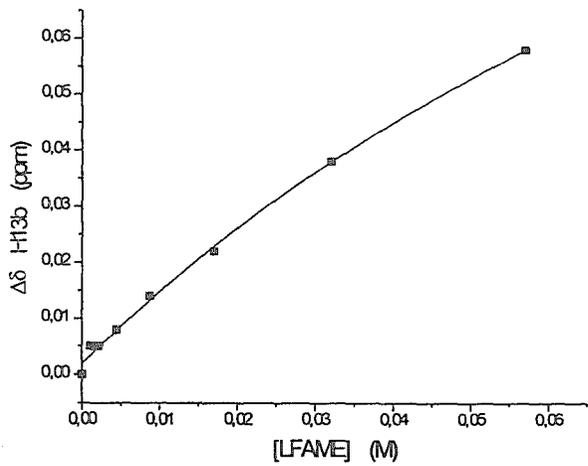
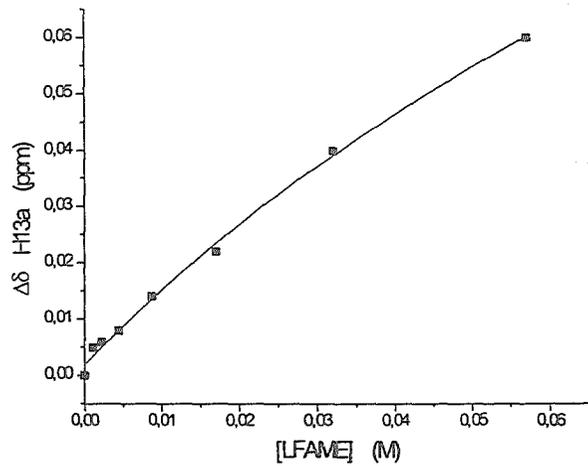
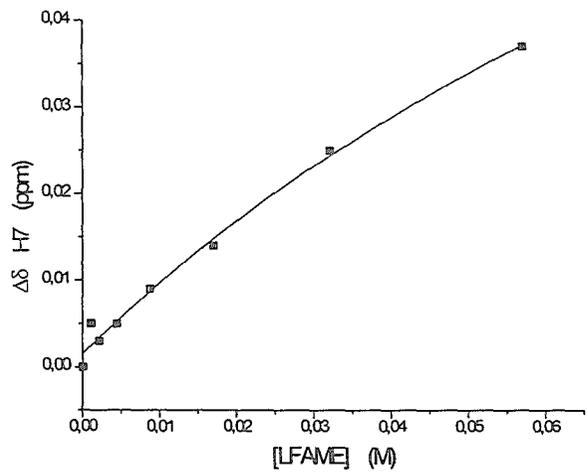


Figura 6.18. (Continuación).

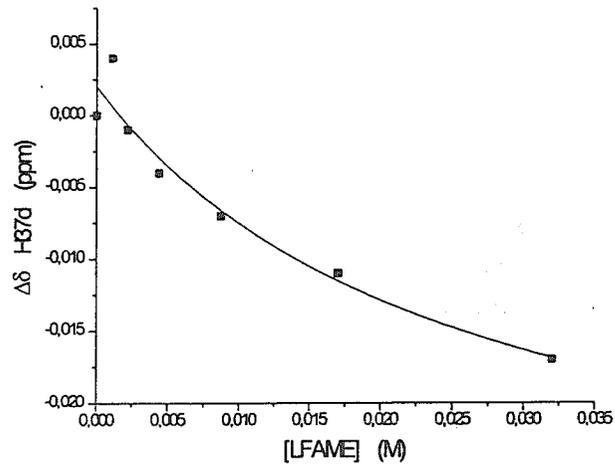
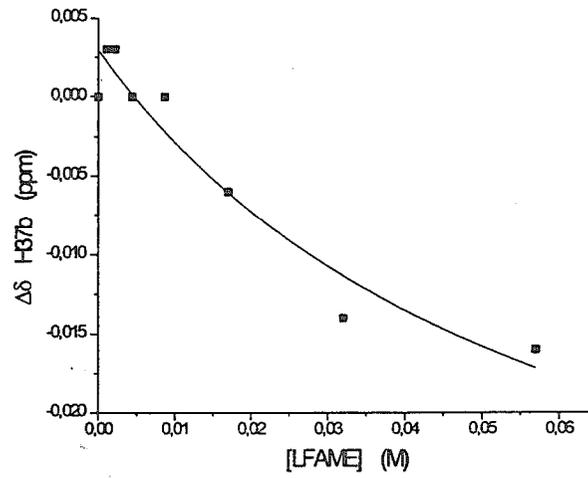
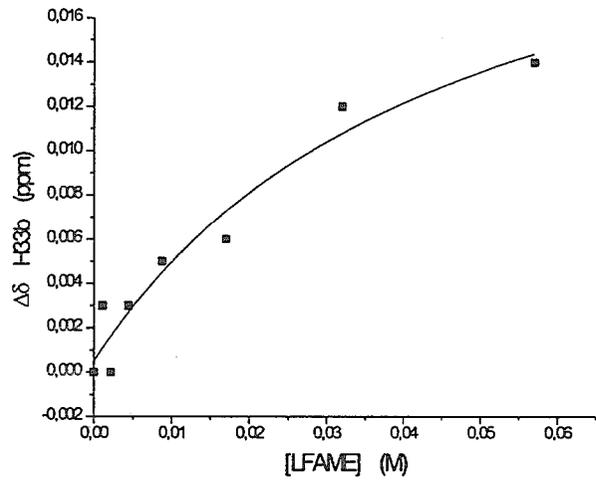


Figura 6.18. (Continuación).

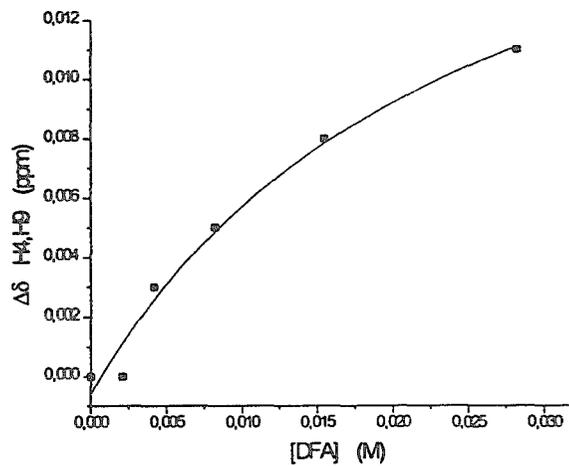
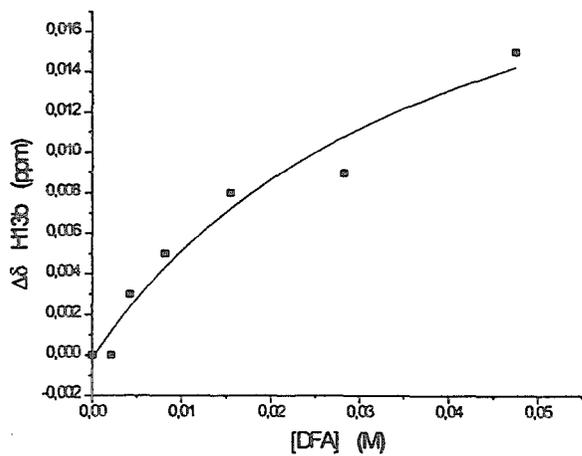
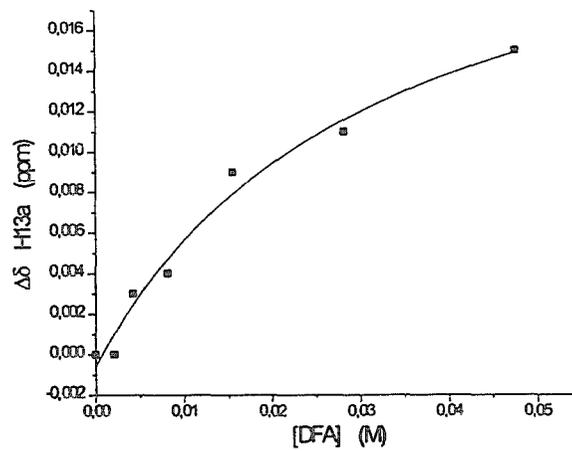
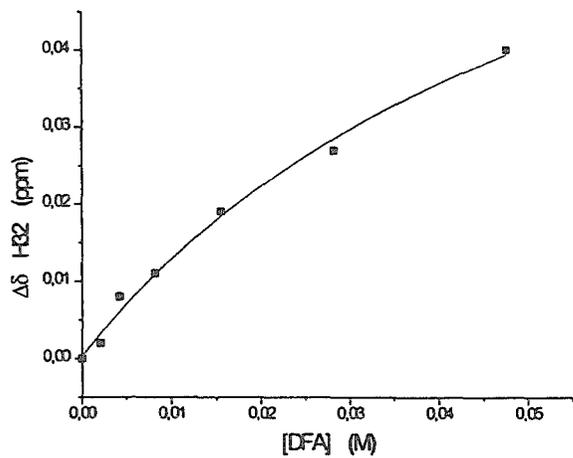


Figura 6.19. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de DFA a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

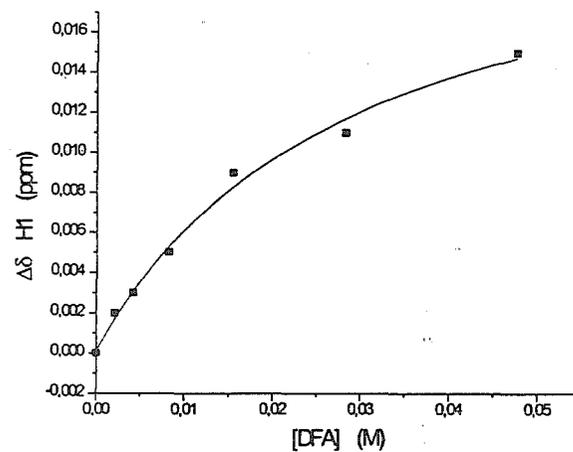


Figura 6.19. (Continuación).

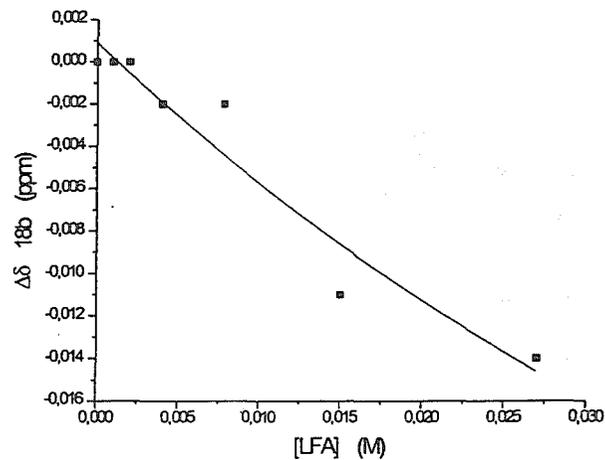
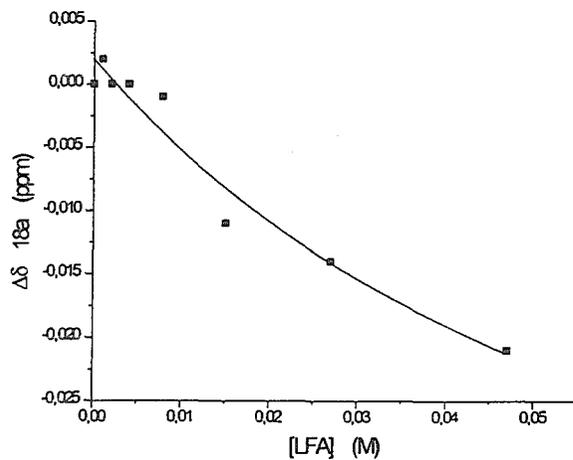


Figura 6.20. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de LFA a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

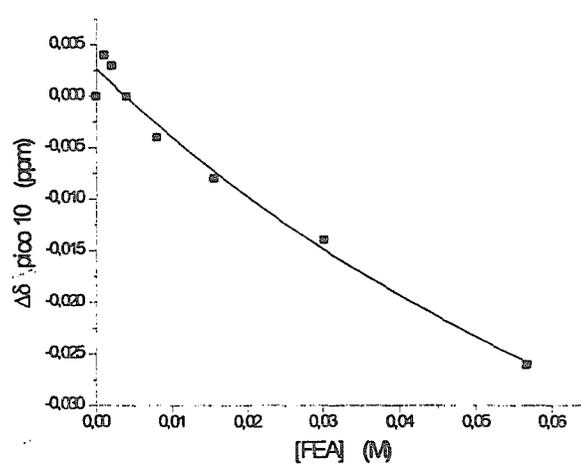
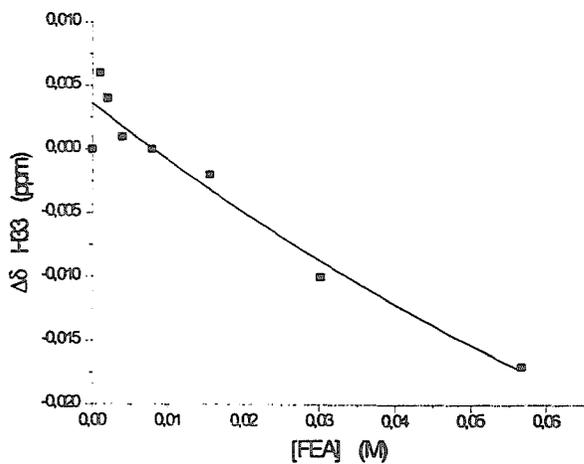
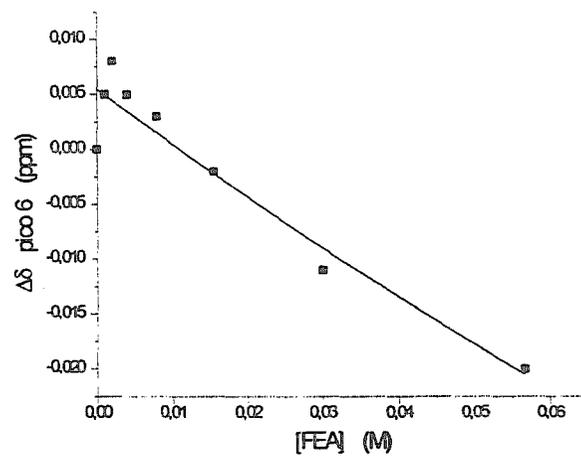
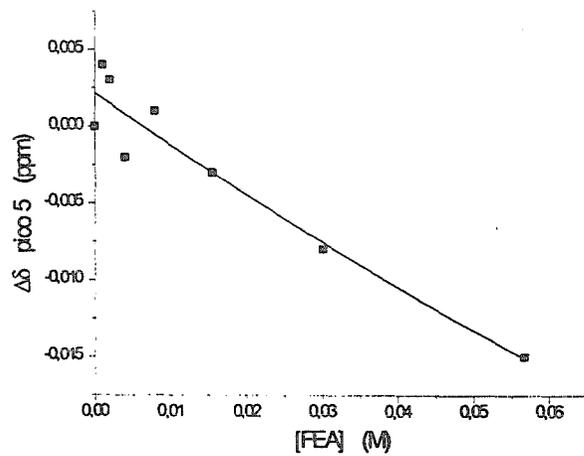


Figura 6.21. Cambio de desplazamiento químico de algunos protones de la TC como función de la concentración de FEA a pH 9.0 en D<sub>2</sub>O. Las curvas son perfiles teóricos calculados con la ecuación (6.4).

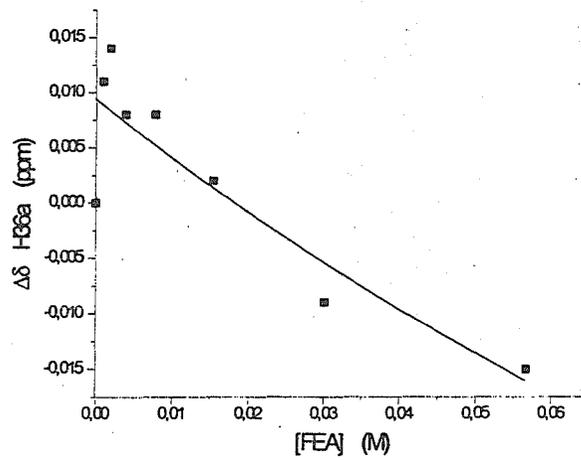
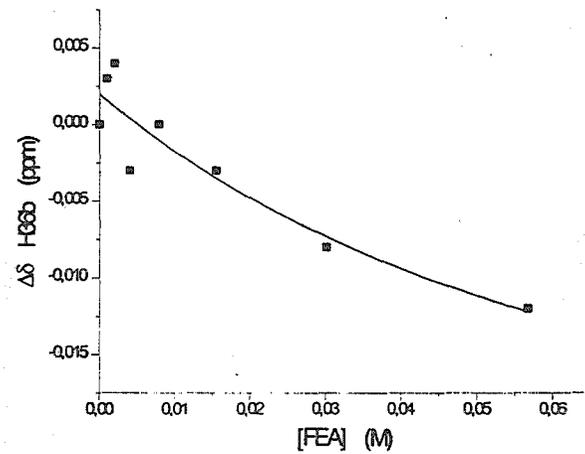
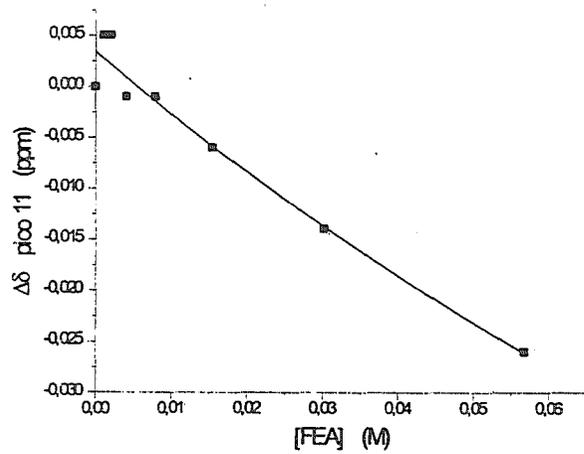


Figura 6.21. (Continuación).

## 6.5 Cinética de la hidrólisis de ésteres por la tubocurarina empleando la espectroscopia de absorción electrónica

Se estudió la cinética de hidrólisis del acetato de *para*-nitrofenol (APNF) y de los ésteres enantioméricos *para*-nitrofenilo N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina (PNFNCDFA y PNFNCLFA), los cuales son sustratos cromofóricos comúnmente empleados para el estudio de esterasas [Jencks, 1989], en presencia de la tubocurarina por espectroscopia ultravioleta-visible. El objetivo de este estudio es determinar la reactividad nucleofílica de los fenolatos de la tubocurarina.

### 6.5.1 Cinética de hidrólisis del acetato de *para*-nitrofenilo

Se estudió la cinética por el método de velocidades iniciales, el cual requiere el conocimiento de  $\epsilon$  del producto. Se determinó  $\epsilon$  del nitrofenol a diferentes pH's, *i.e.*, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. La señal se monitoreó a 318 ó 400 nm. Los datos obtenidos fueron ajustados linealmente y de la ecuación de ajuste se calculó  $\epsilon$  a un 0.4% de acetonitrilo ( $\epsilon_{0.4\%}$ ); la concentración de acetonitrilo empleada para preparar la disolución de acetato de *para*-nitrofenol. La adición de acetonitrilo fue necesaria debido a la baja solubilidad del APNF en agua.

Para el estudio de la cinética de hidrólisis del APNF se preparó una disolución amortiguadora universal de ácido fosfórico y ácido bórico de concentración 0.032 M (ajustada al pH de estudio), se toman 2.4 ml de esa disolución, la cual será el blanco de las cinéticas. Se agrega 0.1 ml de una disolución de APNF  $1 \times 10^{-3}$  M para una concentración de  $4 \times 10^{-5}$  M en la celda y se inicia una cinética de 10 minutos. Posteriormente se repitió el mismo procedimiento con diferentes concentraciones de TC.

No se observó ninguna reacción entre la TC y el APNF a  $\text{pH} < 6$ , pero en disoluciones más básicas, la velocidad de la ruptura del éster fue monitoreada por la

aparición de la banda correspondiente al anion *para*-nitrofenolato centrada en aproximadamente 400 nm.

Los datos obtenidos de las cinéticas, gráficas de absorbancia vs tiempo, fueron ajustados linealmente, la pendiente de estos ajustes proporciona las velocidades iniciales en unidades de absorbancia / segundo,  $V_0$  (A/s). Las Figuras 6.22, 6.23 y 6.24 muestran como ejemplo el ajuste lineal de los datos obtenidos de las cinéticas químicas a diferentes condiciones de reacción a pH 7.5. La Tabla 6.3 resume las velocidades iniciales obtenidas de los ajustes lineales de los datos experimentales a los diferentes pH's estudiados.

Las velocidades iniciales así obtenidas se grafican vs la concentración de la TC a cada valor de pH, se ajustan linealmente y la pendiente de la curva  $V_0$  (A/s) / [TC] (M), ver por ejemplo la Figura 6.25, es uno de los datos de la ecuación (6.5) empleada para calcular la constante de velocidad de segundo orden de la reacción.

$$k_2 = \frac{v_0}{[TC] \cdot \epsilon \cdot [S]} \quad (6.5)$$

donde  $v_0$  es la velocidad inicial, [TC] es la concentración total de la tubocurarina y  $\epsilon[S]$  es la absorbancia del *para*-nitrofenolato ( $4 \times 10^{-5}$  M) con 0.4 % de acetonitrilo.

La Tabla 6.4 resume los valores de  $V_0$  (A/s) / [TC] y  $\epsilon[S]$  obtenidos para los diferentes pH's.

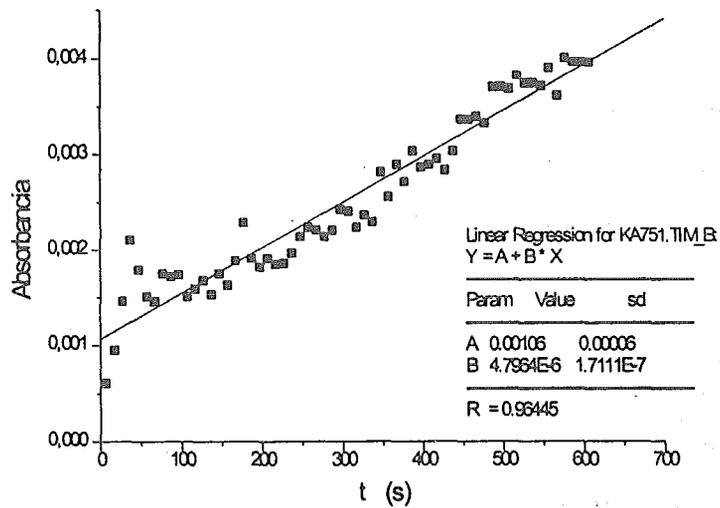


Figura 6.22. Absorbancias observadas como función del tiempo (600 s) bajo las condiciones:  $[TC] = 0$  y  $[APNF] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  a pH 7.5. La línea mostrada corresponde al ajuste lineal y la pendiente del ajuste proporciona el valor de  $V_0$  (A/s) presentado en la Tabla 6.3.

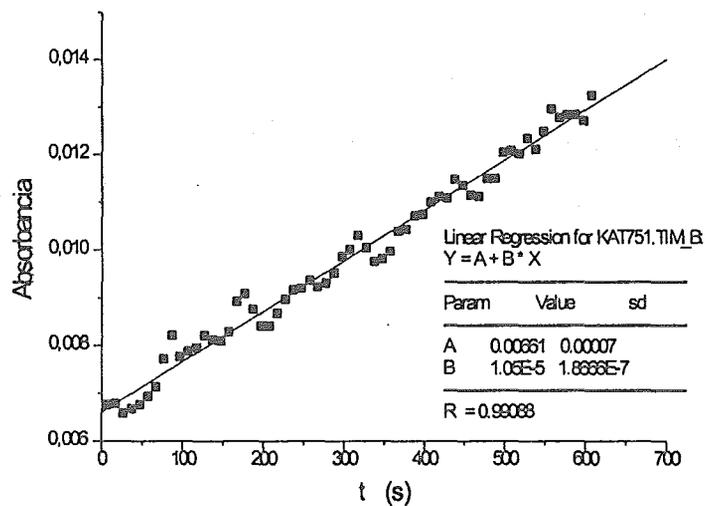
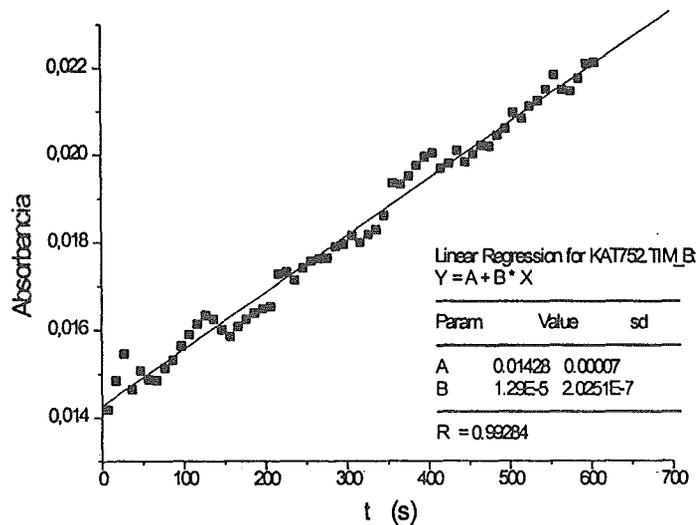


Figura 6.23. Absorbancias observadas como función del tiempo (600 s) bajo las condiciones:  $[TC] = 3.85 \times 10^{-4} \text{ M}$  y  $[APNF] = 3.85 \times 10^{-5} \text{ M}$  a pH 7.5. La línea mostrada corresponde al ajuste lineal y la pendiente del ajuste proporciona el valor de  $V_0$  (A/s) presentado en la Tabla 6.3.



**Figura 6.24.** Absorbancias observadas como función del tiempo (600 s) bajo las condiciones:  $[TC] = 7.68 \times 10^{-4}$  M y  $[APNF] = 3.70 \times 10^{-5}$  M a pH 7.5. La línea mostrada corresponde al ajuste lineal y la pendiente del ajuste proporciona el valor de  $V_0$  (A/s) presentado en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3.** Velocidades iniciales obtenidas del ajuste lineal de los datos de las cinéticas de reacción ( $\lambda = 400$  nm) a diferentes concentraciones de TC y APNF como función del pH.

pH	$V_0$ (A/s) $[TC]_f = 0$ $[APNF]_f = 4.0 \times 10^{-5}$ M	$V_0$ (A/s) $[TC]_f = 3.85 \times 10^{-4}$ M $[APNF]_f = 3.85 \times 10^{-5}$ M	$V_0$ (A/s) $[TC]_f = 7.41 \times 10^{-4}$ M $[APNF]_f = 3.70 \times 10^{-5}$ M
6.0 <sup>a</sup>	$(1.10 \pm 0.03) \times 10^{-6}$	$(1.10 \pm 0.03) \times 10^{-6}$ $1.27 \times 10^{-6c}$	$(1.69 \pm 0.03) \times 10^{-6}$ $1.82 \times 10^{-6c}$
6.5 <sup>a</sup>	$(0.94 \pm 0.05) \times 10^{-6}$	$(2.18 \pm 0.03) \times 10^{-6}$ $2.26 \times 10^{-6}$	$(2.21 \pm 0.03) \times 10^{-6}$ $2.38 \times 10^{-6c}$
7.0	$(2.8 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	$(6.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ $6.86 \times 10^{-6c}$	$(6.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ $7.46 \times 10^{-6c}$
			$V_0$ (A/s) $[TC]_f = 7.68 \times 10^{-4}$ M $[APNF]_f = 3.70 \times 10^{-5}$ M
7.5	$(4.8 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(1.05 \pm 0.02) \times 10^{-5}$ $1.39 \times 10^{-5c}$	$(1.29 \pm 0.02) \times 10^{-5}$ $1.09 \times 10^{-5c}$
8.0	$(1.61 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	$(2.48 \pm 0.01) \times 10^{-5}$ $2.58 \times 10^{-5c}$	$(3.70 \pm 0.03) \times 10^{-5b}$
8.5	$(2.70 \pm 0.002) \times 10^{-5}$	$(4.70 \pm 0.002) \times 10^{-5}$	$(6.40 \pm 0.004) \times 10^{-5}$
9.0	$(7.06 \pm 0.003) \times 10^{-5}$	$(9.08 \pm 0.006) \times 10^{-4}$	$(1.07 \pm 0.00003) \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Valores obtenidos a  $\lambda = 318$  nm.

<sup>b</sup>  $V_0$  obtenida a  $[TC] = 8.0 \times 10^{-4}$  M y  $[APNF] = 3.70 \times 10^{-5}$  M.

<sup>c</sup> Valores corregidos por dilución.

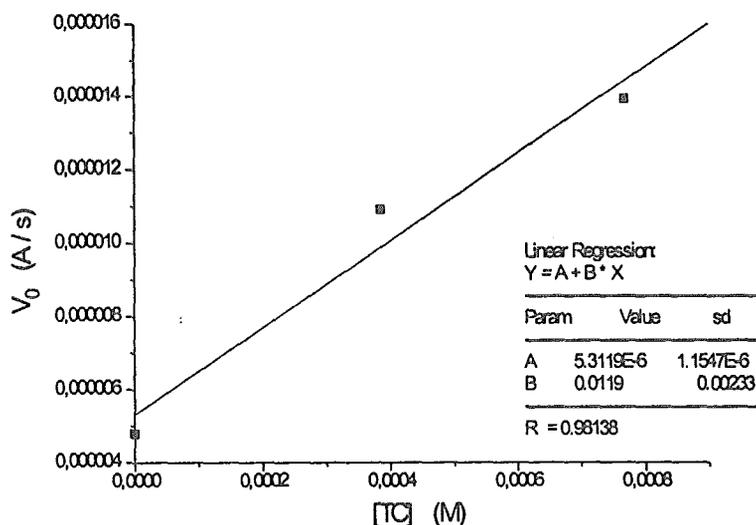


Figura 6.25. Gráfica de  $V_0$  vs  $[TC]$  a pH 7.5. La línea muestra el ajuste lineal cuya pendiente proporciona la relación  $V_0 / [TC]$  presentada en la Tabla 6.4 y empleada para el cálculo de  $k_2$ .

Tabla 6.4. Valores de la pendiente de la gráfica de  $V_0$  vs  $[TC]$ ,  $\varepsilon[S]$  y  $k_2$  (10 % de error) empleados para el cálculo de la constante de reacción  $k_2$  de segundo orden ( $\lambda = 400$  nm).

pH	$V_0$ (A/s) / $[TC]$ (M)	$\varepsilon[S]$	$k_2$
6.0 <sup>a</sup>	$(1 \pm 3) \times 10^{-4}$	0.413	0.0023
6.5 <sup>a</sup>	$(2.00 \pm 0.9) \times 10^{-3}$	0.346	0.0057
7.0	$(6 \pm 3) \times 10^{-3}$	0.432	0.0146
7.5	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	0.594	0.0200
8.0	$(2.61 \pm 0.05) \times 10^{-2}$	0.690	0.0379
8.5	$(4.8 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	0.730	0.0660
9.0	$(4.7 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	0.732	0.0645

<sup>a</sup> Valores obtenidos a  $\lambda = 318$  nm.

Las gráficas de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden vs  $[TC]$  fueron siempre lineales, indicando que la reacción es de primer orden en TC. Las pendientes de estas gráficas dan constantes de velocidad observadas  $k_2$ , las cuales se grafican contra el pH en la Figura 6.26. Estos resultados fueron ajustados por regresión no-lineal empleando la ecuación (6.6), derivada de la suposición de reacciones

independientes del APNF con ambos hidroxilos aromáticos desprotonados (ver la deducción completa de esta ecuación en el Apéndice A.4).

$$k_{2,obs} = \frac{(k_1 + k_2) + k_1 \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \quad (6.6)$$

donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de segundo orden para cada uno de los nucleófilos y  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$  son las constantes de acidez de los fenoles correspondientes. Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  están dados en la Tabla 6.8 (ver más adelante en la Discusión).

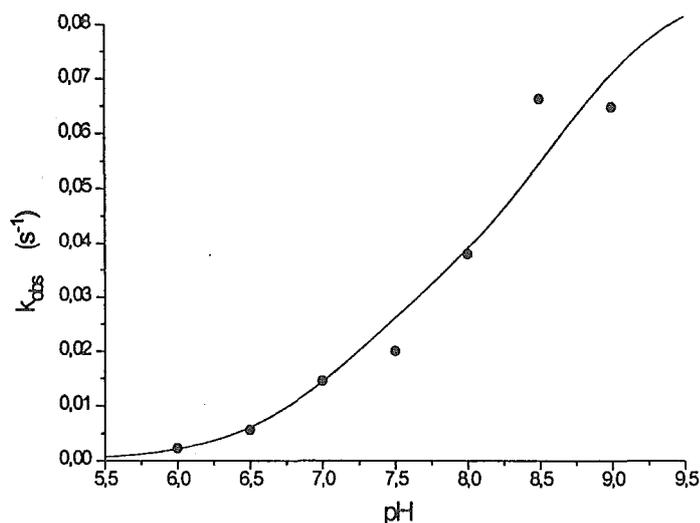


Figura 6.26. Gráfica de  $k_2$  observada vs pH, la línea continua muestra el ajuste de los datos experimentales con la ecuación (6.6).

### 6.5.2 Cinética de hidrólisis de los ésteres enantioméricos del *para*-nitrofenilo-N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina

Para determinar la habilidad de la TC de una discriminación cinética quiral se estudió la hidrólisis de los ésteres del *para*-nitrofenilo-N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina

(PNFNCDFA y PNFNCLFA) en la presencia de TC a pH 9.0. Debido a que son los sustratos más reactivos, la cinética se estudió por el método integral de pseudo-primer orden.

Para el estudio de la cinética de hidrólisis de los ésteres enantioméricos se preparó una disolución amortiguadora universal de bis-tris propano ((1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino] propano) de concentración 0.032 M y se ajustó a pH 9.0; esta disolución, será el blanco de las cinéticas. Al igual que en el caso del APNF se monitoreó la aparición del anion *para*-nitrofenolato. Para ambos ésteres enantioméricos se registró la absorbancia del anion *para*-nitrofenolato vs tiempo cada 10 s durante 30 minutos en presencia de TC a las concentraciones de  $3.85 \times 10^{-4}$ ,  $9.60 \times 10^{-4}$ ,  $1.50 \times 10^{-4}$ ,  $2.21 \times 10^{-3}$ ,  $2.94 \times 10^{-3}$ ,  $5.88 \times 10^{-3}$  y  $9.81 \times 10^{-3}$  M y a una concentración fija del éster en el intervalo  $4.2 \times 10^{-6}$ – $4.04 \times 10^{-6}$  M. También fueron medidas las cinéticas en ausencia de TC. Es importante señalar que debido a la insolubilidad de los ésteres enantioméricos éstos fueron disueltos en acetonitrilo para obtener una disolución concentrada de  $2.1 \times 10^{-4}$  M, después se tomaron 0.05 ml que fueron añadidos a la disolución amortiguadora para obtener una concentración final de  $4.2 \times 10^{-6}$  M en la celda y un porcentaje de 1.85% de acetonitrilo por volumen en la celda.

Las gráficas de absorbancia vs tiempo de los datos cinéticos, para ambos ésteres enantioméricos dan una curva de tipo exponencial que fue ajustada con la ecuación (6.7) de la cinética de pseudo-primer orden [Jencks, 1989]:

$$A_{obs} = A_0 + \Delta A_{\infty} \cdot (1 - e^{-k \cdot x}) \quad (6.7)$$

donde  $A_0$  es la absorbancia inicial,  $\Delta A_{\infty}$  es el cambio de absorbancia al tiempo infinito,  $k$  es la constante de velocidad de pseudo-primer orden y  $x$  es el tiempo en segundos. Los valores de  $k$  obtenidos por el empleo de la ecuación (6.7) para ambos ésteres enantioméricos se presentan en la Tabla 6.5.

**Tabla 6.5.** Valores de  $k$  para los ésteres PNFNCDFa y PNFNCLFA en presencia de TC.

[TC]	$k_{\text{PNFNCDFa}} (\times 10^{-3})$	$k_{\text{PNFNCLFA}} (\times 10^{-3})$
0	$1.05 \pm 0.01$	$1.04 \pm 0.02$
$3.85 \times 10^{-4}$	$2.26 \pm 0.02$	$2.58 \pm 0.02$
$9.60 \times 10^{-4}$	$3.16 \pm 0.02$	<sup>a</sup>
$1.50 \times 10^{-3}$	$2.63 \pm 0.03$	$3.81 \pm 0.03$
$2.21 \times 10^{-3}$	$3.87 \pm 0.03$	<sup>a</sup>
$2.94 \times 10^{-3}$	$3.90 \pm 0.06$	$4.46 \pm 0.08$
$5.88 \times 10^{-3}$	$4.65 \pm 0.16$	$7.20 \pm 0.09$
$9.81 \times 10^{-3}$	$3.92 \pm 0.03$	$9.12 \pm 0.53$

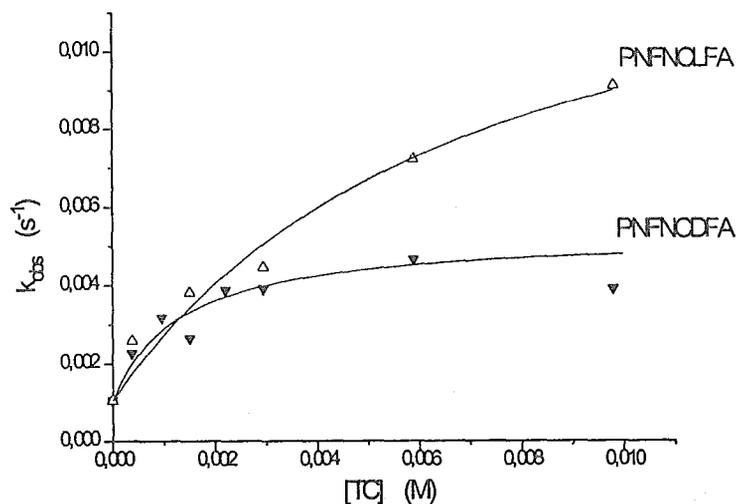
<sup>a</sup> No se determinó  $k$  a esta concentración.

Las gráficas de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden vs [TC] fueron del tipo hiperbólico de Michaelis-Menten (ver Figura 6.27). Las constantes  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$ , constante catalítica y constante de Michaelis, respectivamente, fueron calculadas del ajuste no lineal de los datos obtenidos con la ecuación (6.8).

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_{\text{cat}} \cdot K \cdot [\text{TC}]}{1 + K \cdot [\text{TC}]} \quad (6.8)$$

Los valores obtenidos del ajuste fueron  $k_{\text{cat}} = 0.0053 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ ,  $1/K = K_m = 1.32 \pm 0.17 \text{ mM}$  y  $k_{\text{cat}} = 0.015 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ ,  $1/K = K_m = 7.1 \pm 1.0 \text{ mM}$  para el D- y L-enantiómero, respectivamente. Bajo condiciones de un gran exceso del nucleófilo (TC) sobre el éster,  $k_{\text{cat}}$  corresponde a la constante de velocidad de acilación y  $K_m$  debe ser igual a la constante de disociación verdadera del complejo substrato-catalizador. Por lo tanto, el valor inverso de  $K_m$  puede ser considerado como las correspondientes constantes de enlace (ver Tabla 6.6).

El Apéndice A.5 presenta la aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten a los sistemas estudiados en este trabajo.



**Figura 6.27.** Constantes de velocidad de pseudo-primer orden ( $k_{obs}$ ) para la hidrólisis de los ésteres *para*-nitrofenilo-N-carbobencilo-D/L-fenilalanina vs [TC] a pH 9.0.

## 6.6 Discusión

Como fue mencionado previamente, el estado de ionización de la molécula de TC es crucial para sus propiedades de reconocimiento. Las curvas de distribución para diferentes estados de ionización calculados con los valores de  $pK_a$  de los hidroxilos aromáticos de la TC (7.16 y 8.67) y el grupo amino terciario (9.65) predicen que la fracción de la estructura bi-zwitteriónica (Figura 6.1) alcanza el máximo de ca. 65 % del total de la concentración de TC a pH 9.0 y un valor máximo de 75 % a pH 9.5. Sin embargo, los estudios no se hicieron a pH 9.5 debido a la baja estabilidad de la TC a ese pH. En virtud de que las propiedades de reconocimiento del macrociclo están determinadas principalmente por el balance propio de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, es razonable explorar su enlace con derivados de aminoácidos que contienen diferentes cargas al igual que partes hidrofóbicas. Se eligió una serie de compuestos huésped para los estudios de enlace (Figura 6.1) que incluye los zwitteriones enantioméricos de la fenilalanina (DFA y LFA), cuyos anillos de fenilo fueron probados ser complemento de la estructura tipo ranura de la TC [Godoy-

Alcántar *et al.*, 1995,1996], cuatro derivados de la fenilalanina protegidos que soportan un carboxilato aniónico (NADFA y NALFA), neutros pero con un grupo amino altamente polar (DFAME y LFAME), o menos polares y protegidos en el N y O (PNFNCDFA y PNFNCLFA), catiónica  $\beta$ -feniletilamina (FEA) y una especie aniónica menos hidrofóbica (NADA y NALA).

### Termodinámica de la complejación

La Tabla 6.6 resume las constantes de enlace de los derivados de aminoácidos y de la feniletilamina con la TC zwitteriónica determinadas por fluorescencia, RMN y cinéticamente. Una comparación con los datos previamente obtenidos para la forma catiónica de la TC muestran que la afinidad general de enlace del anfitrión hacia los huéspedes aniónicos decrece, pero no desaparece con la introducción de dos cargas negativas.

**Tabla 6.6.** Constantes de enlace ( $M^{-1}$ ) para la d-tubocurarina en disolución acuosa (pH 9.0) a 25°C.

Huésped	Fluorescencia		RMN $^1H^a$	pH 6.0
	Directa	Competencia		
ANS	40-100 <sup>b</sup> 50-130 <sup>c</sup>			$(3.30 \pm 0.25) \times 10^3$ <sup>d</sup>
NADA			< 5	$50 \pm 20$ <sup>d</sup> $85 \pm 20$ <sup>e</sup>
NALA			< 5	< 20 <sup>e</sup>
NADFA	100-450	1070-2550	$32 \pm 1$	$370 \pm 50$ <sup>d</sup>
NALFA		20-30	$56 \pm 20$	$270 \pm 70$ <sup>e</sup>
DFAME	$(1-3) \times 10^3$ <sub>f</sub>	1500-2900	$39 \pm 14$	< 20 <sup>e</sup>
LFAME		<sub>f</sub>	$22 \pm 13$	
DFA			$30 \pm 9$	
LFA			$12 \pm 2$	
FEA			$5 \pm 3$	
PNFNCDFA			$760 \pm 100$ <sup>g</sup>	
PNFNCLFA			$140 \pm 20$ <sup>g</sup>	

<sup>a</sup> Valores promedio obtenidos de varios protones, ver en el Apéndice C (Tablas C.15-C.18).

<sup>b</sup>  $K_1 \cdot K_3$  ( $M^{-2}$ ), ver ecuación (6.1).

<sup>c</sup>  $K_1 + K_2$  ( $M^{-1}$ ), ver ecuación (6.1).

<sup>d</sup> Constante de enlace obtenida por fluorometría, ver Tabla 5.8.

<sup>e</sup> Constante de enlace obtenida por conductometría, ver Tabla 5.8.

<sup>f</sup> Interacción que no pudo ser detectada.

<sup>g</sup> Constantes calculadas de datos cinéticos.

El estudio del enlace de ANS a la TC a pH 9.0 ocurre con la formación de un complejo 1:2, aún cuando no es posible determinar las constantes de enlace, la suma ( $K_1 + K_2 = 50-130 \text{ M}^{-1}$ ) y el producto ( $K_1 \cdot K_2 = 40-100 \text{ M}^{-2}$ ) de ellas indican un grado de complejación bajo para la asociación del par iónico. El aumento de fluorescencia registrado podría indicar interacción parcial entre los anillos aromáticos de las moléculas huésped y la superficie hidrofóbica de la TC. Este resultado contrasta con el obtenido a pH 6.0, en el cual la estequiometría fue 1:1 y la constante de enlace un orden más alto ( $3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Las constantes de enlace obtenidas para NADFA por fluorescencia directa y por competencia difieren en un orden de magnitud y por uno y dos órdenes de magnitud con respecto a la constante obtenida por RMN. La constante de enlace para NALFA es del mismo orden de magnitud que la obtenida por RMN. Las constantes obtenidas por fluorescencia directa y por competencia para DFAME coinciden, pero son dos órdenes de magnitud menores que el valor obtenido por RMN. En general, la diferencia en las constantes de enlace obtenidas por fluorescencia y RMN podría reflejar la formación de un complejo de estequiometría más alta (complejo ternario) en fluorescencia.

El decremento observado de los valores de  $K$  obtenidos por RMN de al menos un orden de magnitud para NADA, NALA y NADFA es explicado por la repulsión electrostática entre los grupos aniónicos del anfitrión y el huésped. Al mismo tiempo, el enlace de NALFA mejora notablemente a pH 9 y por lo tanto invierte la enantioselectividad del reconocimiento al comparar con pH 6. Este efecto podría atribuirse al cambio de la conformación del macrociclo en el estado zwitteriónico.

Por otro lado, la aparición de dos cargas negativas en la molécula anfitrión no resulta en un enlace importante con huéspedes catiónicos, como puede verse de la pequeña constante de enlace obtenida para FEA. La comparación de las constantes de enlace para NADFA, NALFA, DFAME, LFAME, DFA y LFA muestra que la carga del huésped es de poca importancia para el enlace de los D-enantiómeros, sin embargo, para los L-enantiómeros la presencia de las cargas negativas mejora el enlace mientras que la carga positiva lo debilita. Se espera que todos estos huéspedes enantioméricos tengan contribuciones hidrofóbicas al enlace similares debido a la presencia de un

anillo aromático y que esta contribución sea la dominante. Realmente, las energías libres de todos estos huéspedes difieren por menos de 1 kcal/mol. El análisis de las constantes de enlace de los huéspedes enantioméricos PNFNCDFa y PNFNCLFA considerablemente más hidrofóbicos, indica que las constantes se incrementan casi 20 veces para el D-enantiómero y de 3 a 10 veces para el L-enantiómero, demostrando nuevamente la importancia de la contribución hidrofóbica. Estas observaciones junto con la constante de enlace baja para FEA sugieren que hay una conformación en los complejos anfitrión-huésped que permite un contacto máximo entre las áreas hidrofóbicas de la TC y las moléculas huésped además de un contacto estrecho del carboxilato del huésped con los grupos amonio del anfitrión para los L-enantiómeros, pero ninguna atracción de los grupos amonio del huésped a los sitios aniónicos de la TC.

Es un poco inesperado que la afinidad de enlace de NADFA, NALFA, DFAME, LFAME, DFA y LFA sea modesta y casi independiente del estado iónico del huésped. Debido a los puentes salinos múltiples que podrían formarse entre las partes que soportan varias cargas sería de esperarse asociaciones mucho más fuertes [Schneider,1994]. La explicación más probable de ese comportamiento es la incapacidad del anfitrión y el huésped para formar pares iónicos debido a impedimento estérico y/o repulsiones electrostáticas entre cargas del mismo signo. Así, parece que la principal fuerza directriz para la complejación es la superficie de interacción hidrofóbica.

Entre los huéspedes NADFA, NALFA, DFAME, LFAME, DFA y LFA, la enantioselectividad del enlace varía de marginal a cercana al error experimental para NADFA y NALFA, a muy notable, una diferenciación de tres veces, entre DFA y LFA. La discriminación más alta se observa para los isómeros del zwitterion de la fenilalanina no protegida, la cual posee la afinidad absoluta más baja. Esto podría indicar que la selectividad se debe a interacciones iónicas débiles y a otras interacciones polares, las cuales son maximizadas en la presencia de muchas cargas. Además la energía total del enlace es aumentada por interacciones hidrofóbicas.

### ***Estructura de los complejos***

Para visualizar las posibles estructuras de los complejos se llevaron a cabo cálculos de acoplamiento (docking) con los ésteres DFAME y LFAME con la TC bi-zwitteriónica empleando el campo de fuerza de SYBYL/TRIPOS. La simulación es complicada ya que el macrociclo puede adoptar numerosas conformaciones, como puede verse de un modelo de CPK. La evaluación de las diferencias de energía entre las conformaciones por modelado molecular no pueden tomar en cuenta los efectos de solvatación y por lo tanto podrían no ser confiables. Por esta razón se empleó como una aproximación inicial la conformación de la TC de estructuras cristalinas ya reportadas [Reynolds y Palmer, 1976]. Como se muestra en las Figuras 6.28 en esta conformación el macrociclo forma una superficie cóncava con los anillos aromáticos abiertos para el contacto con el anillo fenílico del huésped. Como fue encontrado previamente [Godoy-Alcántar *et al.*, 1995,1996], el reconocimiento de los huéspedes aromáticos por la TC macrocíclica ocurre sin la formación de complejos de inclusión debido a la cavidad tan pequeña del anfitrión; más probablemente, el huésped es posicionado dentro de la ranura del macrociclo cóncavo.

A partir de los desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  (Tabla 6.7) puede obtenerse información acerca de la localización del huésped. Así, DFAME, LFAME, DFA y LFA ocasionan los cambios de desplazamiento más grandes en las señales de H13 y H32, protones localizados en los anillos aromáticos opuestos de la TC. Debido a que estos cambios son atribuidos más probablemente a efectos de desprotección de los grupos fenílicos del huésped, este último fue posicionado cercano a los correspondientes protones del anfitrión en la estructura del complejo en los estudios de acoplamiento (docking).

Las Figuras 6.28a y 6.28b muestran las estructuras minimizadas de los cálculos de acoplamiento (docking) de los complejos de la TC con LFA y DFA, respectivamente. La posición relativa de los L- y D-enantiómeros en las estructuras minimizadas es sustancialmente diferente. Los anillos de fenilo de las moléculas de anfitrión y huésped son coplanares en el caso del D-enantiómero proviendo una superficie de contacto más grande a un lado del anillo de fenilo del huésped, pero sin contacto aparente del otro

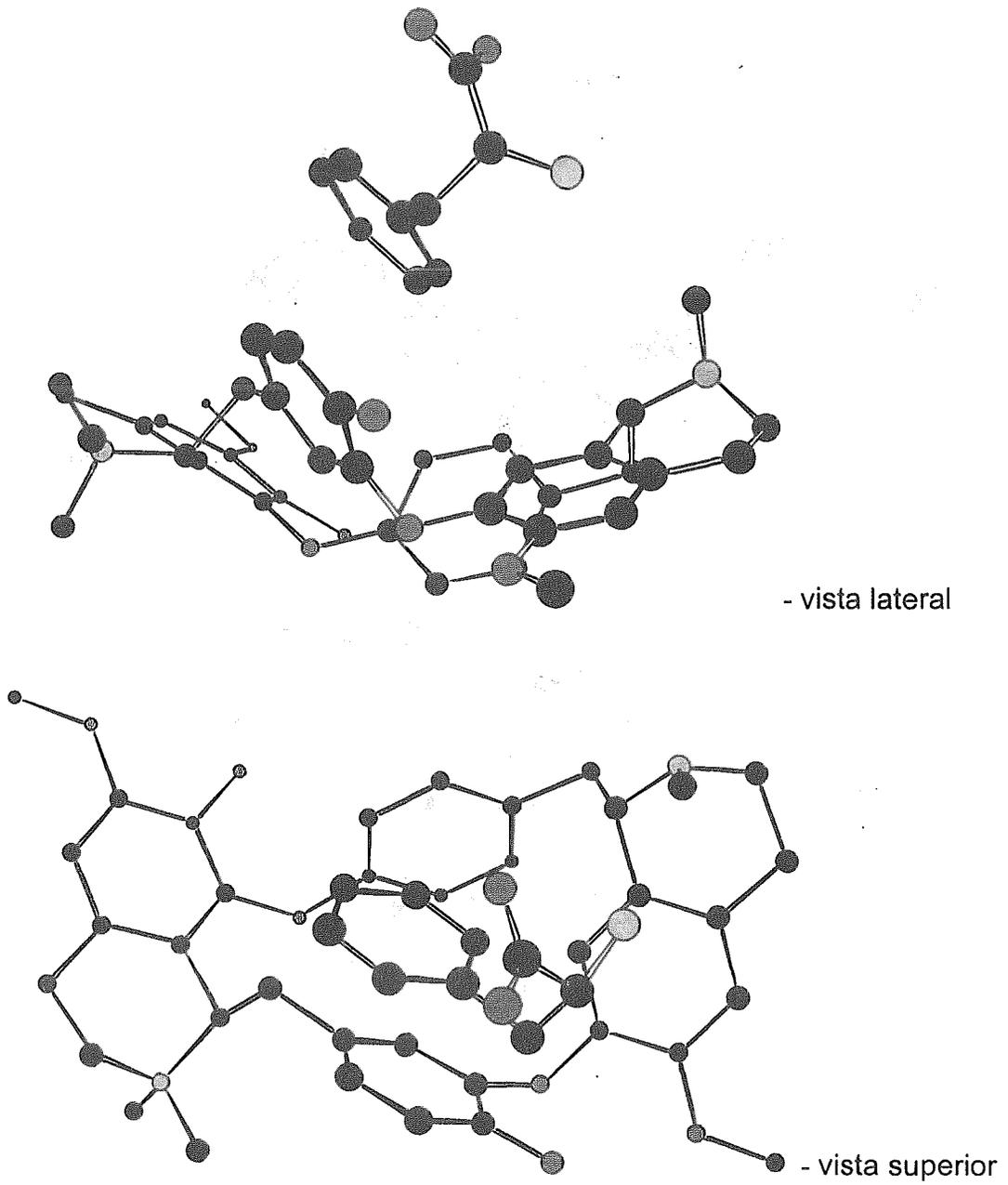
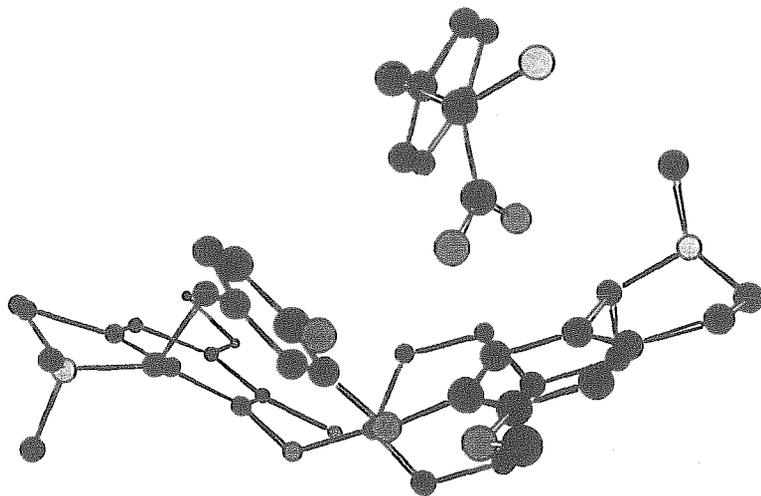
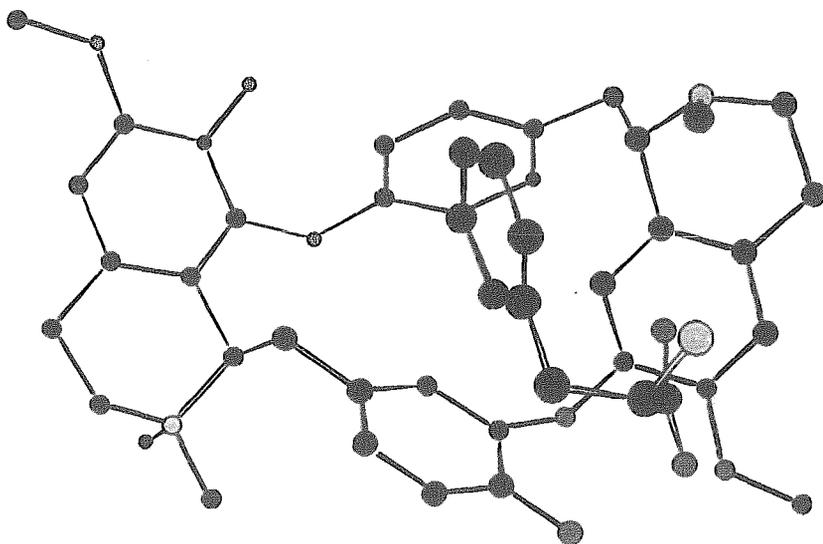


Figura 6.28a. Estructura simulada del complejo TC-DFAME.



- vista lateral



- vista superior

Figura 6.28b. Estructura simulada del complejo TC-LFAME.

lado. En la conformación de enlace del L-enantiómero ambos lados del fenilo están en contacto parcial con las superficies hidrofóbicas de la TC, resultando en superficies de contacto totales aproximadamente iguales para ambos enantiómeros. La diferencia más notable entre las conformaciones de enlace de los dos enantiómeros es una distancia mucho más corta entre los átomos de oxígeno del carboxilato del huésped y el oxígeno fenólico en C31 de la TC para LFA (2.7 y 4.0 Å) que para DFA (6.9 y 6.7 Å). Debido a que la energía de Coulomb es proporcional a  $1/r$ , esta diferencia en distancias da aproximadamente el doble de energía de repulsión para el L-enantiómero. Este efecto es compensado parcialmente por la distancia más corta de los mismos oxígenos de carboxilato al grupo amonio positivamente cargado en el N2 de TC para el L-enantiómero (4.1 y 6.2 Å) cuando se compara con el D-enantiómero (6.9 y 8.5 Å), pero esto da lugar únicamente a *ca.* 40 % de incremento en la energía atractiva. Además no hay prácticamente diferencia en la posición del grupo amonio del huésped con respecto a los grupos amonio y fenolato de TC: 5.7 Å a ambos grupos para LFA y 5.4 Å (fenolato en C-31) y 5.1 Å (amonio en N2) para DFA. En general, la repulsión se incrementa con el carboxilato del huésped para LFA, disminuye la constante de enlace de este enantiómero y da lugar a la enantioselectividad observada.

Aún cuando las estructuras minimizadas representan sólo las geometrías probables de los complejos de cada enantiómero están de acuerdo con los datos espectrales y reflejan cualitativamente los mecanismos generales de reconocimiento de la TC zwitteriónica.

Tabla 6.7. Desplazamientos químicos inducidos por complejación (CIS)<sup>a</sup> en los protones de la tubocurarina por la formación de complejos con NADFA, NALFA, DFAME, LFAME, DFA y LFA.

Protón de la TC	Desplazamientos químicos inducidos por complejación (ppm)					
	NADFA	NALFA	DFAME	LFAME	DFA	LFA
H29		-0.041	0.170			
H14			0.022	0.022	0.185	
			0.038	0.018		
H32			0.108		0.089	0.022
				0.229	0.015	0.103
H7			0.068	0.127		
H13		-0.106	0.110	0.213	0.025	0.039
			0.105	0.196	0.026	0.042
H33			0.032	0.027		
			0.028	0.026		
H4, H9					0.022	
H25				0.026	-0.015	-0.022
H37				-0.039	-0.031	-0.037
				-0.032	-0.020	-0.033
H18						-0.056
						-0.071
H36		-0.134			-0.043	-0.079
		-0.149 <sup>b</sup>				
H20	-0.016	-0.142				
H16		-0.039			-0.017	
H2					-0.017	-0.024
H1	-0.057	-0.145				-0.021
H21					-0.017	-0.022
					-0.019	
H37						-0.037
						-0.033
H19					-0.014	-0.022
					-0.014	-0.022

<sup>a</sup> Calculados como los valores límites de las gráficas de  $\Delta\delta$  ( $\delta_{TC-huésped} - \delta_{TC}$ ) vs [huésped]; las señales fueron asignadas de acuerdo a Fraenkel *et al.* [1994].

<sup>b</sup> Desplazamiento químico inducido por complejación sin considerar el desplazamiento químico obtenido a [NALFA] =  $1.72 \times 10^{-4}$  M, ya que a esta concentración se obtuvo un valor muy por abajo del esperado de acuerdo al ajuste teórico de los datos experimentales.

### **Actividad esterolítica de la TC**

Según nuestro conocimiento en este trabajo se presenta la reactividad de la TC hacia los ésteres *para*-nitrofenílicos, como el primer ejemplo de una actividad tipo esterasa de los alcaloides de la clase isoquinolina. Es importante mencionar que se observa una cinética del tipo Michaelis-Menten para la ruptura de los ésteres de aminoácidos empleados como sustratos de hidrólisis.

Los resultados para APNF no muestran evidencias de complejación TC-sustrato en el intervalo de concentraciones  $0-0.8 \times 10^{-3}$  M empleado para los experimentos cinéticos. En términos de hidrofobicidad el APNF es similar a NADFA y NALFA o DFAME y LFAME, *i.e.*, un anillo de fenilo y un grupo metilo y por lo tanto se puede esperar un enlace más débil de este sustrato con un valor de  $K_m$  de aproximadamente 0.03 M, el cual por supuesto no es detectable bajo las condiciones experimentales dadas. El hecho de que  $k_2 > k_1$  está en acuerdo con correlaciones conocidas de reactividad nucleofílica de aniones fenolato con su propia basicidad. Por comparación se incluyen en la Tabla 6.8 las constantes de velocidad para la ruptura del APNF por dos iones fenolato de basicidad similar a los de la TC. Evidentemente, la reactividad de la TC zwitteriónica es justo la que se podría esperar de su basicidad.

En el caso de los huéspedes enantioméricos PNFNCDFa y PNFNCLFA altamente hidrofóbicos, la enantioselectividad del enlace es grande  $K(\text{PNFNCDFa}) / K(\text{PNFNCLFA}) = 5.4$ , y es opuesta a la enantioselectividad cinética,  $k_{\text{cat}}(\text{PNFNCDFa}) / k_{\text{cat}}(\text{PNFNCLFA}) = 0.35$ . La relación de las constantes de velocidad de segundo orden  $k_{\text{cat}} / K_m$  para los dos sustratos puede ser interpretada como la relación de las "constantes de enlace" de los respectivos estados de transición [Lienhard, 1973]. En este estudio  $(k_{\text{cat}} / K_m(\text{PNFNCDFa})) / (k_{\text{cat}} / K_m(\text{PNFNCLFA})) = 1.9 \pm 1.1$ . Evidentemente, la enantioselectividad de enlace de la TC hacia un sustrato neutro, la cual se manifiesta en la relación de los valores de  $K$  se invierte al pasar a parámetros cinéticos (relación de valores de  $k_{\text{cat}}$ ). Para interpretar estos resultados hay que considerar que el estado de transición es aniónico ya que el ataque nucleofílico del grupo fenolato aniónico a una función éster lo convierte en un anion tetraédrico [Jencks, 1989]. Lo anterior esta

en acuerdo con la enantioespecificidad termodinámica observada para otros huéspedes de diferente carga: para los huéspedes neutros DFAME y LFAME la enantioespecificidad favorece al D-enantiómero, mientras que para los huéspedes aniónicos NADFA y NALFA se invierte la enantioespecificidad a favor del L-enantiómero.

Es importante mencionar que  $k_{cat}/K_m$  para PNFNCDFFA y PNFNCLFA es ca. 100 veces más grande que  $k_1$  y  $k_2$  para el APNF, bajo condiciones de una reacción de segundo orden la TC muestra una marcada especificidad a sustratos más hidrofóbicos.

### ***Empleo del reconocimiento quiral para la diferenciación espectroscópica de enantiómeros***

Una de las aplicaciones más importantes de los sistemas de reconocimiento quiral naturales y artificiales es la detección y determinación analítica selectiva de enantiómeros. En este aspecto han sido extensivamente aplicadas las técnicas tales como la cromatografía de líquidos de alta pureza [Bressolle *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1994b] y la electroforesis capilar [Fanali, 1996; Armstrong *et al.*, 1994a]; sin embargo, los receptores moleculares han tenido un uso relativamente limitado como sensores quirales [Fabrizzi y Poggi, 1995]. Se encontró en este trabajo que además de que la TC zwitteriónica presenta una discriminación termodinámica de los derivados de aminoácidos, también es capaz de generar respuestas espectrales diferentes a la presencia de diferentes huéspedes enantioméricos. Las Figuras 6.8 y 6.9 muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia del complejo TC-ANS después de su titulación con NADFA y NALFA, respectivamente. De las gráficas puede observarse que la asociación con los D- y L-enantiómeros tiene un efecto opuesto en la intensidad de fluorescencia. El efecto de NADFA corresponde al desplazamiento esperado del fluoróforo ANS del complejo debido a la competencia de NADFA por la molécula anfitrión. El efecto opuesto de NALFA puede explicarse por la formación de un complejo ternario más fuerte con ANS. Cualquiera que sea la razón, el sistema TC-ANS se comporta en este caso como un sistema sensorial que provee una diferenciación espectral cualitativa simple entre los huéspedes enantioméricos. Un efecto similar, pero

más débil fue observado para DFAME (Figura 6.10) y LFAME, para el cual no se detectó ninguna interacción.

Otro ejemplo de la diferenciación espectral quiral es provista por los desplazamientos químicos RMN de la TC en presencia de NADFA y NALFA. Por ejemplo, el fuerte singulete H1 del espectro de la TC experimenta un desplazamiento más grande después de la adición de NALFA que el que sufre por la adición de NADFA, Figuras 6.16 y 6.15, respectivamente. En este caso, se observa una diferencia de más de cinco veces en el desplazamiento inducido (valor absoluto de 0.02 ppm) por  $5 \times 10^{-3}$  M de los huéspedes.

Es importante señalar que se observa una considerable respuesta espectral a concentraciones del huésped que corresponden a un grado bajo de formación de complejos. Por lo tanto, la afinidad absoluta del receptor es de menor importancia para aplicaciones analíticas que la selectividad del enlace y la magnitud de la respuesta física.

**Tabla 6.8.** Constantes de velocidad de la ruptura de los ésteres APNF, PNFNCDFFA y PNFNCLFA por la TC y algunos iones fenolato sustituidos (todos los parámetros tienen un error relativo en el intervalo de 10-15 %).

Ester	Nucleófilo	$K$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	pK <sub>a</sub>	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
APNF	TC	0.034 ( $k_1$ )	7.16			
APNF	TC	0.054 ( $k_2$ )	8.67			
APNF	4-CHO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sup>-</sup>	0.014 <sup>b</sup>	7.66 <sup>b</sup>			
APNF	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sup>-</sup>	0.063 <sup>b</sup>	8.48 <sup>b</sup>			
PNFNCDFFA	TC			0.0053	1.32	4.015
PNFNCLFA	TC			0.015	7.1	2.113

<sup>a</sup> Constante de velocidad de segundo orden. <sup>b</sup> [Ba-Saif et al., 1987].



más débil fue observado para DFAME (Figura 6.10) y LFAME, para el cual no se detectó ninguna interacción.

Otro ejemplo de la diferenciación espectral quiral es provista por los desplazamientos químicos RMN de la TC en presencia de NADFA y NALFA. Por ejemplo, el fuerte singulete H1 del espectro de la TC experimenta un desplazamiento más grande después de la adición de NALFA que el que sufre por la adición de NADFA, Figuras 6.16 y 6.15, respectivamente. En este caso, se observa una diferencia de más de cinco veces en el desplazamiento inducido (valor absoluto de 0.02 ppm) por  $5 \times 10^{-3}$  M de los huéspedes.

Es importante señalar que se observa una considerable respuesta espectral a concentraciones del huésped que corresponden a un grado bajo de formación de complejos. Por lo tanto, la afinidad absoluta del receptor es de menor importancia para aplicaciones analíticas que la selectividad del enlace y la magnitud de la respuesta física.

**Tabla 6.8.** Constantes de velocidad de la ruptura de los ésteres APNF, PNFNCDFFA y PNFNCLFA por la TC y algunos iones fenolato sustituidos (todos los parámetros tienen un error relativo en el intervalo de 10-15 %).

Ester	Nucleófilo	$K$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$pK_a$	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
APNF	TC	0.034 ( $k_1$ )	7.16			
APNF	TC	0.054 ( $k_2$ )	8.67			
APNF	4-CHO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sup>-</sup>	0.014 <sup>b</sup>	7.66 <sup>b</sup>			
APNF	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sup>-</sup>	0.063 <sup>b</sup>	8.48 <sup>b</sup>			
PNFNCDFFA	TC			0.0053	1.32	4.015
PNFNCLFA	TC			0.015	7.1	2.113

<sup>a</sup> Constante de velocidad de segundo orden. <sup>b</sup> [Ba-Saif *et al.*, 1987].



## 7. Estudios de la rifampicina

La sección 2.2.1.5 presenta los antecedentes de las rifamicinas en general y en forma específica los antecedentes características y propiedades de la rifampicina así como su estructura química (ver Figura 2.26).

Por las características estructurales (unidades cromóforas) y propiedades de la rifampicina (RIFAM), puede ser estudiada por espectrofotometría UV-VIS, el cual constituye el método tradicional de estudio de la rifamicinas o bien por resonancia magnética nuclear protónica RMN  $^1\text{H}$ . Existen otras técnicas de estudio; sin embargo, éstas son limitadas, por ejemplo, no posee fluorescencia, es activa polarográficamente, y se realizaron algunos estudios con polarografía; sin embargo, los resultados obtenidos no fueron consistentes como para desarrollar estudios más detallados con esta técnica. Además de acuerdo a los  $\text{pK}_a$ 's reportados 1.7 y 7.9 (ver Tabla 2.4) a pH's neutros se encuentra en forma zwitteriónica lo que descarta el empleo del método conductimétrico.

En este trabajo se emplearon las técnicas de espectrofotometría UV-VIS y RMN  $^1\text{H}$  unidimensional para: *i)* caracterizar la rifamicina, *ii)* determinar sus  $\text{pK}_a$ 's en las condiciones empleadas en este trabajo, *iii)* determinar la estabilidad de la RIFAM a diferentes pH's y *iv)* determinar su capacidad de actuar como anfitrión de moléculas quirales y no quirales, aniónicas, catiónicas, zwitteriónicas y neutras, actuando como un anfitrión zwitteriónico y aniónico a los pH's de 6.0 y 8.5, respectivamente.

### 7.1 Estudios preliminares de la rifampicina

Se empleó la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) para determinar los máximos de absorción de la rifampicina a pH 6.0, dos de sus  $\text{pK}_a$ 's, su estabilidad a diferentes pH's y su interacción con diferentes sustratos a pH 6.0. A continuación se presentan los estudios realizados, las condiciones experimentales, observaciones, los resultados obtenidos y discusión.

### 7.1.1 Espectro ultravioleta-visible de la rifampicina

El espectro UV-VIS de la RIFAM fue obtenido en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.032 M a pH 6.0, en el intervalo de concentraciones  $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$  M, la Figura 7.1 muestra el espectro de la RIFAM en función de la concentración y la Tabla 7.1 los máximos y mínimos de absorción, así como los coeficientes de absorbancia molar ( $\epsilon$ ):

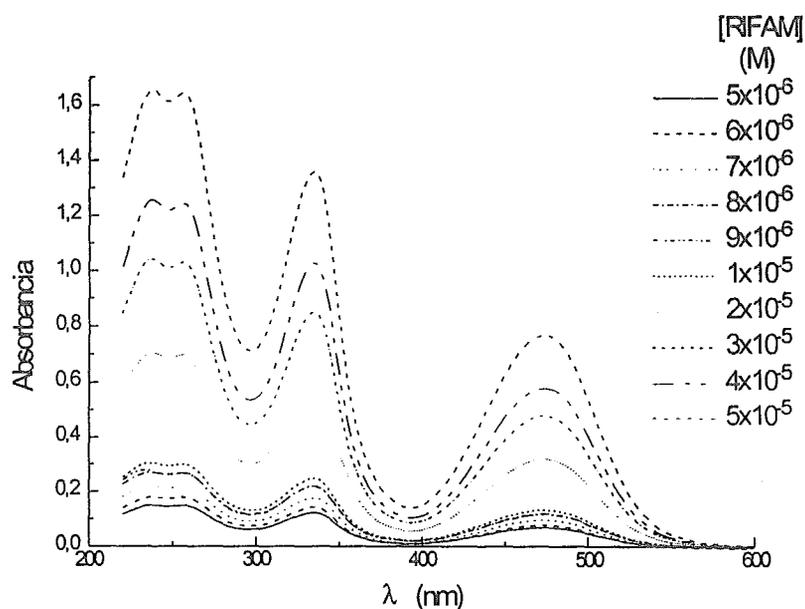


Figura 7.1. Espectros de la RIFAM en disolución amortiguadora de fosfatos 0.032 M de pH 6.00 en el intervalo de concentraciones  $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$  M.

Tabla 7.1. Máximos y mínimos de absorción de la RIFAM a pH 6.0<sup>a</sup>.

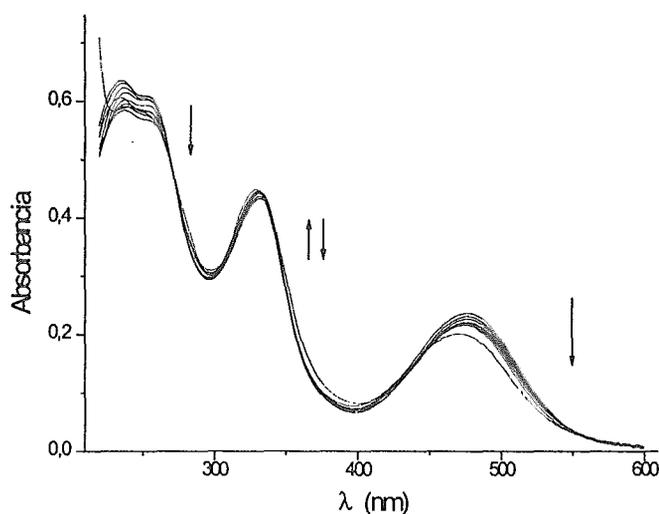
$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
236	$3.31 \times 10^4$
258	$3.29 \times 10^4$
296	$1.42 \times 10^4$
334	$2.73 \times 10^4$
392	$2.88 \times 10^3$
474	$1.55 \times 10^4$

<sup>a</sup> Todas las  $\lambda$ 's corresponden a máximos de absorción, excepto  $\lambda = 296$  y  $392$  nm, las cuales son mínimos de absorción.

Los valores de  $\epsilon$  determinados están en buen acuerdo con los reportados en la literatura a pH 7.38 [Maggi *et al.*, 1966] (ver en la sección 2.2.1.5, *características y propiedades*, espectro ultravioleta-visible).

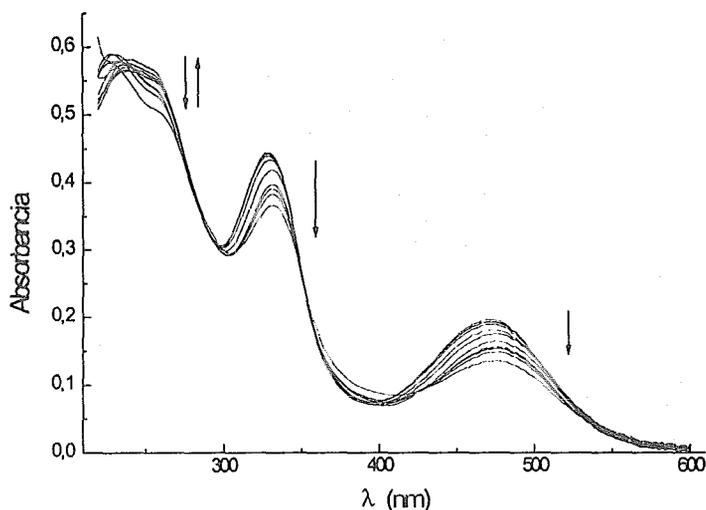
### 7.1.2 Determinación de los $pK_a$ 's de la rifampicina

Se empleó la técnica de espectrofotometría UV-VIS para determinar los  $pK_a$ 's de la RIFAM por la titulación de RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.032 M y NaCl 0.1 M, para fijar la fuerza iónica; por la adición de microlitros de NaOH 2.0 M con una pipeta automática. La titulación se realizó en el intervalo de pH 2.06–11.91, se registraron los espectros de UV-VIS cada 0.3 unidades de pH. También se llevó a cabo la retitulación de dicha disolución por adición de HCl 4.0 M en el intervalo de pH 11.02–2.03, en este caso los espectros se registraron aproximadamente a cada unidad de pH. La Figura 7.2 muestra los espectros obtenidos de la RIFAM durante la titulación con NaOH y la Figura 7.3 los espectros obtenidos durante el experimento de retitulación con HCl.



**Figura 7.2.** Espectros de la RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M en el intervalo de pH 2.06 – 11.91, obtenidos durante el experimento de titulación con NaOH 2.0 M.

Los espectros presentados en la Figura 7.2 muestran que las variaciones en absorción de la RIFAM son muy pequeñas al ir de pH's ácidos a alcalinos, sin embargo, el proceso inverso, *i.e.*, de pH's alcalinos a ácidos (Figura 7.3) ocasiona cambios mayores, predominantemente en el máximo a 474 nm, el cual se desplaza a  $\lambda$ 's mayores.



**Figura 7.3.** Espectros de la RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M obtenidos en el intervalo de pH 11.02 – 2.03 durante el experimento de retitulación con HCl 4.0 M.

El Apéndice D (Tablas D.37 y D.38) presentan las absorbancias registradas a cada pH durante el proceso de titulación y retitulación de la RIFAM, para las  $\lambda$ 's 232, 236 y 256 nm,  $\lambda$ 's para las cuales se encontraron los cambios de absorbancia más grandes. Las Figuras 7.4 y 7.5 muestran como ejemplo, la variación de absorbancia de la RIFAM con el pH a 232 y 236 nm, respectivamente. Cada una de estas Figuras presenta tanto el experimento de titulación como el de retitulación, así como el ajuste correspondiente para el cálculo de los  $pK_a$ 's de la RIFAM del experimento de titulación.

Las gráficas de las Figuras 7.4 y 7.5, muestran en general la misma forma; sin embargo, la curva de retitulación pasa muy por abajo de la de titulación, la diferencia en absorciones no corresponde al factor de dilución. Este cambio en intensidades de absorción en ambos experimentos puede deberse a que a pH's alcalinos la RIFAM se

descompone o transforma químicamente y se obtiene una especie que absorbe mucho menos.

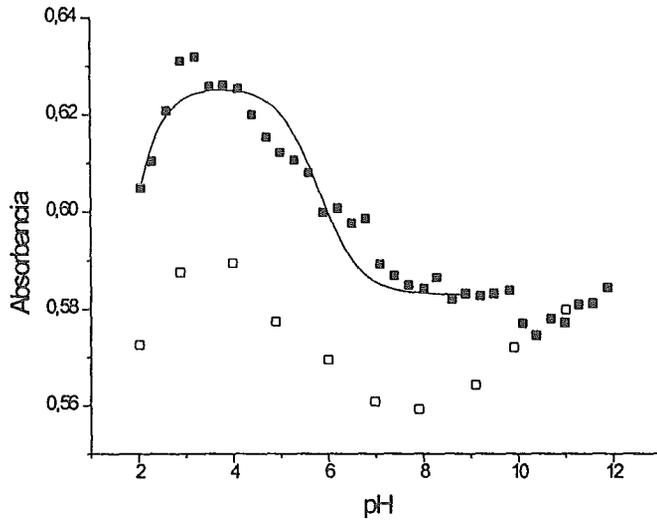


Figura 7.4. Gráficas del cambio de absorbancia de la RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M a  $\lambda = 232$  nm con el pH. Datos de titulación (sólido), mostrando el ajuste de los mismos hasta pH ~ 9 y retitulación (abierto).

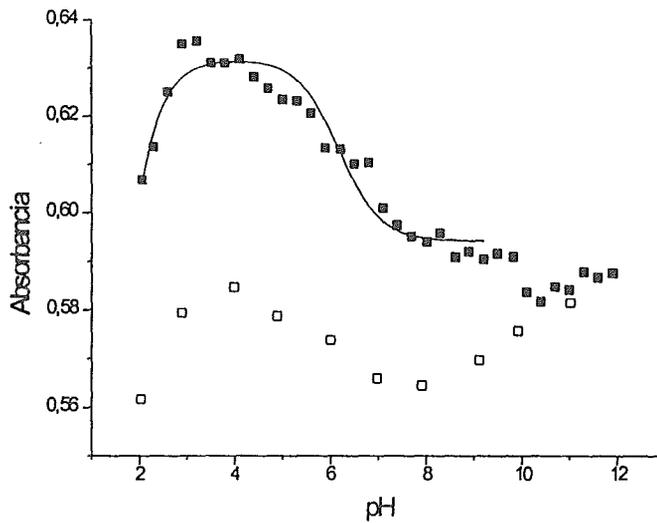


Figura 7.5. Gráficas del cambio de absorbancia de la RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M a  $\lambda = 236$  nm con el pH. Datos de titulación (sólido), mostrando el ajuste de los mismos hasta pH ~ 9 y retitulación (abierto).

Para el ajuste de los datos experimentales se consideraron dos equilibrios (7.A y 7.B) que involucran dos ionizaciones sucesivas de la RIFAM con constantes de acidez  $K_{a1}$  (ecuación 7.1) y  $K_{a2}$  (ecuación 7.2), respectivamente.



Donde  $RH_2^+$  = rifampicina previa a la ionización,  $RH$  = rifampicina después de la primera ionización y  $R^-$  = rifampicina después de la segunda ionización.

$$K_{a1} = \frac{[RH][H^+]}{[RH_2^+]} \quad (7.1)$$

$$K_{a2} = \frac{[R^-][H^+]}{[RH]} \quad (7.2)$$

Se considera que la absorbancia total observada ( $A_T$ ) es igual a la suma de absorbancias de cada una de las especies presentes. Para el análisis de los datos experimentales se expresa  $A_T$  en función de  $[RH_2^+]$  y  $[H^+]$ , las únicas concentraciones conocidas, empleando las ecuaciones de balance de masa correspondientes. El Apéndice A.6 presenta en forma detallada la deducción de la ecuación (7.3), y su empleo para el cálculo de dos  $pK_a$ 's de la RIFAM.

$$A_T = \frac{\varepsilon_{RH_2^+} \cdot [RH_2^+]_T \cdot \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \varepsilon_{RH} \cdot [RH_2^+]_T \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \varepsilon_{R^-} \cdot [RH_2^+]_T}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1} \quad (7.3)$$

En la ecuación (7.3),  $[RH_2^+]_T$  = concentración total de la rifampicina,  $[H^+]$  = concentración de iones hidrógeno,  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar de cada una de las especies presentes en el equilibrio.

La Tabla 7.2 presenta los  $pK_a$ 's de la RIFAM calculados en este estudio.

**Tabla 7.2.**  $pK_a$ 's de la RIFAM, obtenidos por espectrofotometría UV-VIS.

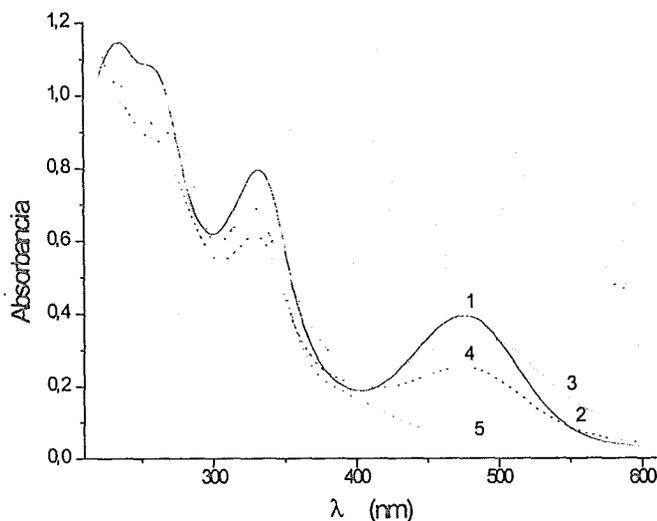
$\lambda$ (nm)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
232	$0.596 \pm 0.210$	$5.815 \pm 0.243$
236	$0.692 \pm 0.131$	$6.178 \pm 0.214$
256	$0.711 \pm 0.088$	$7.200 \pm 0.184$
<b>promedio</b>	<b><math>0.666 \pm 0.143</math></b>	<b><math>6.398 \pm 0.214</math></b>

Al comparar con los valores de  $pK_a$ 's reportados (ver Tabla 2.4) observamos que ambos  $pK_a$ 's son menores por ca. 1. Los datos obtenidos a diferentes longitudes de onda son poco consistentes para el  $pK_{a2}$ , lo que refleja probablemente una contribución del proceso de oxidación, y trae en consecuencia la baja precisión de este método espectroscópico para la determinación de los  $pK_a$ 's de la rifampicina, ver más detalles en la siguiente sección.

### 7.1.3 Estabilidad de la rifampicina a diferentes pH's

Para determinar la estabilidad de la RIFAM a los pH's de 2, 7 y 12, se prepararon tres disoluciones de la RIFAM  $4.0 \times 10^{-5}$  M en una disolución amortiguadora universal 0.032 M y NaCl 0.1 M, las cuales fueron ajustadas a los pH's indicados y se obtuvieron los espectros UV-VIS de cada una de las disoluciones cada hora, durante cinco horas. Al siguiente día se obtuvieron nuevamente los espectros correspondientes y después cada una de las disoluciones se dividió en tres partes y se ajustaron los pH's de dos de ellas a los otros dos pH's de estudio y de cada disolución se obtuvieron nuevamente los espectros correspondientes. A continuación se describen los resultados obtenidos a los diferentes pH's.

Espectros de la RIFAM a pH 2.0. La Figura 7.6 muestra los espectros de la RIFAM obtenidos a pH 2.0 a través de diversos procedimientos.



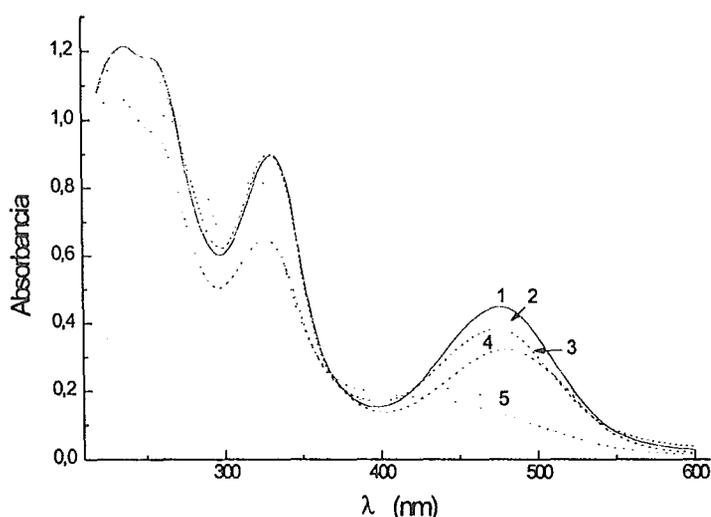
**Figura 7.6.** Espectros de la RIFAM  $4.0 \times 10^{-5}$  M a pH 2.0, obtenidos por diferentes procedimientos: 1 disolución original, 2 disolución original 5 h después, 3 disolución original al siguiente día, 4 disolución de pH 7.0 ajustada a pH 2.0, 5 disolución de pH 12.0 ajustada a pH 2.0; ver más detalles en el texto.

En la disolución original conforme pasa el tiempo se observa un efecto hipocrómico; sin embargo, 24 h después el máximo a 474 nm sufre también un efecto batocrómico. Comparando las disoluciones retituladas de pH 7.0 y 12.0 se observa que en la obtenida de pH 7.0 sus máximos a 332 y 474 nm disminuyen apreciablemente su absorción, mientras que en aquella obtenida a partir de pH 12, la forma del espectro cambia en el intervalo 220-294 nm y el máximo a 332 se desplaza a 328 nm.

Espectros de la RIFAM a pH 7.0. La Figura 7.7 muestra los espectros de la RIFAM obtenidos a pH 7.0 a través de diversos procedimientos.

En la disolución original a pH 7.0 después de 5 h el espectro de la RIFAM sufre un efecto hipocrómico pequeño; después de 24 h, el espectro de la RIFAM muestra una disminución muy pequeña en absorción a 234 y 474 nm. En la disolución de pH 2.0 llevada a pH 7.0 (al siguiente día), se observa un efecto hipocrómico más grande, además el máximo a 332 se desplaza a 326 nm y el máximo a 474 se desplaza a 480

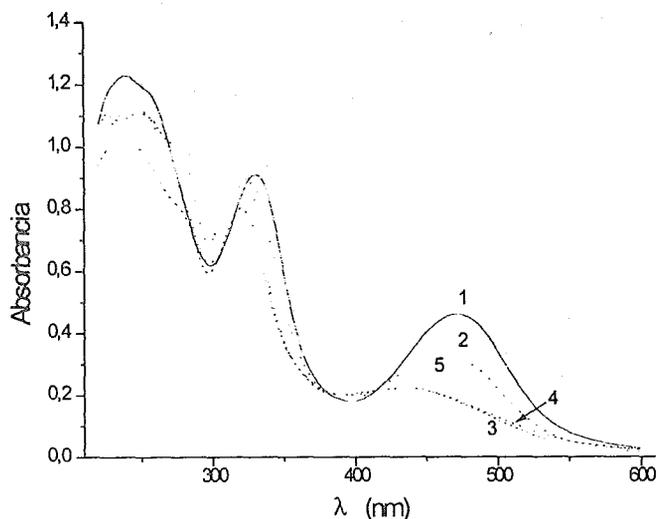
nm. En la disolución de pH 12.0 llevada a pH 7.0 se observa que el máximo a 474 nm ha desaparecido, el máximo en 332 se ha desplazado a 320 nm con una absorción más alta que las disoluciones retituladas de pH 2.0, mientras que a  $\lambda$ 's bajas el espectro se ha deformado.



**Figura 7.7.** Espectros de la RIFAM  $4.0 \times 10^{-5}$  M a pH 7.0, obtenidos por diferentes procedimientos: 1 disolución original, 2 disolución original 5 h después, 3 disolución original al siguiente día, 4 disolución de pH 2.0 ajustada a pH 7.0, 5 disolución de pH 12.0 ajustada a pH 7.0; ver más detalles en el texto.

Espectros de la RIFAM a pH 12.0. La Figura 7.8 muestra los espectros de la RIFAM obtenidos a pH 12.0 a través de diversos procedimientos.

En la disolución original después de 5 h el máximo a 474 se desplace a 462 nm, la absorción disminuye apreciablemente, el máximo a 332 se desplace a 324 nm y la absorción aumenta en ese máximo. En la disolución original después de 24 h el máximo a 474 se desplace a 432 nm con un efecto hipocrómico muy grande, el máximo a 332 se desplace a 318 nm, aumentando su absorción, a  $\lambda$ 's más bajas el espectro de la RIFAM se deforma. En la disolución retitulada de pH 2.0 el espectro es muy parecido al espectro obtenido de RIFAM con la disolución original después de 24 h, en tanto que la disolución de pH 7.0 llevada a pH 2.0 presenta un espectro similar al obtenido en la disolución original a pH 12 después de 5 h.



**Figura 7.8.** Espectros de la RIFAM  $4.0 \times 10^{-5}$  M a pH 12.0, obtenidos por diferentes procedimientos: 1 disolución original, 2 disolución original 5 h después, 3 disolución original al siguiente día, 4 disolución de pH 2.0 ajustada a pH 12.0, 5 disolución de pH 7.0 ajustada a pH 12.0; ver más detalles en el texto.

### **Conclusiones**

1. La RIFAM tiene baja estabilidad, lo que modifica las curvas de titulación y genera valores de  $pK_a$ 's muy aproximados.
2. La RIFAM es más estable a pH 7.
3. Se descompone el cromóforo de la RIFAM que indica oxidación.
4. Los estudios de complejación de la RIFAM deben realizarse con disoluciones frescas y a través de un procedimiento rápido.
5. La baja estabilidad de la RIFAM a las condiciones de estudio traerá como consecuencia una baja precisión y reproducibilidad de los estudios de las interacciones de la RIFAM con diversos huéspedes.

## 7.2 Estudio de la interacción de RIFAM con diversos huéspedes por espectrofotometría ultravioleta-visible

La RIFAM es una molécula con nueve centros quirales, además posee un sistema naftoquinónico, cuatro grupos hidroxílicos ionizables, un grupo carboximetilo y un enlace amida. Se sabe que estos tipos de grupos funcionales son útiles para desarrollar múltiples interacciones, las cuales son necesarias para el reconocimiento molecular (ver **Introducción**).

A pH 6.0 la RIFAM se encuentra en forma zwitteriónica, por lo que puede ser susceptible de interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Para determinar si a este pH la RIFAM es capaz de reconocimiento quiral o estructural se determinó su constante de enlace con diversos pares de aminoácidos quirales aniónicos, los cuales difieren en su estructura al estar protegidos en el nitrógeno, *i.e.*, N-acetilados o bien zwitteriónicos, incluyendo o no un grupo fenilo, o bien un hidroxilo en la posición *para* o bien dos grupos hidroxílicos en las posiciones *meta* y *para*. A este pH también se estudió la interacción de la RIFAM con algunas bases púricas. Los estudios a este pH se realizaron por espectrofotometría UV-VIS

La Figura 7.9 muestra la estructura de los sustratos probados como huéspedes para la RIFAM, con la clave que será utilizada en el texto.

### 7.2.1 Estudio de la interacción RIFAM-aminoácido a pH 6.0

A continuación se describe la metodología experimental y de cálculo de constantes de enlace por esta técnica, así como las gráficas que muestran el ajuste de los datos experimentales para obtener dichas constantes de enlace.

### 7.2.1.1 Metodología experimental

Para el estudio de la interacción RIFAM-ligante a pH 6.0 se preparó una disolución de RIFAM  $5 \times 10^{-4}$  M en agua, una disolución amortiguadora de fosfatos  $6.67 \times 10^{-2}$  M y una disolución del ligante  $1 \times 10^{-2}$  M en agua.

La técnica consiste en dos experimentos, en los cuales el blanco de todas las mediciones es la disolución amortiguadora de fosfatos de concentración  $3.2 \times 10^{-2}$  M.

En el primer experimento se miden 2.5 ml de la disolución amortiguadora en la celda, se registra su espectro y se agrega, con una pipeta automática 50  $\mu$ l (0.05 ml) de la disolución concentrada del ligante hasta completar 3 ml en la celda, *i.e.*, hay que hacer 10 adiciones, después de cada adición se agita la disolución con un agitador magnético y se suspende agitación antes de registrar el espectro UV-VIS.

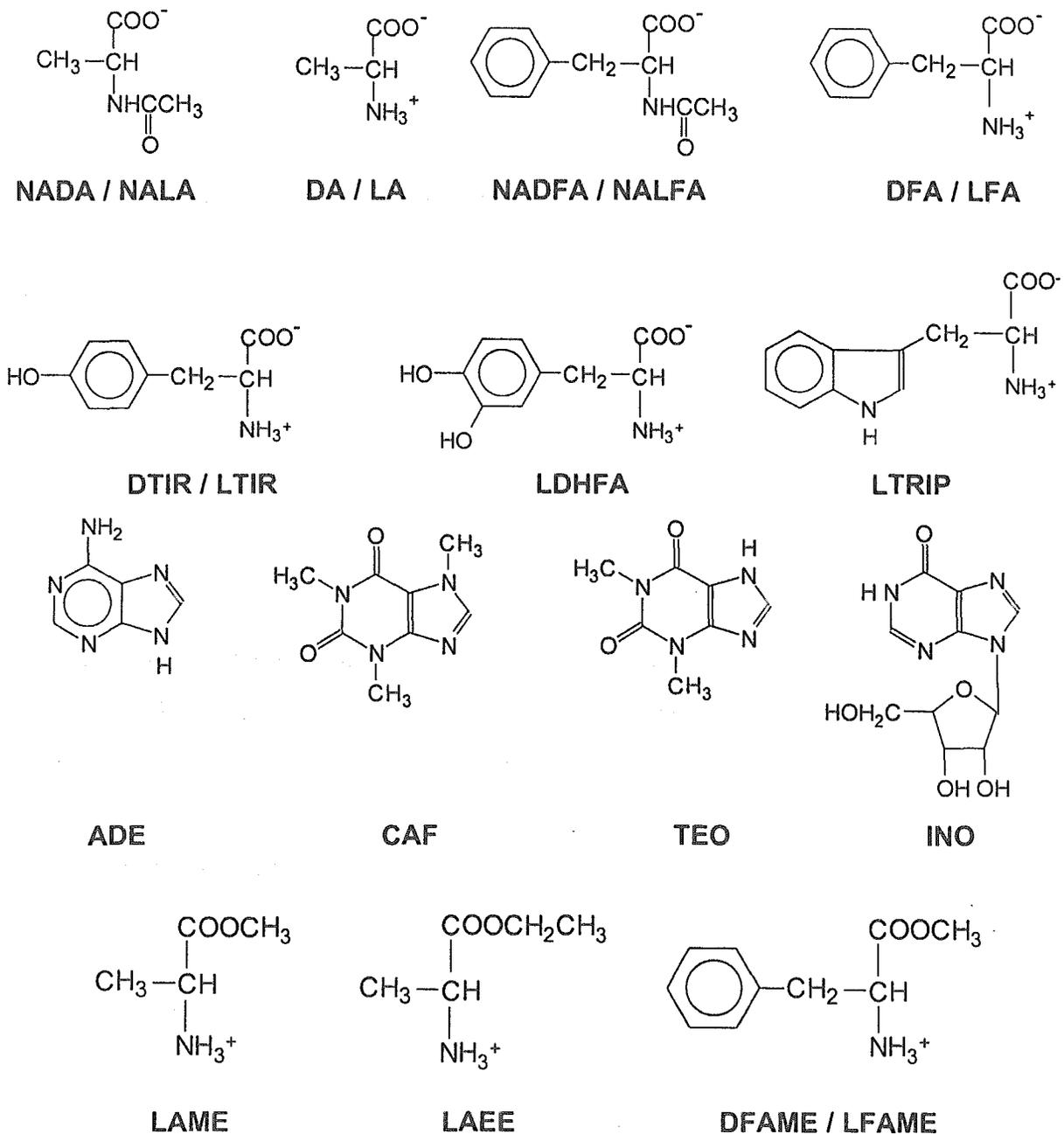
En el segundo experimento se preparan 5 ml de una disolución de RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M en la disolución amortiguadora de fosfatos 0.032 M ( $H_2O$ :2.4 ml, disolución amortiguadora: 2.4 ml, rifampicina  $5 \times 10^{-4}$  M: 0.2 ml) se miden 2.5 ml de dicha disolución en la celda, se registra el espectro de la RIFAM y después se agrega el ligante y se registran los espectros correspondientes siguiendo el mismo procedimiento que en el experimento descrito en el párrafo anterior.

### 7.2.1.2 Cálculo de la constante de asociación

Para el cálculo de la constante de asociación RIFAM-aminoácido se considera la formación de un complejo rifampicina-ligante con una estequiometría 1:1, de acuerdo al equilibrio (7.C):



donde: R = rifampicina, L = ligante, RL = complejo rifampicina-ligante. La constante de equilibrio para el equilibrio (7.C) es:



**NADA / NALA** N-acetil D/L-alanina

**DA / LA** D/L-alanina

**NADFA / NALFA** N-acetil-D/L- fenilalanina

**DFA / LFA** D/L-fenilalanina

**DTIR / LTIR** D/L-tirosina

**LDHFA** L-3,4-dihidroxifenilalanina

**LTRIP** L-triptofano

**ADE** Adenina

**CAF** Cafeína

**TEO** Teofilina

**INO** Inosina

**LAME** L-alanina metil éster

**LAEE** L-alanina etil éster

**DFAME / LFAME** D/L-fenilalanina metil éster

**Figura 7.9.** Sustratos estudiados como huéspedes de la rifampicina.

$$K = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (7.4)$$

Se considera que la absorbancia observada es igual a la suma de las absorbancias de cada una de las especies presentes. Para el análisis de los datos experimentales se expresa la absorbancia observada en función de  $[RL]$  y  $[L]$ , tomando en cuenta que la concentración del ligante está en exceso. Si se analiza el cambio de absorbancia  $\Delta A = A_{obs} - A_{ligante}$  se obtiene la ecuación (7.5), la cual fue empleada para el cálculo de las constantes de asociación RIFAM-ligante.

$$\Delta A = \frac{\epsilon_R + (\epsilon_R + \epsilon_{RL} \cdot K \cdot L_0) \cdot 0.02 \cdot X}{1 + 0.02 \cdot (1 + K \cdot L_0) \cdot X} \cdot \frac{(R)_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (7.5)$$

Donde  $\Delta A$  es la absorbancia observada menos la absorbancia del ligante,  $\epsilon_R$  y  $\epsilon_{RL}$  son los coeficientes de absorbancia de la RIFAM y del complejo RIFAM-ligante, respectivamente,  $(R)_{0,s}$  concentración inicial de la RIFAM,  $L_0$  concentración inicial del ligante,  $X$  número de adiciones de 50  $\mu$ l del ligante.

El Apéndice A.7 presenta la deducción de la ecuación (7.5), así como todas las ecuaciones citadas a lo largo del siguiente procedimiento de cálculo de la constante de enlace.

Enseguida se muestra como ejemplo el análisis de la interacción RIFAM-LFA a  $\lambda = 334$  nm.

Una vez obtenidos los espectros tanto del ligante como de la mezcla RIFAM-ligante (ver Figuras 7.10 y 7.11) se eligen las  $\lambda$ 's a ser estudiadas, se analizan aproximadamente ocho  $\lambda$ 's, las cuales generalmente corresponden a las  $\lambda$ 's de los máximos y mínimos de absorción de la RIFAM. Se extraen los valores de las absorbancias tanto de la mezcla como del ligante, a cada concentración y a cada  $\lambda$  a ser analizada (ver Tabla 7.3, columnas 2, 3 y 4).

Después, para cada  $\lambda$  de análisis:

a) Se grafica la [ligante] vs absorbancia del ligante a la  $\lambda$  de estudio, se obtiene una línea recta cuya pendiente es el coeficiente de absorbancia molar  $\varepsilon$  del ligante  $\varepsilon_L$  (ver ecuación 4.2, Tabla 7.3 y Figura 7.12). En este caso  $\varepsilon_L = 2.63 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

b) Se obtiene el valor de  $\varepsilon$  de la RIFAM  $\varepsilon_R$ , para lo cual se divide el valor de la absorbancia de la RIFAM en la disolución amortiguadora antes de comenzar las adiciones del ligante entre la concentración de la RIFAM ( $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) (ver ecuación 4.2 y Tabla 7.3, primer dato columna 4). En este caso,  $\varepsilon_R = 0.5023 / 2.0 \times 10^{-5} \text{ M} = 25115 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

c) Se grafica el número de adiciones de 0.05 ml del ligante, *i.e.*, 0, 1, 2, 3, ...10, vs.  $A_{\text{obs}}$  de la mezcla, los datos directos o bien, la absorbancia corregida de la mezcla. La  $A_{\text{obs}}$  se corrige con la ecuación (A.7.25) del Apéndice A.7 y sólo en el caso en el que el valor de  $\varepsilon_L$  para esa  $\lambda$ , sea grande, *i.e.*, cuando la absorbancia de  $L$  presente una contribución importante a esa  $\lambda$  (ver Figura 7.13). En este caso, debido a que prácticamente a 334 nm la absorción de LFA es mínima, ver Figura 7.10 ( $\varepsilon_L = 2.63 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), las  $A_{\text{obs}}$ 's no se corrigen y se emplean en el análisis los datos directos, columna 4 de la Tabla 7.3)

d) Se calcula la absorbancia esperada, sólo por dilución, *i.e.*, en ausencia del ligante por medio de la ecuación (A.7.28) del Apéndice A.7, (columna 5 de la Tabla 7.3). Se comparan las curvas experimental (datos directos o bien la obtenida por la ecuación A.7.25) con la esperada (obtenida por la ecuación A.7.28), para determinar cualitativamente el efecto de la presencia del ligante (ver Figura 7.14). En este caso se observa que hay una diferencia apreciable entre ambas curvas, lo que sugiere un efecto de la LFA, es decir, interacción entre RIFAM y LFA.

e) Los datos experimentales (columna 4 de la Tabla 7.3) se ajustan con la ecuación (7.5), la cual da directamente el valor de la constante de interacción (ver ecuaciones A.7.20, A.7.21 y A.7.22 y gráfica con el ajuste en la Figura 7.13). En este caso, el ajuste de los datos experimentales proporciona:  $\varepsilon_{RL} = 2.6 \times 10^4$  y  $K = 550 \pm 230 \text{ M}^{-1}$ .

f) Otra forma de calcular la constante de enlace consiste en dividir los datos experimentales entre las absorbancias esperadas por dilución, es decir cada dato de la columna 4 entre el dato correspondiente en la columna 5 de la Tabla 7.3, los datos así tratados (datos columna 6 de la Tabla 7.3) se ajustan con la ecuación (7.6), donde la constante se obtiene por medio de la ecuación (A.7.31), ver ecuaciones (A.7.33, A.7.34 y A.7.35 en el Apéndice A.7, y gráfica con el ajuste en la Figura 7.15). En este caso el ajuste de los datos experimentales proporciona:  $\varepsilon_{RL} / \varepsilon_R = 1.049$  y  $K = 520 \pm 230 \text{ M}^{-1}$ .

$$\Delta A = \frac{1 + \left( 0.02 + \frac{\varepsilon_{RL}}{\varepsilon_R} \cdot K \cdot [L]_0 \cdot 0.02 \right) \cdot X}{1 + (0.02 + 0.02 \cdot K \cdot [L]_0) \cdot X} \quad (7.6)$$

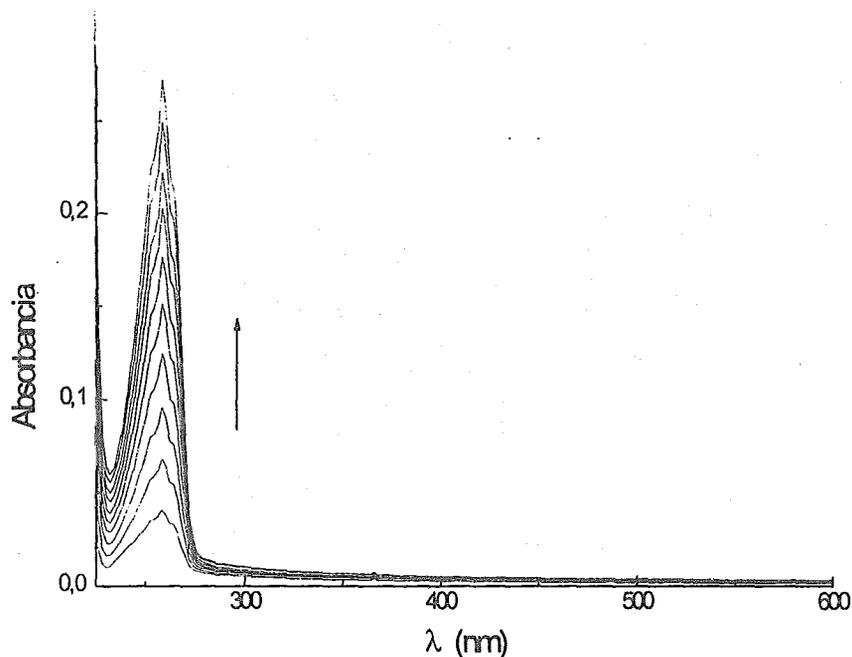


Figura 7.10. Espectros de absorbancia de LFA obtenidos por adiciones sucesivas de 0.05 ml de LFA 0.01 M a 2.5 ml de disolución amortiguadora de pH 6.0.

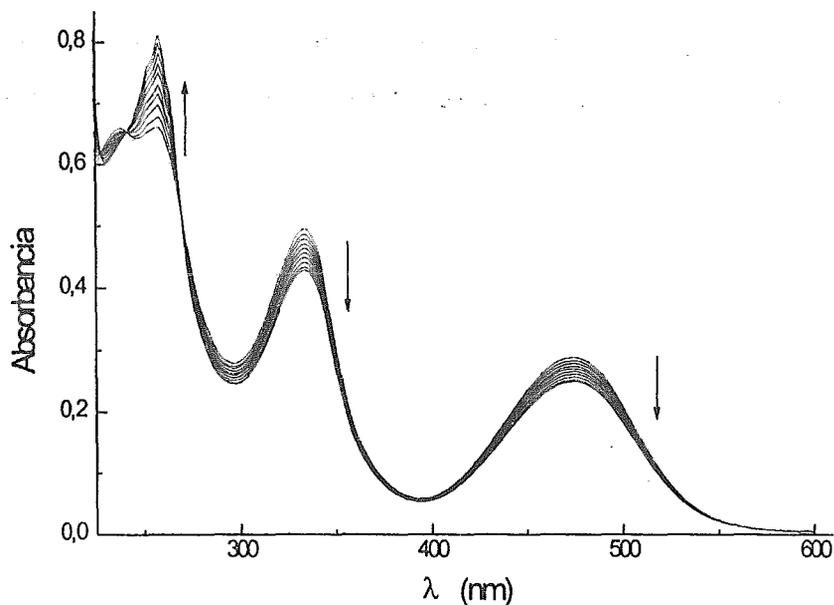


Figura 7.11. Espectros de absorbancia de RIFAM y de cada una de las mezclas RIFAM-LFA, obtenidas por adiciones sucesivas 0.05 ml de LFA 0.01 M a 2.5 ml de una disolución de RIFAM  $2.0 \times 10^{-5}$  M en disolución amortiguadora a pH 6.0.

Tabla 7.3. Datos empleados para el análisis de la interacción RIFAM-LFA a  $\lambda = 334$  nm

X (núm. de adiciones de 50 $\mu$ l)	[LFA] <sub>f</sub> (M)	A <sub>LFA</sub>	A <sub>obs</sub> RIFAM-LFA	$\Delta A$ calc. por dil.	A <sub>obs</sub> / $\Delta A$ calc. por dil.
0	0.0	0.0	0.5023	0.50230	1.0000
1	$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0034	0.4959	0.49245	1.0070
2	$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0040	0.4868	0.48298	1.00791
3	$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0051	0.4791	0.47387	1.01104
4	$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0050	0.4710	0.46509	1.01270
5	$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0051	0.4641	0.45664	1.01634
6	$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0055	0.4569	0.44848	1.01877
7	$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0060	0.4493	0.44061	1.01971
8	$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0070	0.4413	0.43302	1.01913
9	$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0074	0.4341	0.42568	1.01978
10	$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0072	0.4294	0.41858	1.02584

El Apéndice D presenta las Tablas de los datos de absorbancias de las mezclas RIFAM-ligante y ligante a las  $\lambda$ 's a las cuales fue posible determinar la constante de enlace para todos los sustratos estudiados. Las Figuras 7.16 y 7.17 muestran el ajuste

de los datos experimentales empleando las ecuaciones (A.7.19) y (A.7.32) para las longitudes de onda a las cuales fue posible calcular las constantes de enlace para todos los sustratos estudiados. Las constantes de enlace promedio calculadas a diferentes  $\lambda$ 's para todos los sustratos estudiados se presentan en la Tabla 7.4.

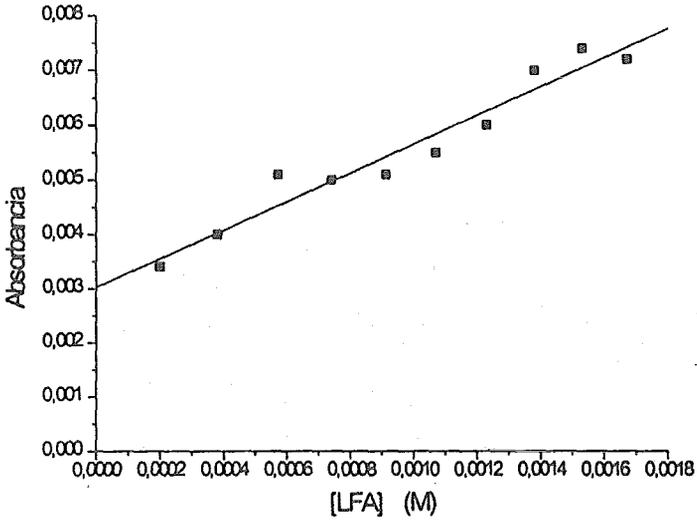


Figura 7.12. Ajuste lineal de absorbancia de LFA vs [LFA] a  $\lambda = 334$  nm.

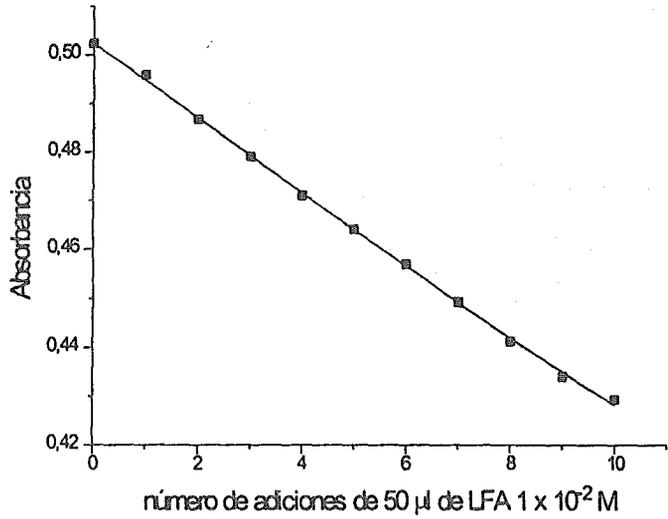


Figura 7.13. Ajuste de los datos experimentales de RIFAM-LFA a  $\lambda = 334$  nm con la ecuación (A.7.19), ver detalles en el texto.

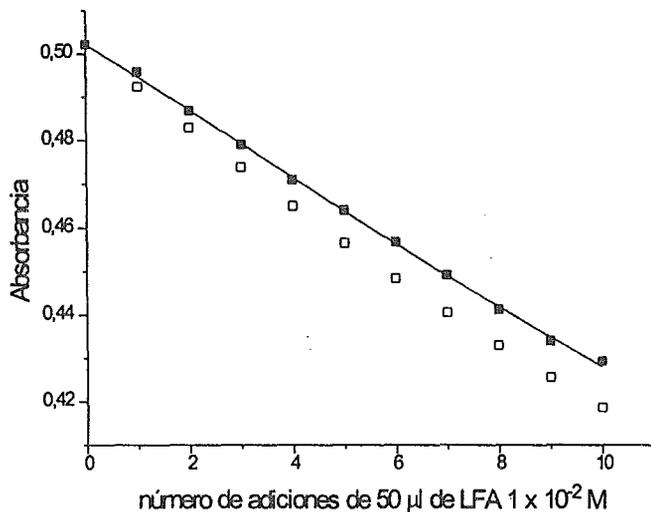


Figura 7.14. Comparación de las absorbancias experimentales para RIFAM-LFA y absorbancias esperadas sin interacción con LFA, debidas sólo a efecto de dilución a  $\lambda = 334$  nm.

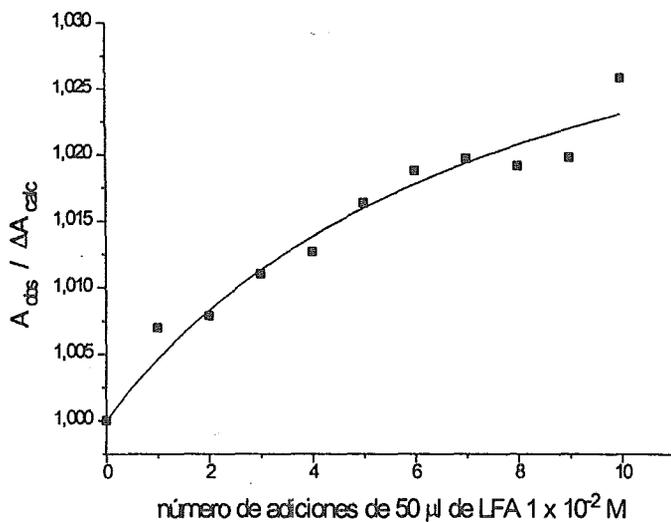


Figura 7.15. Ajuste de los datos experimentales de RIFAM-LFA a  $\lambda = 334$  nm, con la ecuación (A.7.32), ver detalles en el texto.

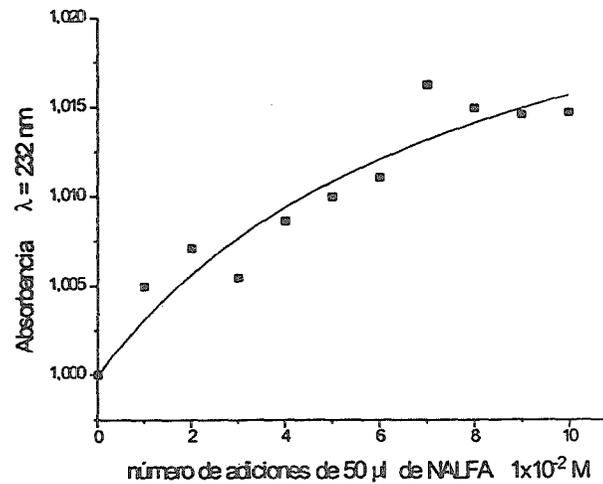
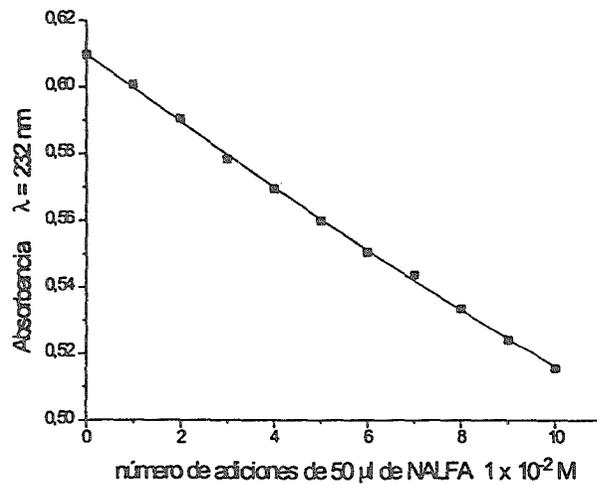
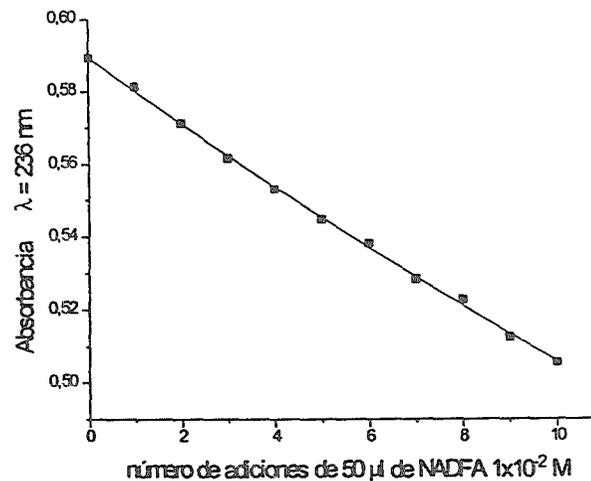
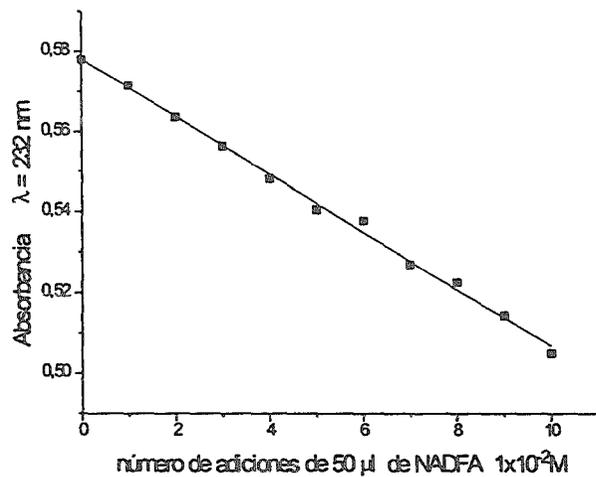


Figura 7.16. Absorbancias observadas y relación de absorbancias a diversas longitudes de onda como función del número de adiciones de la solución concentrada del aminoácido (pH 6). Las curvas son perfiles teóricos calculados con las ecuaciones (A.7.19) y (A.7.32), respectivamente.

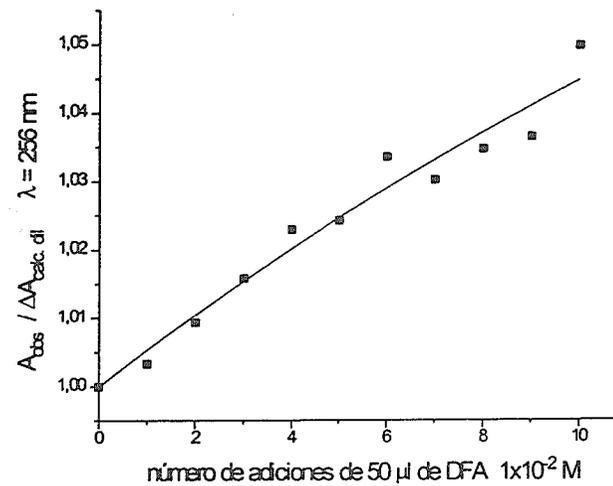
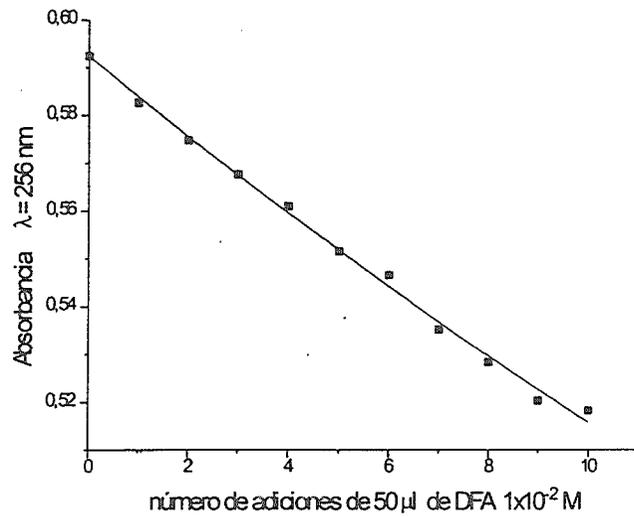
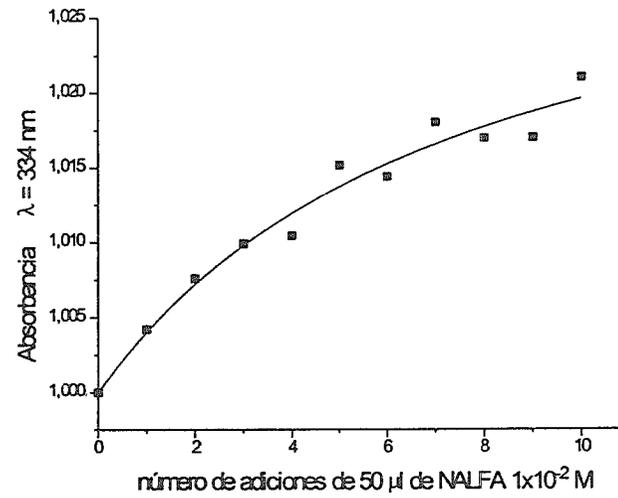
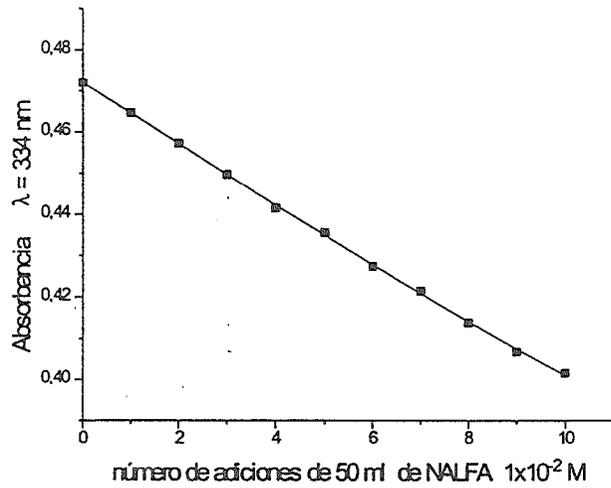


Figura 7.16. (Continuación).

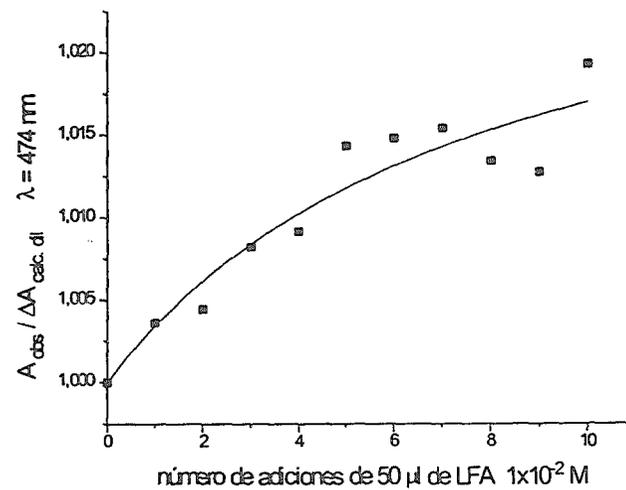
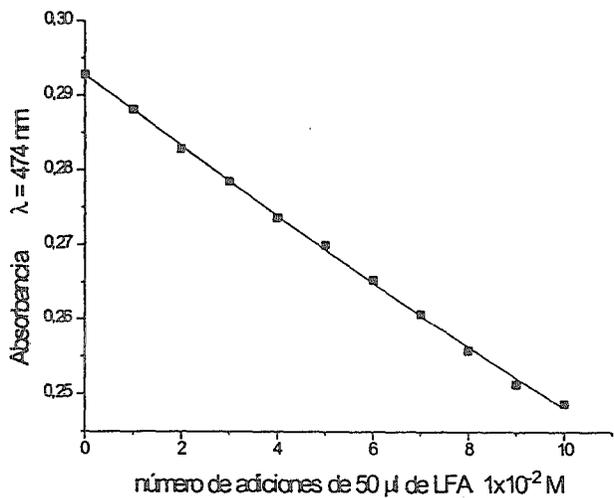
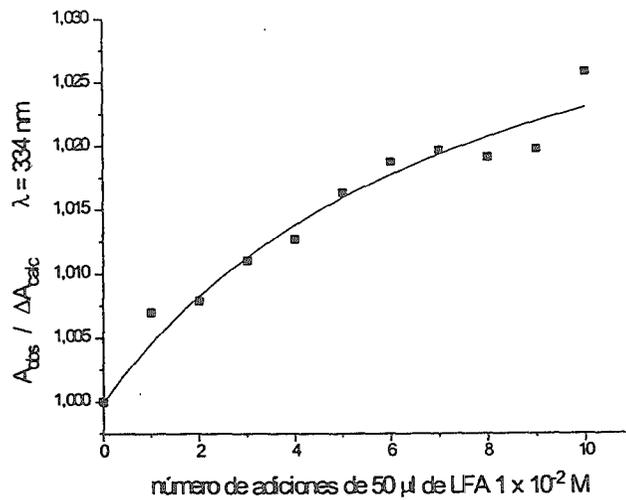
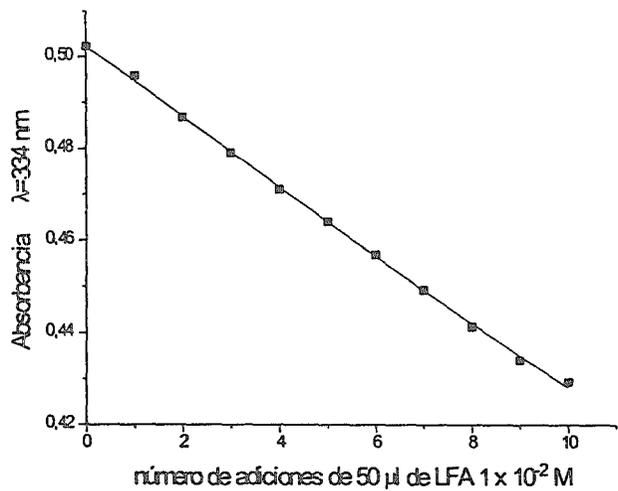


Figura 7.16. (Continuación).

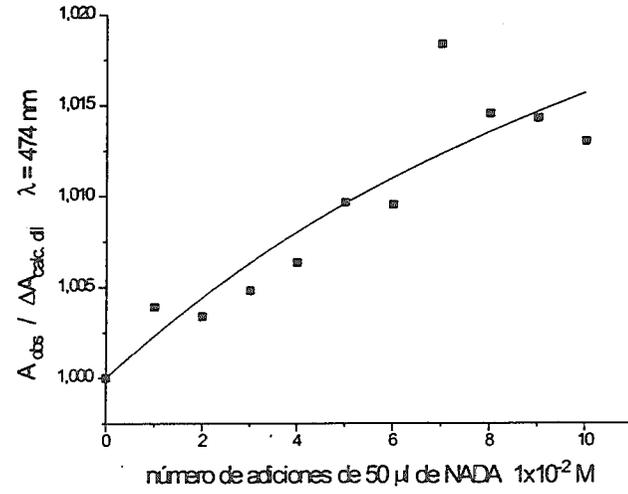
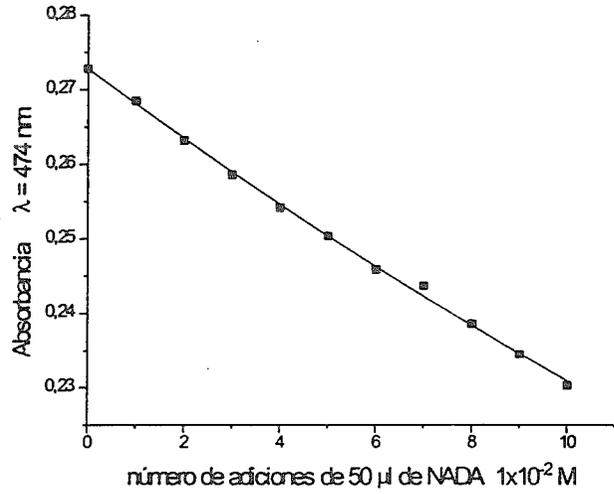
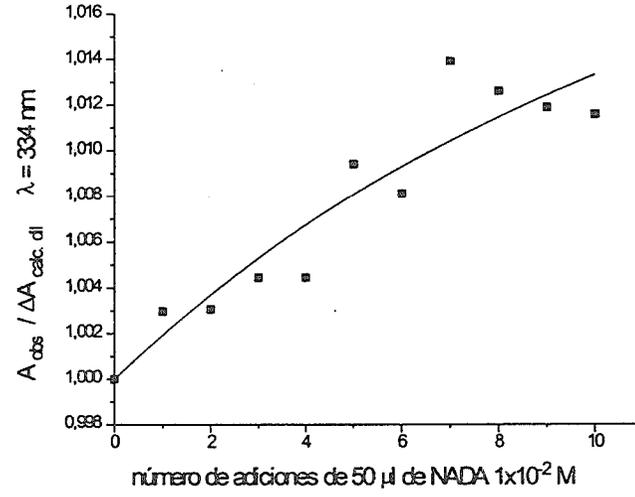
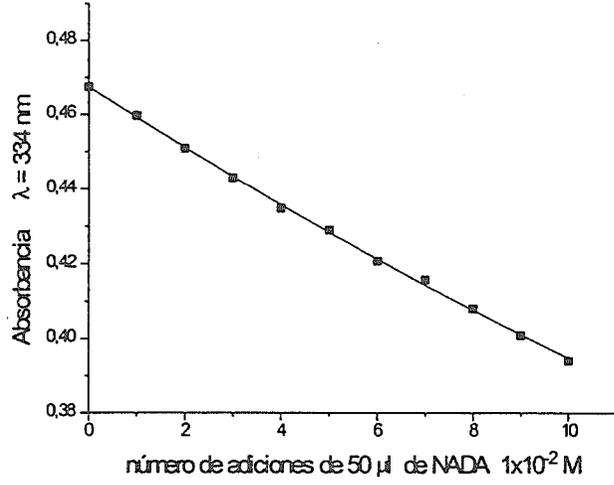


Figura 7.16. (Continuación).

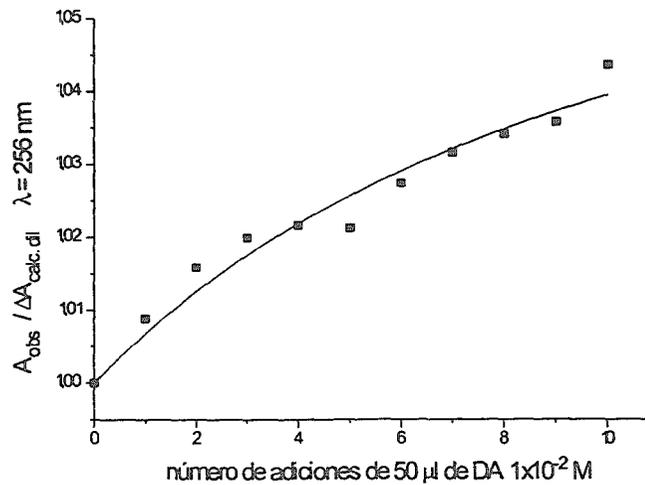
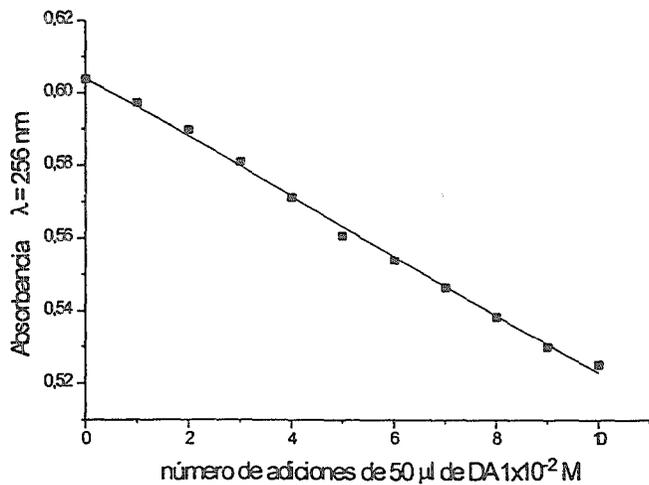
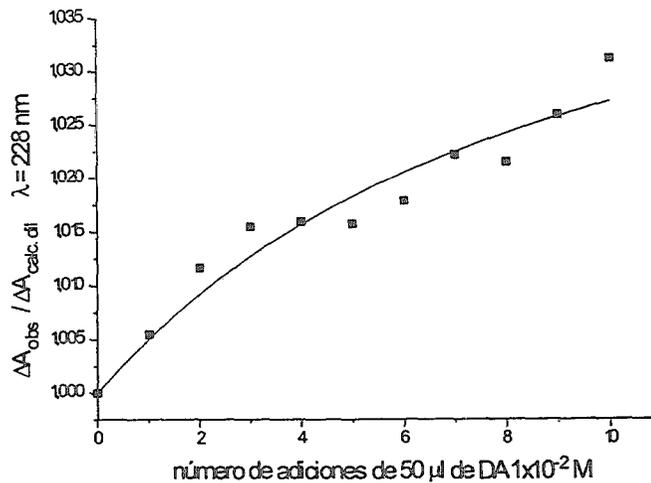
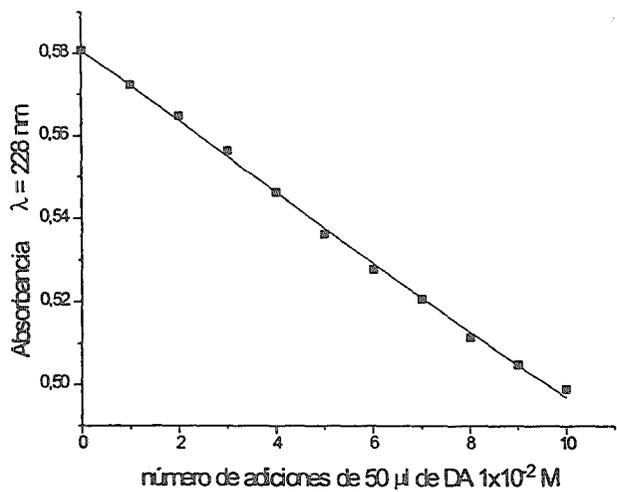


Figura 7.16. (Continuación).

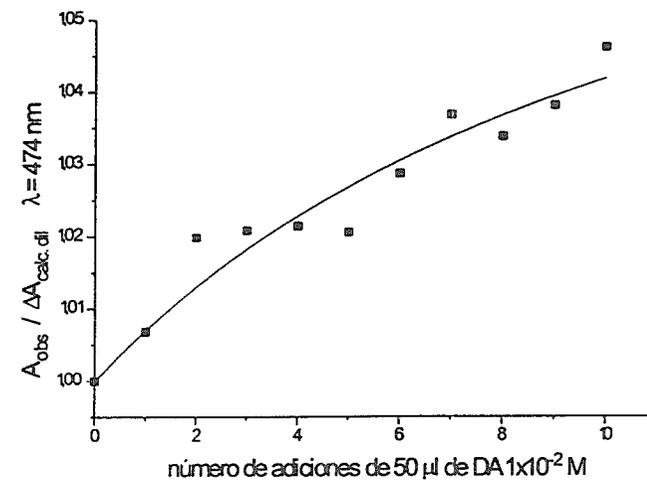
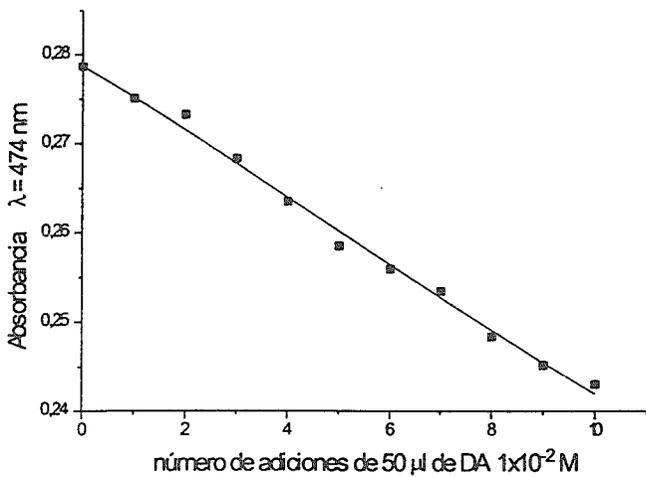
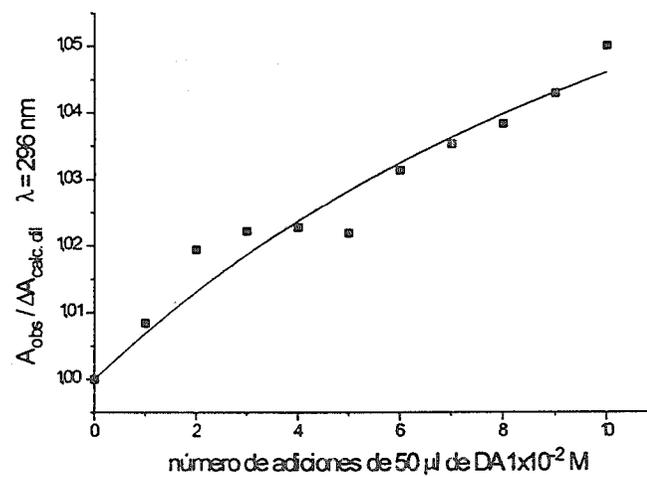
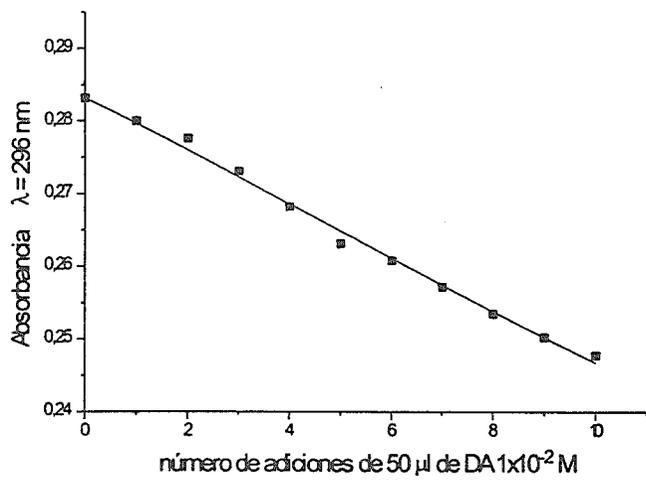


Figura 7.16. (Continuación).

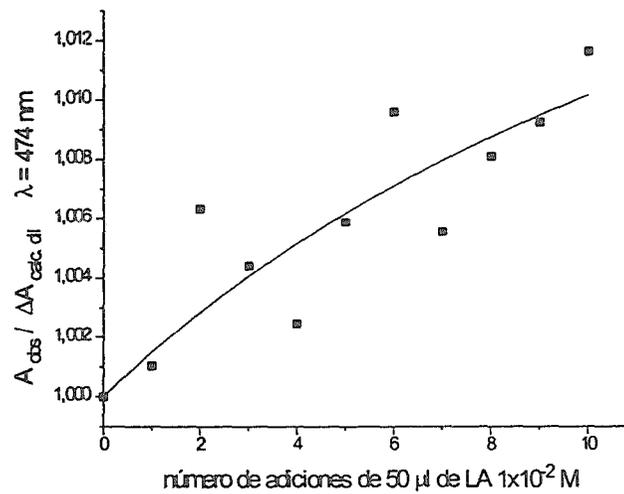
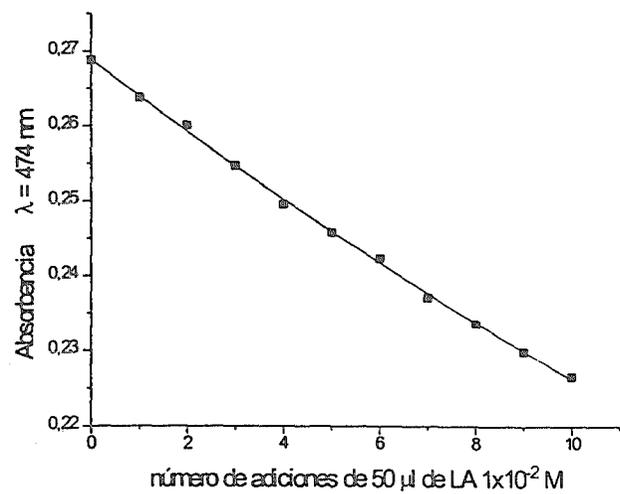
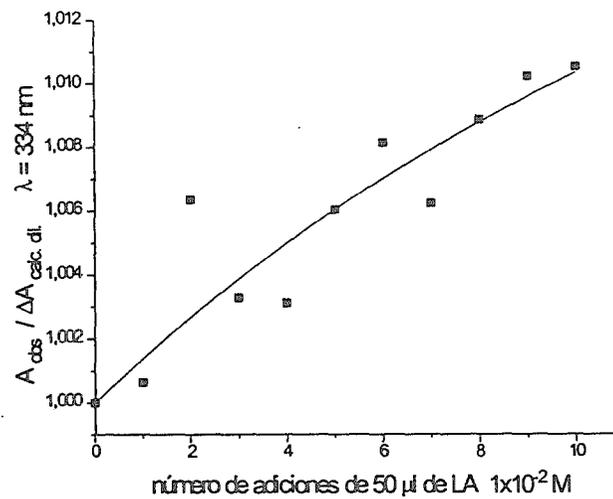
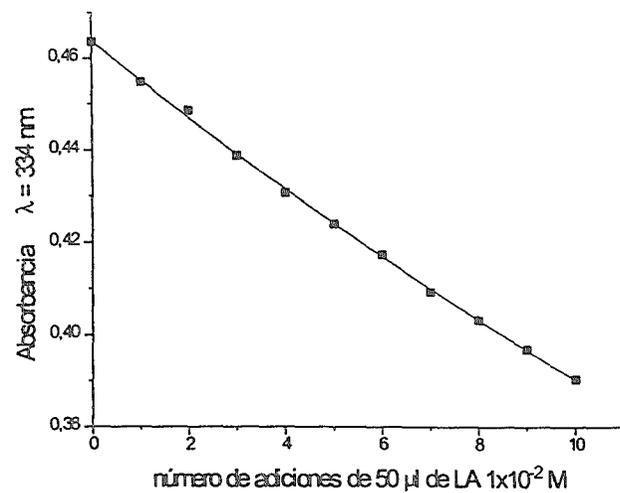


Figura 7.16. (Continuación).

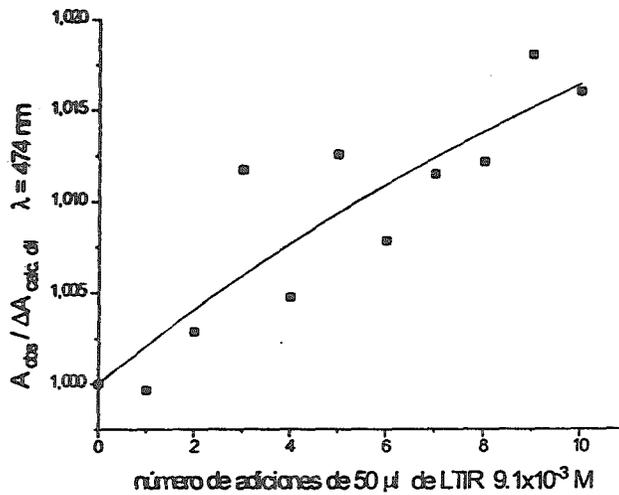
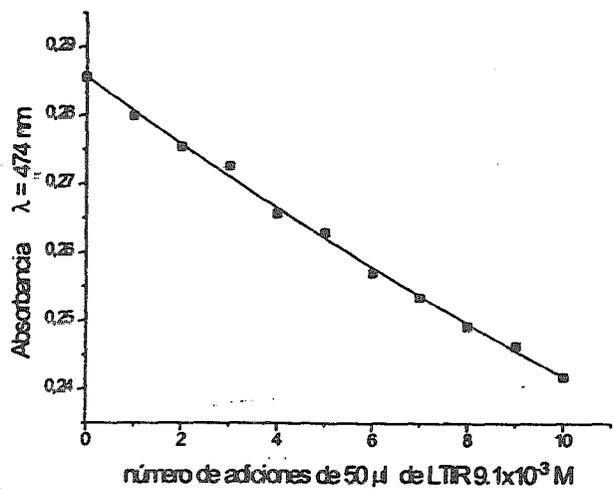
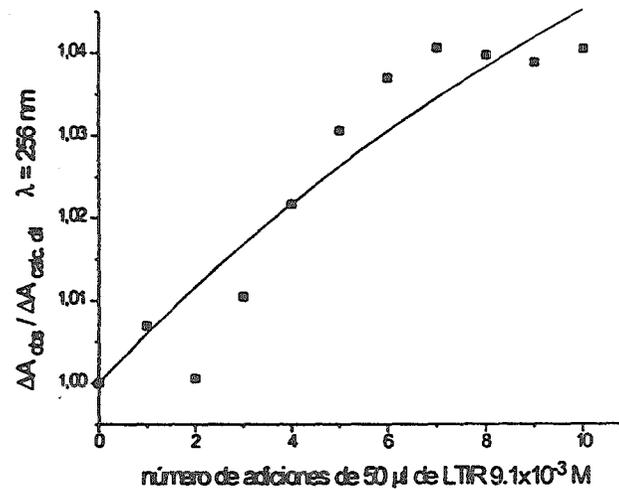
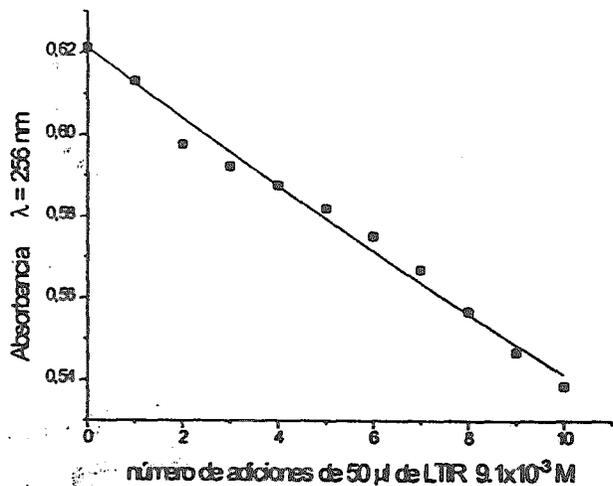


Figura 7.16. (Continuación).

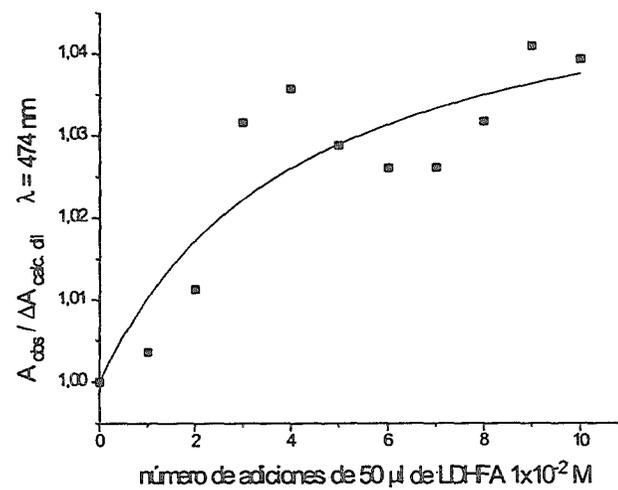
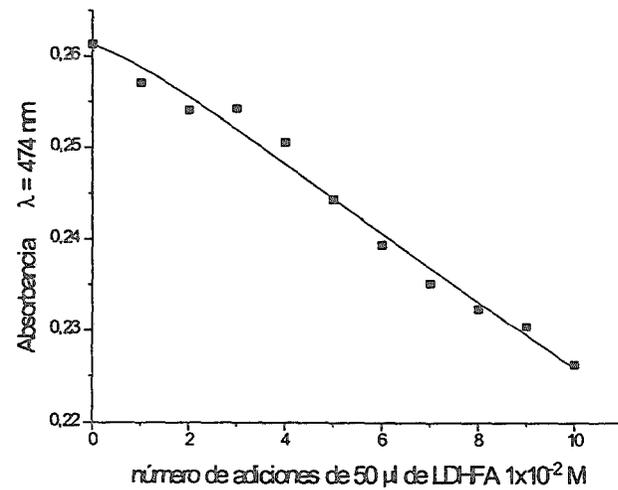
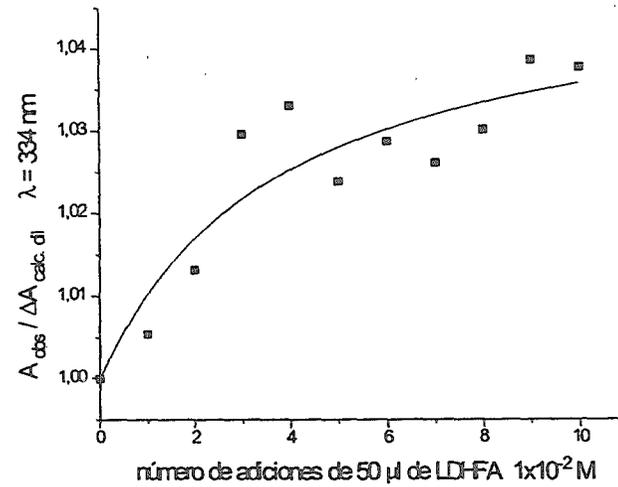
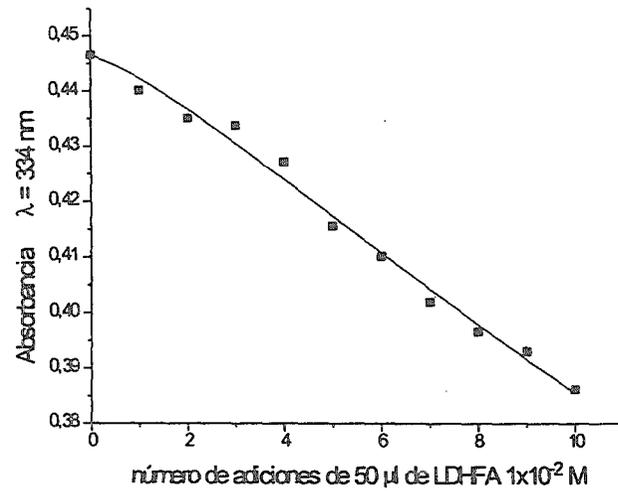


Figura 7.16. (Continuación).

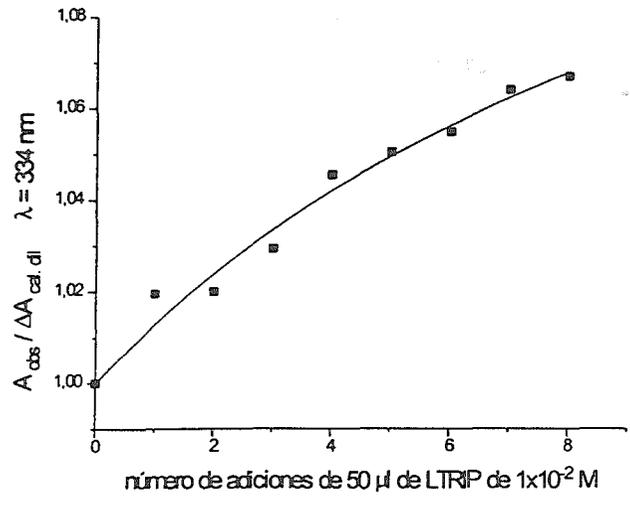
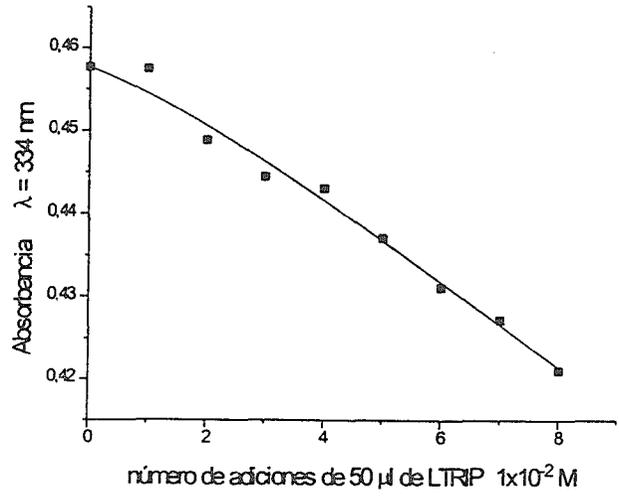
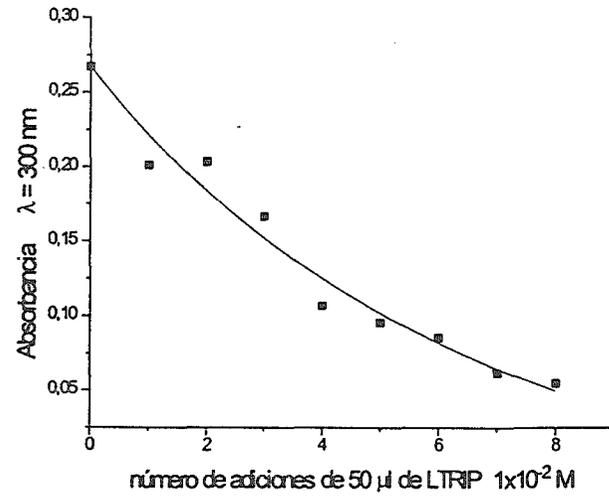


Figura 7.16. (Continuación).

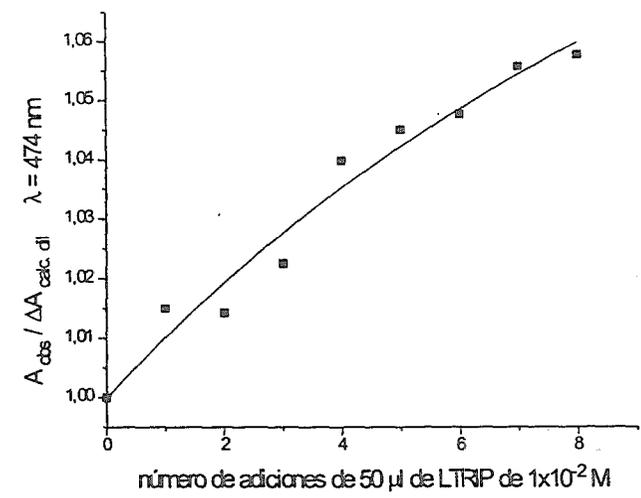
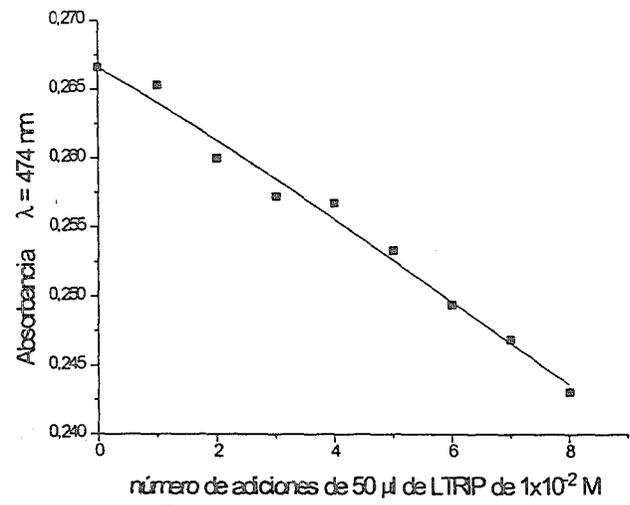


Figura 7.16. (Continuación).

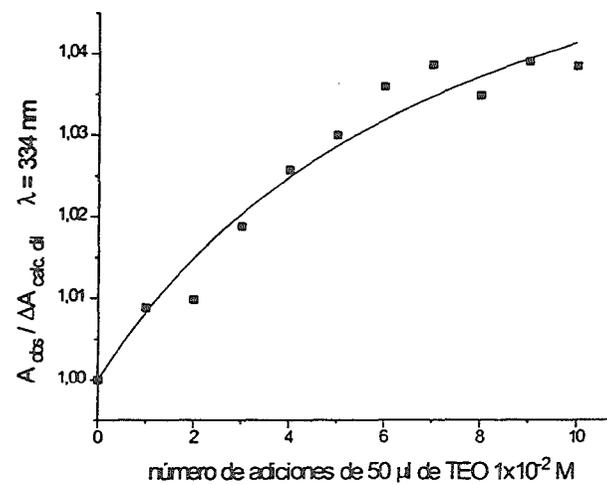
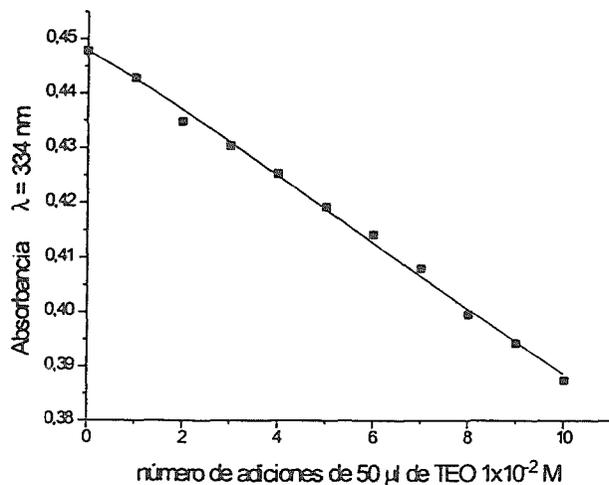
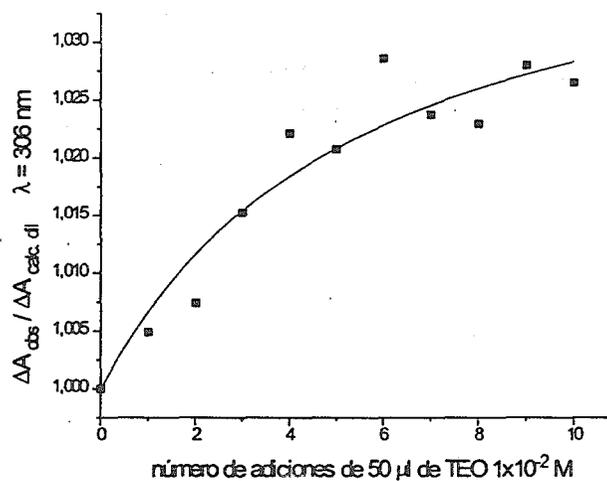
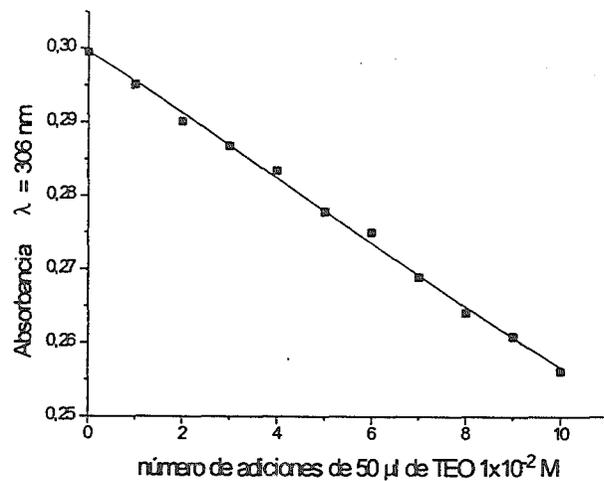


Figura 7.17. Absorbancias observadas y relación de absorbancias a diversas longitudes de onda como función del número de adiciones de la solución concentrada de la base púrica (pH 6). Las curvas son perfiles teóricos calculados con las ecuaciones (A.7.19) y (A.7.32), respectivamente.

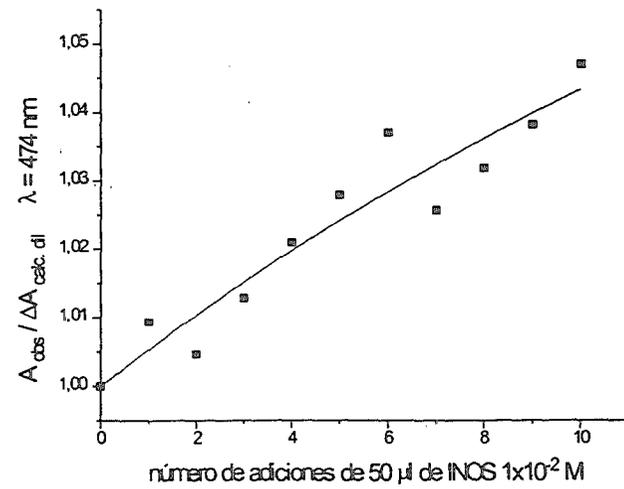
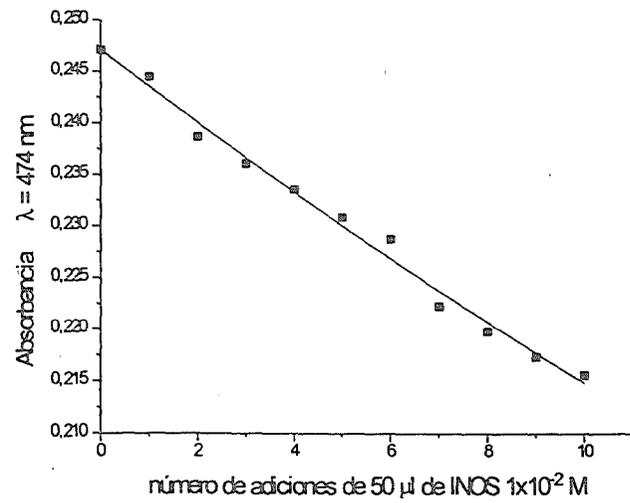
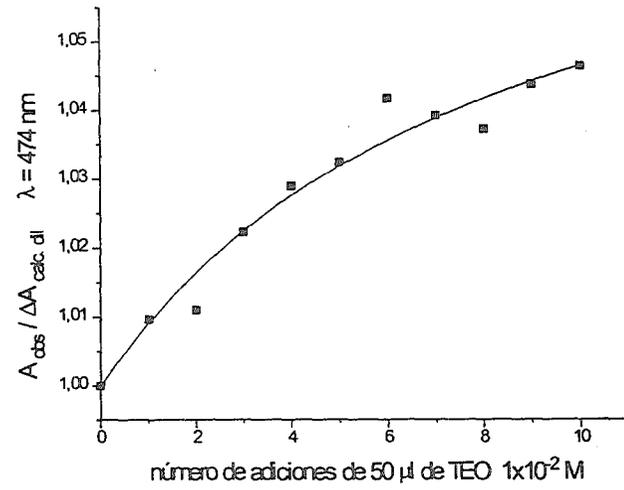
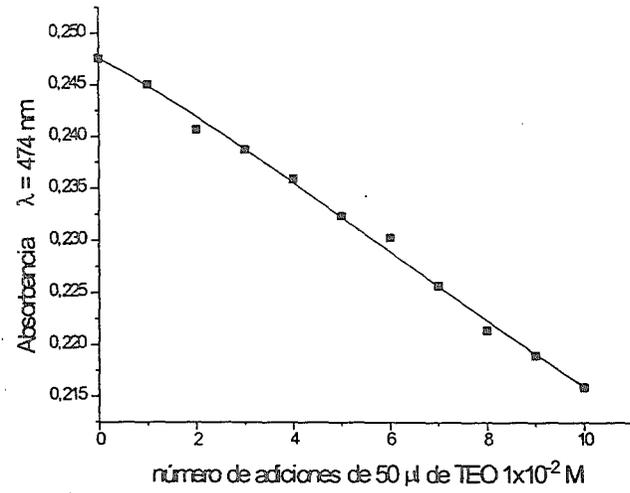


Figura 7.17. (Continuación).

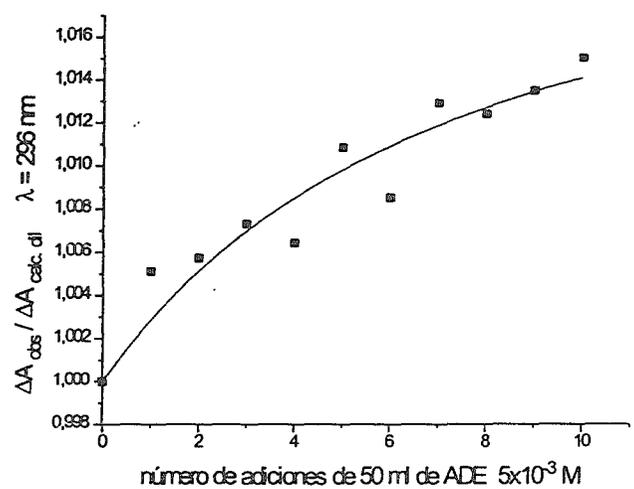
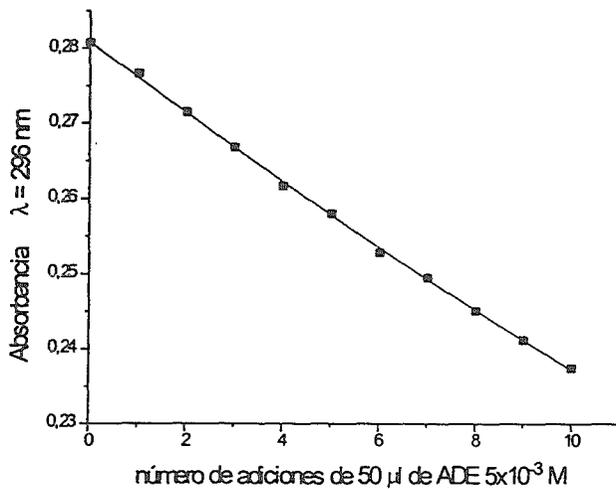
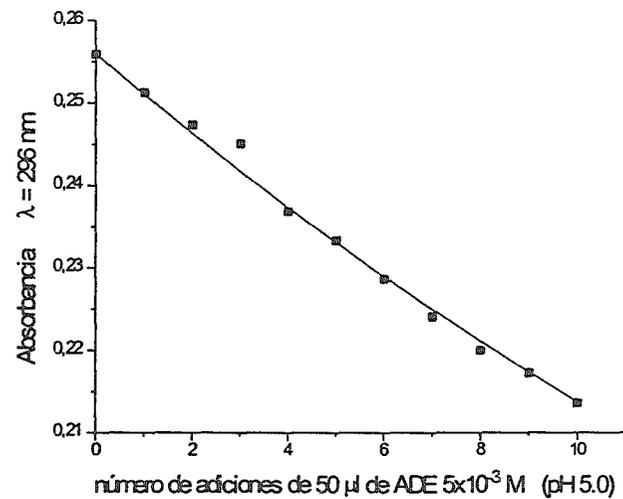
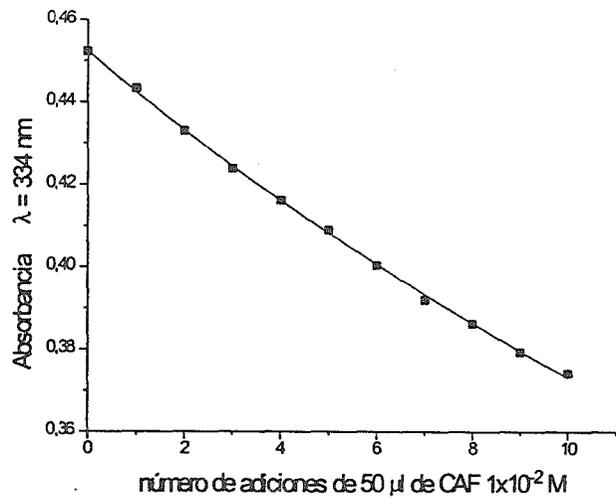


Figura 7.17. (Continuación).

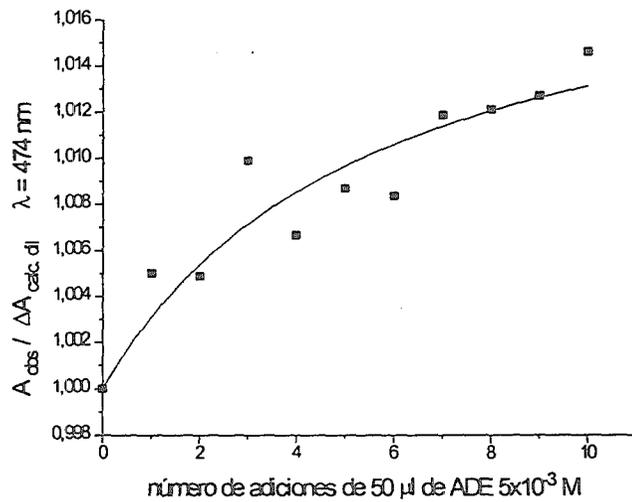
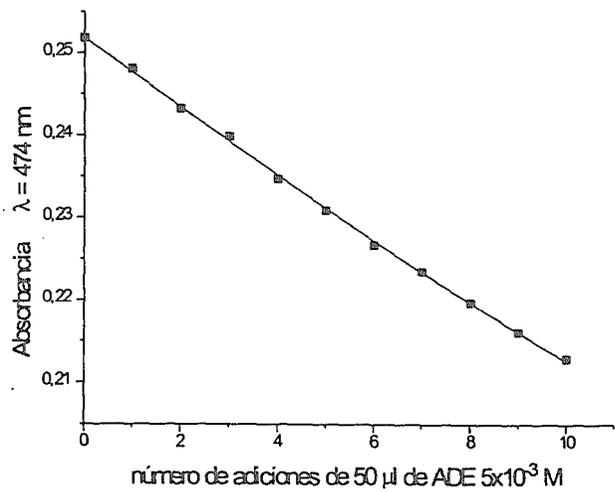
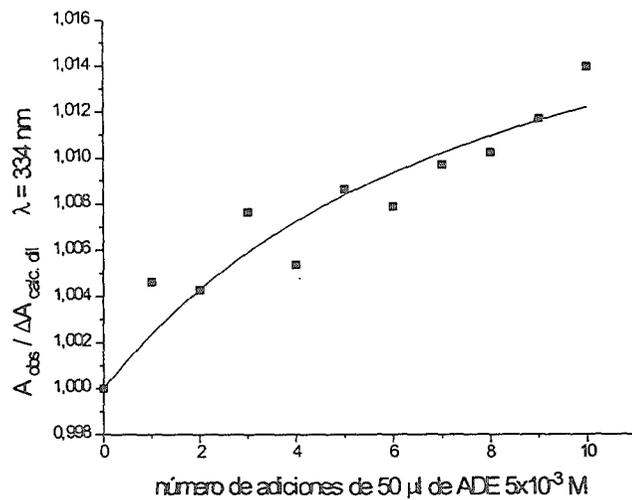
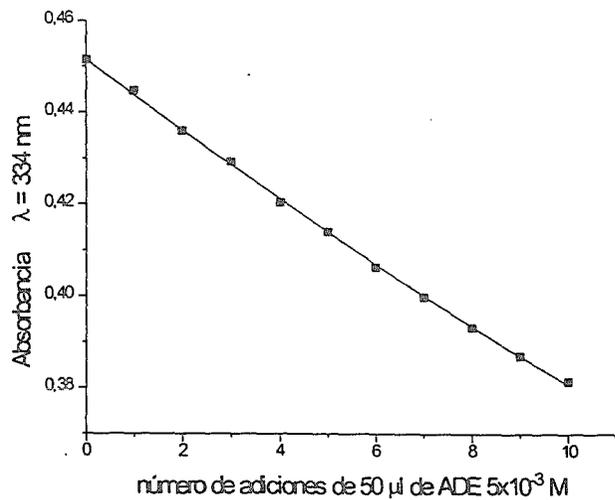


Figura 7.17. (Continuación).

Tabla 7.4. Constantes de enlace RIFAM-aminoácido y RIFAM-bases púricas obtenidas por espectrofotometría UV-VIS a pH 6.0 (M<sup>-1</sup>).

Huésped	K (M <sup>-1</sup> ) promedio	λ's (nm) empleadas para el cálculo de K	Observaciones
NADFA	140 ± 110	232 y 236	La constante promedio fue obtenida sólo por el empleo de la ecuación A.7.19.
NALFA	550 ± 290	232 y 334	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
DFA	16 ± 60	256	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
LFA	530 ± 310	334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
NADA	170 ± 310	334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
NALA	-	-	No se pudo calcular ninguna constante a ninguna de las 6 λ's analizadas
DA	340 ± 210	228, 256, 296 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
LA	160 ± 400	334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
DTIR	-	-	No se pudo calcular ninguna constante a ninguna de las 6 λ's analizadas
LTIR	80 ± 310	256 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
LDHFA	1150 ± 830	334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
LTRIP	250 ± 180	300, 334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
TEO	590 ± 280	306, 334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
INO	30 ± 190	474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
CAF	740 ± 510	334	La constante promedio fue obtenida sólo por el empleo de la ecuación A.7.19.
ADE	1310 ± 970	296, 334 y 474	La constante promedio fue obtenida por el empleo de las ecuaciones A.7.19 y A.7.32.
ADE	1200 ± 6	296	La constante promedio fue obtenida a pH 5.0 y sólo por el empleo de la ecuación A.7.19.

### 7.2.1.3 Discusión

La diferencia entre las constantes de asociación calculadas (Tabla 7.4) para cada par de aminoácidos y bases púricas estudiadas indica que la rifampicina es capaz de formar complejos con las moléculas mencionadas. Al pH de estudio, 6.0, la rifampicina se encuentra en forma zwitteriónica y se espera que sea capaz de formar pares iónicos con sustratos cargados.

La diversidad entre las constantes de asociación para los diferentes enantiómeros de los aminoácidos indica que la rifampicina también es capaz de reconocimiento enantioespecífico. En algunos casos el grado de discriminación quiral está dentro del mismo orden de magnitud (NADFA/NALFA), o difieren en un orden de magnitud (DFA/LFA) y otros casos más, sólo es posible medir la constante de enlace para uno de los enantiómeros (NADA/NALA y DTIR/LTIR). Además, es importante mencionar que la discriminación quiral no favorece en todos los casos a un enantiómero en particular, sino que depende de la hidrofobicidad y del estado iónico del huésped. Al comparar las constantes de asociación de NADA/NALA con las de NADFA/NALFA, pares de enantiómeros aniónicos, la preferencia enantiomérica va del D- al L-enantiómero, respectivamente, siendo la única diferencia entre estos sustratos que en el carbono quiral se sustituye un metilo en la N-acetilalanina por un fenilo, un sustituyente más hidrofóbico y susceptible de interacciones  $\pi$  en la N-acetilfenilalanina. Al comparar las constantes de los huéspedes NADA/NALA y DA/LA se observa que la única diferencia entre ellos es que en el caso de la alanina el N no está acetilado, está libre, pero cargado, encontrándose por lo tanto el sustrato en forma zwitteriónica, este aspecto estructural cambia el grado de discriminación quiral, pero no modifica la preferencia por el D-enantiómero.

Al ir de un huésped aniónico a uno zwitteriónico, *i.e.*, NADFA/NALFA a DFA/LFA, sustratos que sólo se diferencian en que en la DFA/LFA el N no está protegido, está libre y cargado positivamente, es característica suficiente para aumentar el grado de discriminación quiral, manteniéndose, sin embargo; la preferencia quiral de la

rifampicina por el L-enantiómero. Indicando así que la introducción de una carga positiva en el huésped debilita la asociación con el D-enantiómero.

Si en la fenilalanina se introduce un hidroxilo en la posición *para* (DTIR/LTIR), sustituyente que no cambia apreciablemente la hidrofobicidad de la molécula huésped, si se considera que la parte aromática del sustrato es la que se incluye o se asocia y el hidroxilo se encuentra dirigido hacia fuera en contacto con el agua, trae como consecuencia que se mantiene la preferencia por el L-enantiómero, sin embargo; disminuye la constante de enlace del L-enantiómero en un orden de magnitud mientras que no es posible medir la constante de enlace para el D-enantiómero. Indicando muy probablemente, que debido a factores estéricos generados por la introducción de un hidroxilo en la posición *para* se hace menos eficiente el enlace de la rifampicina con DTIR y LTIR.

Si en el caso de la LTIR se introduce otro grupo hidroxilo ahora en la posición *meta* (LDHFA) la constante de enlace se duplica con respecto a la LFA. Sugiriendo por lo tanto que ese grupo hidroxilo está posicionado adecuadamente y es capaz de establecer una interacción adicional entre el huésped y la molécula anfitrión, de tal manera que se fortalece el enlace.

Para el caso del LTRIP, un huésped también zwitteriónico, la constante de enlace disminuye a la mitad con respecto a la LFA. Sugiriendo que la distancia óptima de enlace corresponde a la separación del carbono quiral del anillo de benceno de un carbono.

El enlace selectivo de bases nucleicas se atribuye a puentes de hidrógeno o a interacciones de apilamiento entre sistemas  $\pi$  del anfitrión y del huésped. Sin embargo, el principal problema es el hecho de que el enlace de hidrógeno está altamente desfavorecido en agua. Por lo que sugieren el empleo de receptores selectivos solubles en agua con una cavidad lipofílica que sea capaz de enlazar eficientemente a la base nucleica [Cudic *et al.*, 1995]. A la fecha sólo se han preparado dos tipos de receptores que reúnen esas características, los azaniaciclofanos [Schneider *et al.*, 1992b] y los ciclobis(intercaladores) [Cudic *et al.*, 1995]. Según Cudic *et al.* [1995] ambos tipos de receptores enlazan purinas ligeramente mejor que los nucleótidos de

monofosfato de pirimidinas con constantes de estabilidad de  $10^2$  a  $10^3$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$  y  $10^3$ - $10^4$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ , respectivamente; mientras que el receptor bis(fenantridinium) enlaza nucleótidos en medio acuoso con constantes de estabilidad en el intervalo  $10^5$  a  $10^6$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ . De estudios de ciclofanos y otras moléculas anfitrión indican que la principal contribución a la asociación de sustratos aromáticos con  $\text{N}^+$  del receptor es la atracción con un dipolo inducido en la parte  $\pi$  del huésped. Concluyen que en otras moléculas anfitrión con partes aromáticas como naftaleno, acridina o fenantridina, el anfitrión enlaza a las bases nucleicas debido a interacciones predominantemente dispersivas o hidrofóbicas [Ragunathan y Schneider, 1996].

En este trabajo se estudió la interacción de la rifampicina con algunas moléculas derivadas de la purina y cafeína como la ADE, CAF, TEO e INO (Figura 7.9). Se encontró que la ADE tiene la constante de enlace más grande,  $1300 \text{ M}^{-1}$ , la ADE es un sistema aromático conjugado con 4 cuatro heteroátomos (N) y un grupo amino en la posición 6, todos ellos susceptibles de formar puentes de hidrógeno, mientras que el sistema aromático puede ser objeto de interacciones  $\pi$ - $\pi$  y/o de puentes de hidrógeno con el sistema naftoquinol de la rifampicina o bien capaz de interacciones  $\text{N}^+$ - $\pi$  con el  $\text{N}^+$  del anillo de piperazina de la rifampicina. Se han reportado otras constantes de asociación para la adenina:  $80 \text{ M}^{-1}$  (azoniaciclofano) [Schneider *et al.*, 1992b] y  $640 \text{ M}^{-1}$  con la porfirina tetrakis(4-N-metilpiridil) [Pasternack *et al.*, 1985] y del enlace de la adenosina con un azoniaciclofano  $50 \text{ M}^{-1}$  [Schneider *et al.*, 1992b]. La comparación de la constante obtenida con las reportadas es un orden de magnitud mayor, indicando que la rifampicina podría ser un receptor apropiado para este tipo de moléculas.

Sin embargo, la pérdida de aromaticidad en el anillo de benceno y la introducción de un sistema diona en las posiciones 2 y 6 (CAF y TEO) disminuye la constante de enlace a aproximadamente la mitad,  $600 \text{ M}^{-1}$  (TEO) y  $740 \text{ M}^{-1}$  (CAF). La diferencia entre la TEO y CAF estriba en que la CAF es un poco más hidrofóbica ya que posee un grupo metilo en la posición 7. La constante de enlace de la rifampicina a la inosina, un nucleosido, sistema anular derivado de la purina con un grupo cetónico en la posición 6 y una ribosa en la posición 9 disminuye la constante de enlace dos órdenes de magnitud debido muy probablemente a efectos estéricos.

### 7.3 Estudios de la rifampicina por resonancia magnética protónica

Se obtuvieron los espectros de RMN protónica de la RIFAM en un espectrómetro de RMN Varian *Gemini* de 300 MHz. Para la asignación de las señales del espectro se tomó tanto la asignación como la numeración de protones reportada por Gallo y Radaelli [1976]. La técnica de RMN protónica de 300 MHz fue empleada para llevar a cabo los siguientes estudios de la RIFAM: determinación de un  $pK_a$ , estudio de las interacciones RIFAM y algunos aminoácidos aniónicos a pH 6.0, estudio de interacciones de RIFAM y algunos aminoácidos catiónicos a pH 8.5, estudio de las interacciones RIFAM–NADFA y RIFAM–NALFA en  $CDCl_3$ . Enseguida se describe el procedimiento empleado para el estudio de la RIFAM por RMN y los cambios de desplazamiento obtenidos en cada caso.

En estos experimentos, las disoluciones de la RIFAM y aminoácidos se prepararon en  $D_2O$  y se ajustaron a los pH's de estudio por adiciones de microlitros de disoluciones de  $Na_2CO_3$  y  $CF_3COOH$ , preparadas también en  $D_2O$ , posteriormente se recalcularon las concentraciones de las disoluciones por dilución.

#### 7.3.1 Determinación de un $pK_a$ de la rifampicina

Para determinar los  $pK_a$ 's de la RIFAM por esta técnica se obtuvieron los espectros de RMN de disoluciones de  $[RIFAM]=5 \times 10^{-4}$  M en  $D_2O$  a los pH's de 5.16, 6.0, 7.05, 7.40, 8.18 y 8.5. El pH de disoluciones en  $D_2O$  se corrige con la ecuación (4.1):  $pD = pH$  (mostrado en el pH-metro) + 0.44 [Mikkelsen y Nielsen, 1960; Covington *et al.*, 1968; Galster, 1991], por lo que los pH's mencionados se desplazan 0.44 unidades de tal manera que los pD's de las disoluciones estudiadas fueron 5.60, 6.44, 7.49, 7.84, 8.62 y 8.94. La Tabla 7.5 muestra los cambios de desplazamiento químico ( $\delta$ ) para las señales de los protones  $CH_2$  2'6' y  $CH=N$ , protones para los cuales sus

cambios de  $\delta$  fueron más grandes y permitieron calcular uno de los  $pK_a$ 's de la RIFAM empleando la ecuación (7.7).

$$\delta_{obs} = \frac{\delta_{RD} \cdot \frac{[D^+]}{K_a} + \delta_{R^-}}{\frac{[D^+]}{K_a} + 1} \quad (7.7)$$

Donde  $\delta_{obs}$  es el desplazamiento observado de algún protón de la RIFAM,  $\delta_{RD}$  y  $\delta_{R^-}$ , son los desplazamientos químicos de las especies indicadas y  $K_a$  es la constante de acidez.

El Apéndice A.8 presenta la deducción completa de esta ecuación y su empleo para el cálculo de uno de los  $pK_a$ 's de la RIFAM.

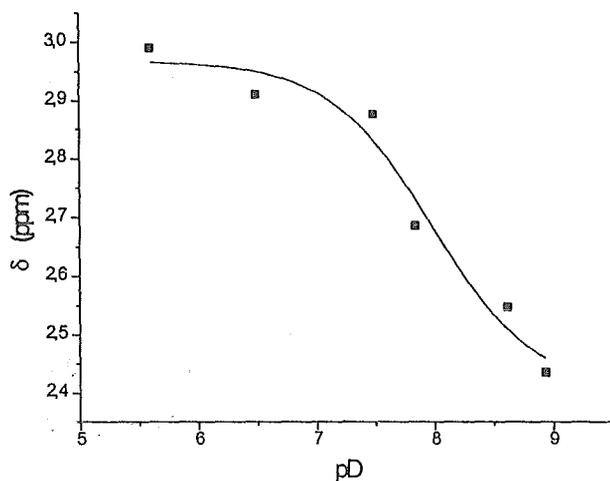
**Tabla 7.5.** Desplazamientos químicos de los protones CH<sub>2</sub> 2'6' y CH=N de la RIFAM en función del pD (ppm).

pD	$\delta$ CH <sub>2</sub> 2'6'	$\delta$ CH=N
5.60	2.990	8.183
6.44	2.911	8.170
7.49	2.877	8.160
7.84	2.686	8.140
8.62	2.547	8.087
8.94	2.435	8.071

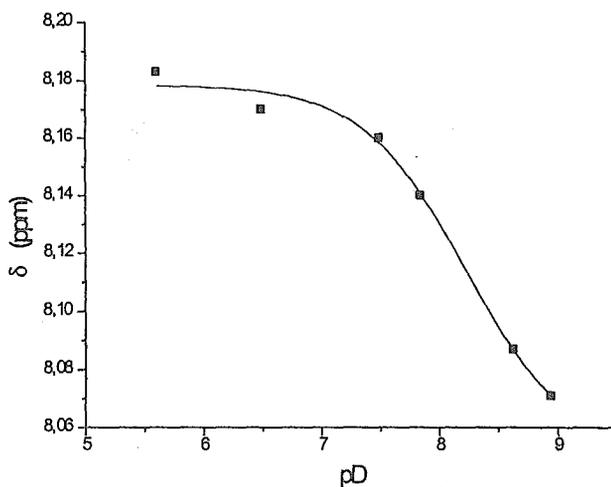
Las Figuras 7.18 y 7.19 muestran los ajustes correspondientes para calcular uno de los  $pK_a$ 's de la RIFAM empleando los  $\delta$ 's para los protones CH<sub>2</sub> 2'6' y CH=N, respectivamente. La Tabla 7.6 presenta los  $pK_a$ 's calculados por esta técnica.

**Tabla 7.6.**  $pK_a$ 's de la RIFAM obtenidos por RMN <sup>1</sup>H.

Protón	CH <sub>2</sub> 2'6'	CH=N
$pK_a$	7.983 ± 0.494	8.219 ± 0.243
$pK_a$ (promedio)	8.101 ± 0.369	



**Figura 7.18.** Gráfica que muestra el desplazamiento químico de la señal para los protones CH<sub>2</sub> 2'6' en función del pD. La línea continua muestra el ajuste correspondiente para el cálculo de uno de los pK<sub>a</sub>'s de la RIFAM.



**Figura 7.19.** Gráfica que muestra el desplazamiento químico de la señal para los protones CH=N en función del pD. La línea continua muestra el ajuste correspondiente para el cálculo de uno de los pK<sub>a</sub>'s de la RIFAM.

Los valores de  $pK_a^D$  siempre son mayores que  $pK_a^H$  y hay una correlación ya establecida [Delgado *et al.*, 1991]:

$$pK_a^D = 0.11 + 1.10 \cdot pK_a^H \quad (7.8)$$

por lo que empleando la ecuación (7.8) el  $pK_a^D$  esperado es 7.15, valor cercano a 7.9, asignado al N-4 de la piperazina (ver en el capítulo 2, Tabla 2.4). El valor obtenido por RMN es más confiable que el obtenido por espectrofotometría UV-VIS (Tabla 7.2).

### 7.3.2 Interacción RIFAM–aminoácido a pD 6.44

Para determinar las zonas de interacción y la magnitud de los  $\Delta\delta$ 's de la RIFAM y NALFA, DFA, LFA, NADA, NALA, DALA y LALA a pD 6.44 se obtuvo un sólo espectro de RMN para el estudio de cada interacción. La concentración de la RIFAM fue  $5.0 \times 10^{-4}$  M y cada uno de los aminoácidos tienen una concentración en el tubo del orden de  $10^{-2}$  M. La Tabla 7.7 presenta las concentraciones en el tubo de los aminoácidos estudiados y los  $\Delta\delta$ 's para los protones de RIFAM que mostraron los  $\Delta\delta$ 's más grandes.

Tabla 7.7. Cambios de desplazamiento químico  $\Delta\delta = \delta_{\text{RIFAM-AMINOACIDO}} - \delta_{\text{RIFAM}}$ , [RIFAM] =  $5 \times 10^{-4}$  M<sup>a</sup> a pD 6.44 (ppm).

Experimento	CH <sub>3</sub> (33) <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> (31,32) <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> (30,36) <sup>d</sup>	CH <sub>3</sub> (14) <sup>d</sup>	H (20) <sup>c</sup>
RIFAM <sup>b</sup>	0.667 0.693	1.017 1.028	2.113	2.166	2.436 2.462
RIFAM + NALFA 3.06x10 <sup>-2</sup> M	-0.013 -0.014	-0.017 -0.002	0.003	0.001	0.013 - <sup>e</sup>
RIFAM + DFA 2.80x10 <sup>-2</sup> M	0.000 -0.001	-0.017 -0.002	-0.001	0.013	0.013 0.025
RIFAM + LFA 3.06x10 <sup>-2</sup> M	0.012 0.012	- <sup>e</sup> -0.010	0.003	0.013	- <sup>e</sup> 0.012
RIFAM + NADA 2.69x10 <sup>-2</sup> M	0.012 0.012	0.000 -0.002	0.053	0.129	0.026 0.025
RIFAM + NALA 2.63x10 <sup>-2</sup> M	0.000 -0.001	- <sup>e</sup> -0.002	0.054	0.124	0.013 0.017
RIFAM + DALA 3.21x10 <sup>-2</sup> M	-0.012 -0.012	-0.004 0.011	0.003	0.003	- <sup>e</sup> 0.012
RIFAM + LALA 3.25x10 <sup>-2</sup> M	0.000 0.014	-0.009 -0.011	0.002	0.000	- <sup>d</sup> 0.012

<sup>a</sup> Concentración inicial de RIFAM en el tubo. <sup>b</sup> Desplazamientos químicos de la RIFAM a pD 6.44.

<sup>c</sup> Doblete. <sup>d</sup> Singulete. <sup>e</sup> Aparece una sola rama del doblete o bien una sola señal sin desdoblamiento.

### 7.3.3 Titulación de RIFAM con NADFA a pD 6.44

Para determinar la constante de enlace de la RIFAM y NADFA por RMN a pD 6.44 se fijó la concentración de RIFAM en  $5 \times 10^{-4}$  M y se tituló con una disolución de NADFA  $9.8 \times 10^{-2}$  M, de tal manera que se obtuvieran concentraciones finales en el tubo en el intervalo  $3.16 \times 10^{-3}$  –  $3.12 \times 10^{-2}$  M. La Tabla 7.8 presenta las concentraciones finales en el tubo después de cada una de las siete adiciones sucesivas de 0.029, 0.029, 0.034, 0.044, 0.074, 0.074 y 0.124 ml de NADFA  $9.8 \times 10^{-2}$  M a la RIFAM y los  $\Delta\delta$ 's para los protones de RIFAM que mostraron los  $\Delta\delta$ 's más grandes.

**Tabla 7.8.** Cambios de desplazamiento químico  $\Delta\delta = \delta_{\text{RIFAM-NADFA}} - \delta_{\text{RIFAM}}$ , [RIFAM] =  $5 \times 10^{-4}$  M<sup>a</sup> a pD 6.44 (ppm).

Experimento	CH <sub>3</sub> (33) <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> (31,32) <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> (13) <sup>d</sup>	CH <sub>3</sub> (30,36) <sup>d</sup>	CH=N <sup>d</sup>
RIFAM <sup>b</sup>	0.667 0.690	1.024 1.034	1.853	2.103	8.190
RIFAM + NADFA $3.16 \times 10^{-3}$ M	0.000 - <sup>e</sup>	0.000 - <sup>e</sup>	0.004	-0.001	-0.023
RIFAM + NADFA $6.11 \times 10^{-3}$ M	0.000 - <sup>e</sup>	-0.001 - <sup>e</sup>	-0.003	-0.007	-0.011
RIFAM + NADFA $9.35 \times 10^{-3}$ M	0.000 - <sup>e</sup>	-0.012 - <sup>e</sup>	-0.001	0.000	-0.011
RIFAM + NADFA $1.32 \times 10^{-2}$ M	0.000 - <sup>e</sup>	-0.010 - <sup>e</sup>	-0.005	-0.006	-0.011
RIFAM + NADFA $1.90 \times 10^{-2}$ M	-0.012 -0.011	-0.012 0.012	0.000	-0.013	-0.011
RIFAM + NADFA $2.41 \times 10^{-2}$ M	-0.024 -0.023	-0.012 - <sup>e</sup>	0.003	-0.008	-0.011
RIFAM + NADFA $3.12 \times 10^{-2}$ M	-0.012 - <sup>e</sup>	-0.024 - <sup>e</sup>	0.002	0.004	-0.011

<sup>a</sup> Concentración inicial de RIFAM en el tubo. <sup>b</sup> Desplazamientos químicos de la RIFAM a pD 6.44. <sup>c</sup> Doblete.

<sup>d</sup> Singulete. <sup>e</sup> Aparece una sola rama del doblete o bien una sola señal sin desdoblamiento.

### 7.3.4 Interacciones RIFAM–NADFA y RIFAM–NALFA en CDCl<sub>3</sub>

Para comparar las zonas de interacción y la magnitud de los cambios de desplazamiento químico de la RIFAM y NADFA y NALFA en un ambiente acuoso y no acuoso se obtuvo un sólo espectro de RMN en CDCl<sub>3</sub> para el estudio de cada interacción, en el cual [RIFAM]= $1 \times 10^{-3}$  M y cada uno de los aminoácidos tienen una

concentración en el tubo de  $1.13 \times 10^{-3}$  M para NADFA y NALFA. La Tabla 7.9 presenta los  $\Delta\delta$ 's para los protones de RIFAM que mostraron los  $\Delta\delta$ 's más grandes en este experimento en  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabla 7.9.** Cambios de desplazamiento químico  $\Delta\delta = \delta_{\text{RIFAM-AMINOACIDO}} - \delta_{\text{RIFAM}}$ ,  $[\text{RIFAM}] = 1 \times 10^{-3}$  M<sup>a</sup> en  $\text{CDCl}_3$ . (ppm).

Experimento	CH <sub>3</sub> (14) <sup>c</sup>	CH <sub>2</sub> 2'60' <sup>d</sup>	H (25) <sup>c</sup>	H (28) <sup>e</sup>	H (18) <sup>e</sup>	CH=N <sup>c</sup>	N-H <sup>c</sup>
RIFAM <sup>b</sup>	2.337 2.353	2.565	4.950 5.00	5.100 5.133 5.167	6.567 6.600 6.633	8.308	12.016
RIFAM + NADFA $1.13 \times 10^{-3}$ M	0.050 0.042	0.122	-0.017 -0.033	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.017	0.027	0.054
RIFAM + NALFA $1.13 \times 10^{-3}$ M	- <sup>f</sup> 0.037	0.116	0.000 -0.017	-0.017 -0.016 -0.017	-0.017 0.017 0.017	0.021	0.047

<sup>a</sup> Concentración inicial en el tubo. <sup>b</sup> Desplazamientos químicos de la RIFAM en  $\text{CDCl}_3$ . <sup>c</sup> Doblete. <sup>d</sup> Singulete. <sup>e</sup> Triplete. <sup>f</sup> Aparece una sola rama del doblete o bien una sola señal sin desdoblamiento.

### 7.3.5 Interacciones RIFAM-aminoácido a pD 8.94

Para determinar las zonas de interacción y la magnitud de los cambios de desplazamiento químico de la RIFAM y LAME, LAEE, DFAME, LFAME a pD 8.94 se obtuvo un sólo espectro de RMN para el estudio de cada interacción, en el cual  $[\text{RIFAM}] = 5 \times 10^{-4}$  M y cada uno de los huéspedes tiene una concentración en el tubo del orden de  $10^{-2}$  M. La Tabla 7.10 presenta las concentraciones en el tubo de los aminoácidos esterificados estudiados y los  $\Delta\delta$ 's para los protones de RIFAM que mostraron los  $\Delta\delta$ 's más grandes.

### 7.3.6 Interacción RIFAM-LFAME a pD 8.94

Para estudiar la interacción de la RIFAM y LFAME por RMN a pD 8.94 se prepararon cuatro disoluciones de RIFAM con una concentración de  $5 \times 10^{-4}$  M y concentraciones de LFAME de  $10^{-4}$  –  $10^{-3}$  M en cada una de las disoluciones de RIFAM.

Los espectros de RMN de las mezclas se obtuvieron después de 3 – 4 h de tiempo de estabilización. La Tabla 7.11 presenta las concentraciones finales en el tubo de la LFAME y los  $\Delta\delta$ 's para los protones de RIFAM que mostraron los  $\Delta\delta$ 's más grandes.

**Tabla 7.10.** Cambios de desplazamiento químico  $\Delta\delta = \delta_{\text{RIFAM-AMINOACIDO ESTERIFICADO}} - \delta_{\text{RIFAM}}$ ,  $[\text{RIFAM}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}^a$  (pD 8.94).

Experimento	CH <sub>3</sub> (31,32) <sup>c</sup>	H (26) <sup>d</sup>	CH <sub>3</sub> (13) <sup>d</sup>	CH <sub>2</sub> 3'5' <sup>d</sup>	CH <sub>2</sub> 2'6' <sup>d</sup>	CH=N <sup>d</sup>
RIFAM <sup>b</sup>	1.021 1.026	1.263	1.864	2.435	2.802	8.071
RIFAM + LAME 3.06x10 <sup>-2</sup> M	0.004 0.024	-0.038	0.002	-0.009	-0.014	0.017
RIFAM + LAEE 3.02x10 <sup>-2</sup> M	0.012 / 0.017 <sup>e</sup>	-0.125	-0.001	-0.004	-0.002	0.004
RIFAM + DFAME 2.96x10 <sup>-2</sup> M	0.006 / 0.001 <sup>e</sup>	-0.000	-0.011	-0.031	-0.039	-0.015
RIFAM + LFAME 2.96x10 <sup>-2</sup> M	0.012 / 0.017 <sup>e</sup>	0.012	-0.009	-0.037	-0.052	-0.012

<sup>a</sup> Concentración inicial de RIFAM en el tubo. <sup>b</sup> Desplazamientos químicos de la RIFAM a pD 8.94. <sup>c</sup> Doblete. <sup>d</sup> Singulete. <sup>e</sup> Aparece una sola rama del doblete o bien una sola señal sin desdoblamiento, se presenta la diferencia de ese valor único con los  $\delta$  de las dos señales obtenidas en el caso de la RIFAM pura.

**Tabla 7.11.** Cambios de desplazamiento químico  $\Delta\delta = \delta_{\text{RIFAM-LFAME}} - \delta_{\text{RIFAM}}$ ,  $[\text{RIFAM}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}^a$  a pD 8.94 después de 3 – 4 h de estabilización (ppm).

Experimento	CH <sub>3</sub> (34) <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> (32,31) <sup>d</sup>	H (26) <sup>d</sup>	CH <sub>2</sub> 3'5' <sup>d</sup>	CH <sub>2</sub> 2'6' <sup>d</sup>	H (23) <sup>d</sup>	CH=N <sup>d</sup>
RIFAM <sup>b</sup>	-0.1536 -0.1299	1.0239	1.275	2.4059	2.7651	3.2186	8.0494
RIFAM + LFAME 3.0x10 <sup>-4</sup> M	-0.0048 -0.0098	-0.0233	-0.037	-0.0104	-0.0116	-0.0091	-0.0023
RIFAM + LFAME 6.0x10 <sup>-4</sup> M	0.0023 0.0018	-0.0175	-0.025	0.000	-0.0074	0.0145	0.0001
RIFAM + LFAME 1.5x10 <sup>-3</sup> M	-0.0156 -0.0167	-0.0077	-0.012	-0.0022	-0.0021	0.0064	0.0006
RIFAM + LFAME 5.0x10 <sup>-3</sup> M	-0.0156 0.0235	0.0011	-0.037	-0.0063	-0.0133	0.0064	-0.0010

<sup>a</sup> Concentración inicial de RIFAM en el tubo. <sup>b</sup> Desplazamientos químicos de la RIFAM a pD 8.94 después del periodo de estabilización. <sup>c</sup> Doblete. <sup>d</sup> Singulete.

### 7.3.7 Discusión

Los cambios de  $\delta$  obtenidos (Tabla 7.7), fueron muy pequeños, menores de 0.01 ppm, sólo para NADA y NALA los  $\Delta\delta$  fueron de aproximadamente de  $-0.05$  ppm para  $\text{CH}_3$  (30,36) y  $-0.12$  ppm  $\text{CH}_3$  (14), sin cambios apreciables entre ambos enantiómeros, estos metilos están orientados fuera de la cavidad de la rifampicina.

El cambio de un medio acuoso a no acuoso originó  $\Delta\delta$  más grandes. Los  $\Delta\delta$  para NADFA y NALFA en  $\text{CDCl}_3$  varían en el intervalo de 0.033 'a  $-0.12$  ppm para algunos protones de la cadena lateral de piperazina y algunos protones cerca del sistema naftoquinónico (ver Tabla 7.10).

En los experimentos realizados con la rifampicina a pD 8.94 y análogos catiónicos de algunos de los aminoácidos estudiados a pD 6.44, se observan  $\Delta\delta$  de hasta 0.125 ppm mientras que para los huéspedes neutros se observan  $\Delta\delta$  de hasta 0.052 ppm (Tabla 7.10).

El cambio en la magnitud de los  $\delta$ 's químicos entre pD 6.44 y pD 8.94, *i.e.*, cambio de desplazamientos químicos pequeños a grandes puede explicarse considerando que a pD 6.44 las interacciones se llevan a cabo entre una molécula anfitrión zwitteriónica (rifampicina) y huéspedes aniónicos, mientras que a pD 8.94 la rifampicina se encuentra en forma aniónica y hay una interacción electrostática más favorable con los huéspedes catiónicos.

Es importante señalar que aún cuando por espectrofotometría UV-VIS se determinaron diferentes constantes de asociación para cada enantiómero, por RMN no se detectan cambios significativos en los  $\Delta\delta$  químicos para un mismo par de enantiómeros, pero si diferencias apreciables con el cambio de estructura del aminoácido.

Los cambios de desplazamiento químico más grandes registrados en este estudio correspondieron a los protones que están orientados fuera de la cavidad de la rifampicina, lo cual podría indicar la posibilidad de formación de complejos de asociación, más que la formación de complejos de inclusión, si se considera que la

cavidad de la rifampicina es muy pequeña como para incluir alguno de los aminoácidos probados como huéspedes. Estas observaciones están de acuerdo con la indicación hecha por Casey y Whitlock [1975] de que en disolventes cada vez más acuosos la cadena *ansa* en la rifamicina S, se colapsa parcialmente en su interior hidrofóbico, algo similar podría ocurrir en la rifampicina. La diferencia entre ambas rifamicinas es que en la rifamicina S se tiene la forma naftoquinónica y en la rifampicina se tiene la forma naftoquinol y una cadena lateral de piperazina. Casey y Whitlock [1975] también señalan que la conformación en disolución de la rifamicina S es similar a su estructura cristalográfica.



## 8. Conclusiones y perspectivas

### 8.1 Conclusiones

#### Molécula de tubocurarina en forma dicatiónica

1. La tubocurarina puede formar complejos de inclusión con derivados de aminoácidos, benzoatos sustituidos y ácidos dicarboxílicos.
2. La tubocurarina es capaz de reconocimiento de isómeros de posición.
3. La tubocurarina es capaz de reconocimiento enantioespecífico.
4. La interacción tubocurarina-huésped se refuerza por la presencia de una segunda unidad de carboxilato en dianiones dicarboxílicos aromáticos.
5. La interacción tubocurarina-dianiones dicarboxílicos alifáticos no muestra ninguna correlación con el número de unidades de metileno que separa los dos aniones carboxilato.

#### Molécula de tubocurarina en forma bi-zwitteriónica

6. La tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica forma complejos con enantiómeros de derivados diferentemente cargados.
7. La tubocurarina es capaz de generar respuestas espectrales diferentes para los diferentes huéspedes enantioméricos.
8. La tubocurarina posee una actividad enantioespecífica tipo esterasa debido a la nucleofilicidad de sus hidroxilos aromáticos desprotonados.

#### Molécula de rifampicina

9. La rifampicina puede formar complejos con derivados de aminoácidos y algunos heterociclos.
10. La rifampicina es capaz de reconocimiento enantioespecífico.

Como resultado general, este trabajo de tesis muestra que el empleo de macrociclos naturales llevará a un alto reconocimiento molecular, en particular quiral, en términos termodinámicos y cinéticos.

## 8.2 Perspectivas para trabajos futuros

### Tubocurarina

Del trabajo realizado sobre la tubocurarina se desprenden los siguientes aspectos de interés:

1. La discriminación quiral termodinámica encontrada para la tubocurarina en su forma dicatiónica sugiere la posibilidad de su aplicación analítica como discriminador quiral para cromatografía o bien como anfitrión cargado en experimentos de electroforesis capilar.
2. La selectividad quiral de la tubocurarina en su forma bi-zwitteriónica mostrada en la hidrólisis de ésteres enantioméricos podría emplearse para resolver mezclas racémicas de aminoácidos en forma de ésteres. Además sería deseable investigar la especificidad de la hidrólisis de la tubocurarina con respecto a la estructura del grupo N-protégido y a la estructura del sustituyente del carbono quiral del aminoácido.
3. Los boratos son inhibidores clásicos de hidrolasas de serina; sin embargo, se encontró que en el caso de la tubocurarina en forma bi-zwitteriónica causa la aceleración del proceso de esterólisis, mostrando así un efecto activador. Por lo que sería interesante estudiar el efecto de los boratos en el caso de la cinética de reacción con la tubocurarina debido a los efectos opuestos, y, probablemente mejorar la actividad catalítica de la tubocurarina para algunas aplicaciones.

### Rifamicinas

Los estudios preliminares realizados con la rifampicina motivan el interés en otros derivados modificados de las rifamicinas, algunos de ellos disponibles

comercialmente y que contienen en sus estructuras (Figuras 2.24-2.26, **Capítulo 2**) fragmentos que introducen carga o cambian la polaridad de la molécula, modificando así el tipo de interacciones probables. De acuerdo a lo indicado se podrían proponer los siguientes estudios:

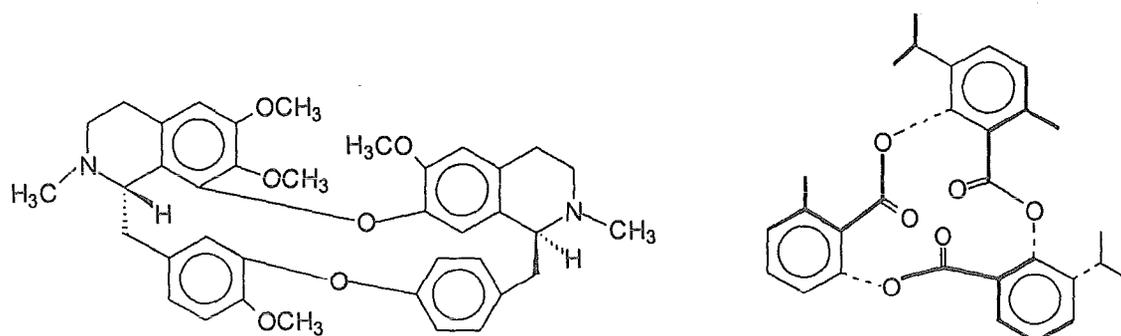
4. Probar la capacidad de la rifamicina B y SV (macrociclos aniónicos) para incluir algunos huéspedes catiónicos tales como aminas, ésteres de aminoácidos, aminoalcoholes, etc. Comparar los resultados de la rifamicina B con los obtenidos en esta tesis para a rifampicina y así determinar la importancia de la cadena de piperazinilo en la posición 3 en la fuerza de interacción rifamicina-huésped
5. Realizar la oxidación de la rifamicina SV a rifamicina S, esto cambiará el estado electrónico del fragmento aromático, y determinar las constantes de asociación de la rifamicina S con algunos huéspedes aromáticos. Comparar los resultados de la rifamicina SV con los obtenidos para la rifamicina B y la rifampicina, para determinar si los huéspedes probados son sensibles a la sustitución en la posición 4. También comparar los resultados de la rifamicina S con los obtenidos para la rifamicina B y rifamicina SV y así determinar si los huéspedes probados son sensibles a la oxidación de la 1,2-dihidroxiquinona.
6. Las comparaciones de las constantes de enlace obtenidas para la rifampicina y rifamicinas citadas podrían sugerir o confirmar algunas interacciones intermoleculares tales como puentes de hidrogeno en las posiciones 1 y 4 de las rifamicinas, o bien si se han alterado interacciones  $\pi-\pi$ .

Al emplear como huéspedes los derivados de aminoácidos se espera obtener información al respecto del modo de interacción de la rifamicinas con sus proteínas blanco (target).

#### Otros macrociclos naturales

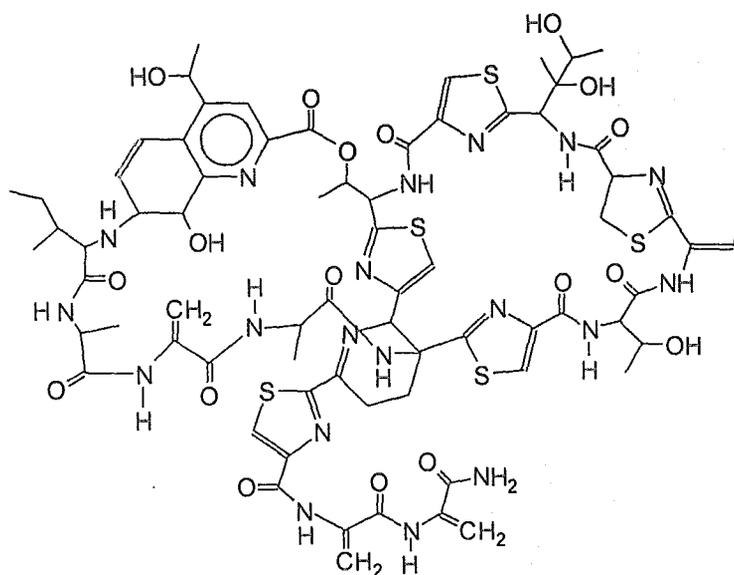
El estudio realizado en esta tesis motiva la realización trabajos similares con otros macrociclos tales como la tetrandrine, tri-o-thymotide y thiostrepton (ver estructuras más adelante).

Especialmente con la molécula de tetrandrine, ya que ésta posee unidades estructurales similares a las de la tubocurarina (Figura 2.23, Capítulo 2), pero dispuestas en otro arreglo. Por ejemplo, los dos anillos aromáticos están unidos sólo por un oxígeno, no hay hidroxilos libres, los nitrógenos de la isoquinolina no están protonados; sin embargo, están presentes también dos centros quirales. Inicialmente se estudiarían los mismos huéspedes que se emplearon en el caso de la tubocurarina. La comparación de las constantes de enlace que se obtuvieron para los mismos huéspedes y la similitud en estructura química de las moléculas anfitrión enriquecerá la información obtenida en esta tesis sobre los posibles tipos de interacciones intermoleculares responsables de la complejación en la tubocurarina.



tetrandrine

tri-o-thymotide



thiostrepton

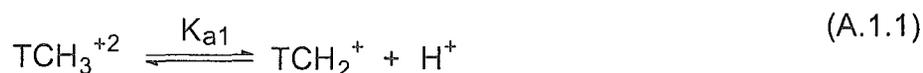
## 9. APENDICES

### APENDICÉS A. ECUACIONES EMPLEADAS

#### APENDICE A.1

#### ECUACION PARA EL CALCULO DE LOS $pK_a$ 'S DE LA TUBOCURARINA

Debido a que la tubocurarina tiene tres grupos ionogénicos se pueden considerar tres equilibrios, los cuales involucran tres ionizaciones sucesivas de la tubocurarina:



Las constantes de acidez para los equilibrios (A.1.1), (A.1.2) y (A.1.3) son:

$$K_{a1} = \frac{[TCH_2^+][H^+]}{[TCH_3^{+2}]} \quad (A.1.4)$$

$$K_{a2} = \frac{[TCH][H^+]}{[TCH_2^+]} \quad (A.1.5)$$

$$K_{a3} = \frac{[TC^-][H^+]}{[TCH]} \quad (A.1.6)$$

La absorbancia total observada en cada caso es igual a la suma de las absorbancias de cada una de las especies presentes:

$$A_T = \varepsilon_1[TCH_3^{+2}] + \varepsilon_2[TCH_2^+] + \varepsilon_3[TCH] + \varepsilon_4[TC^-] \quad (A.1.7)$$

Expresando las concentraciones en equilibrio de  $[TCH_2^*]$ ,  $[TCH]$  y  $[TC^-]$  en función de  $[TCH_3^{+2}]$  empleando las ecuaciones (A.1.4), (A.1.5) y (A.1.6):

$$[TCH_2^*] = \frac{[TCH_3^{+2}] \cdot K_{a1}}{[H^+]} \quad (A.1.8)$$

$$[TCH] = \frac{[TCH_3^{+2}] \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} \quad (A.1.9)$$

$$[TC^-] = \frac{[TCH_3^{+2}] \cdot K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H^+]^3} \quad (A.1.10)$$

Sustituyendo (A.1.8), (A.1.9) y (A.1.10) en la ecuación (A.1.7) y expresando la absorbancia en función de  $[TCH_3^{+2}]$ :

$$A_r = [TCH_3^{+2}] \left( \varepsilon_1 + \varepsilon_2 \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \varepsilon_3 \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} + \varepsilon_4 \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H^+]^3} \right) \quad (A.1.11)$$

La ecuación de balance de masa para  $[TC]_r$  es:

$$[TC]_r = [TCH_3^{+2}] + [TCH_2^*] + [TCH] + [TC^-] \quad (A.1.12)$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.1.8), (A.1.9) y (A.1.10) en la ecuación (A.1.12) y despejando  $[TCH_3^{+2}]$ :

$$[TCH_3^{+2}] = \frac{[TC]_r}{\left( 1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H^+]^3} \right)} \quad (A.1.13)$$

### Cálculo de los pKa's:

Sustituyendo la ecuación (A.1.13) en la ecuación (A.1.11) y abriendo paréntesis:

$$A_r = \frac{\varepsilon_1 \cdot [TC]_r + \frac{\varepsilon_2 \cdot [TC]_r \cdot K_{a1}}{[H^+]} + \frac{\varepsilon_3 \cdot [TC]_r \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{\varepsilon_4 \cdot [TC]_r \cdot K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H^+]^3}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[H^+]^3}} \quad (A.1.14)$$

multiplicando la ecuación (A.1.14) por  $\frac{[H^+]^3}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}$

$$A_T = \frac{\frac{\varepsilon_1 \cdot [TC]_T \cdot [H^+]^3}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_2 \cdot [TC]_T \cdot [H^+]^2}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_3 \cdot [TC]_T \cdot [H^+]}{K_{a3}} + \varepsilon_4 \cdot [TC]_T}{\frac{[H^+]^3}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{[H^+]}{K_{a3}} + 1} \quad (\text{A.1.15})$$

Si:

$$[H^+] = 10^{-pH}, \quad pH = X \quad \Rightarrow \quad [H] = 10^{-X} \quad (\text{A.1.16})$$

Considerando las expresiones de la ecuación (A.1.16) en (A.1.15):

$$A_T = \frac{\frac{\varepsilon_1 \cdot [TC]_T \cdot 10^{-3X}}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_2 \cdot [TC]_T \cdot 10^{-2X}}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{\varepsilon_3 \cdot [TC]_T \cdot 10^{-X}}{K_{a3}} + \varepsilon_4 \cdot [TC]_T}{\frac{10^{-3X}}{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{10^{-2X}}{K_{a2} \cdot K_{a3}} + \frac{10^{-X}}{K_{a3}} + 1} \quad (\text{A.1.17})$$

Expresando la ecuación (A.1.17) para el cálculo de tres  $pK_a$  's:

$$A_T = \frac{a_1 \cdot a_3 \cdot a_4 \cdot P1 \cdot 10^{-3X} + a_5 \cdot a_4 \cdot P1 \cdot 10^{-2X} + P1 \cdot P2 \cdot 10^{-X} + a_2}{a_3 \cdot a_4 \cdot P1 \cdot 10^{-3X} + a_4 \cdot P1 \cdot 10^{-2X} + P1 \cdot 10^{-X} + 1} \quad (\text{A.1.18})$$

donde:

$$a_1 = \varepsilon_1 \cdot [TC]_T \quad (\text{A.1.19})$$

$$a_2 = \varepsilon_4 \cdot [TC]_T \quad (\text{A.1.20})$$

$$a_3 = \frac{1}{K_{a1}} \quad (\text{A.1.21})$$

$$a_4 = \frac{1}{K_{a2}} \quad (\text{A.1.22})$$

$$a_5 = \varepsilon_3 \cdot [TC]_T \quad (\text{A.1.23})$$

$$P1 = \frac{1}{K_{a3}} \quad (\text{A.1.24})$$

$$P2 = \varepsilon_3 \cdot [TC]_T \quad (\text{A.1.25})$$

La ecuación (A.1.17) o bien la ecuación (A.1.18) permiten el cálculo de los tres  $pK_a$ s de la TC. En estas ecuaciones los parámetros  $a_1$  y  $a_2$  son datos de la ecuación ya que corresponden a la absorción observada en los límites de pH's ácidos y básicos, respectivamente. Los otros cinco parámetros fueron obtenidos del ajuste no lineal de las curvas en las Figuras 5.4a-c. Ya que la variación simultánea de cinco parámetros lleva a altos errores, inicialmente se empleó sólo parte de la curva hasta pH 8, donde los términos cuadrático y cúbico en  $[H^+]$  son dominantes en la ecuación (A.1.18) y de esta parte se calculó  $a_3$  y  $a_5$ , los cuales posteriormente se fijaron para buscar sólo tres parámetros en el resto de la curva.

## APENDICE A.2

### ECUACION PARA CALCULAR LA CONSTANTE DE ASOCIACION TUBOCURARINA-LIGANTE POR FLUORESCENCIA

La formación del complejo tubocurarina-ligante con una estequiometría 1:1 esta dada por la siguiente ecuación de equilibrio:



donde: TC = tubocurarina, L = ligante y TC-L = complejo tubocurarina-ligante

La constante de equilibrio para el proceso (A.2.1) es:

$$K = \frac{[TC-L]}{[TC][L]} \Rightarrow [TC-L] = K \cdot [TC][L] \quad (A.2.2)$$

Se escriben las ecuaciones de balance de masa, considerando que  $[TC]_T > [L]_T$ :

$$[TC]_T = [TC] \quad (A.2.3)$$

$$[L]_T = [L] + [TC-L] \quad (A.2.4)$$

donde:  $[L]_T$  = concentración total del ligante.

Sustituyendo en la ecuación (A.2.4) la concentración de  $[TC-L]$  de la ecuación (A.2.2)

$$[L]_T = [L] + K \cdot [TC]_T [L] \quad (A.2.5)$$

Despejando  $[L]$  de la ecuación (A.2.5):

$$[L] = \frac{[L]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} \quad (A.2.6)$$

Si en longitud de onda de estudio la intensidad de fluorescencia observada ( $I_{obs}$ ) resulta solo de la suma de fluorescencia del L y del complejo TC-L:

$$I_{obs} = I_L + I_{TC-L} \quad (A.2.7)$$

$$I_{obs} = i_L [L] + i_{TC-L} [TC-L] \quad (A.2.8)$$

Sustituyendo  $[TC-L]$  y  $TC$  de las ecuaciones (A.2.2) y (A.2.3), respectivamente, en la ecuación (A.2.8):

$$I_{obs} = i_L[L] + i_{TC-L} \cdot K \cdot [TC]_T \cdot [L] \quad (A.2.9)$$

Sustituyendo  $[L]$  de la ecuación (A.2.6) en la ecuación (A.2.9):

$$I_{obs} = \frac{[L]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} (i_L + i_{TC-L} \cdot K \cdot [TC]_T) \quad (A.2.10)$$

Si se considera que  $[TC]_T=0$  en la ecuación (A.2.10):

$$I_{obs} = i_L[L]_T = I_0 \quad (A.2.11)$$

Si se considera que  $[TC]_T \rightarrow \infty$  en la ecuación (A.2.10):

$$I_{obs} = i_{TC-L}[L]_T = I_\infty \quad (A.2.12)$$

Sustituyendo  $I_0$  e  $I_\infty$  de las ecuaciones (A.2.11) y (A.2.12), respectivamente en la ecuación (A.2.10):

$$I_{obs} = \frac{I_0 + I_\infty \cdot K \cdot [TC]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} \quad (A.2.13)$$

Si se analiza el cambio de intensidad de fluorescencia ( $\Delta I$ ) i.e.,  $I_{obs}$  menos la intensidad de fluorescencia de ligante ( $I_L$ ):

$$\Delta I = I_{obs} - I_0 \quad (A.2.14)$$

Sustituyendo la ecuación (A.2.13) en la ecuación (A.2.14):

$$\Delta I = \frac{I_0 + I_\infty \cdot K \cdot [TC]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} - I_0 \quad (A.2.15)$$

$$\Delta I = \frac{(I_\infty - I_0) \cdot K \cdot [TC]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} \quad (A.2.16)$$

Sustituyendo  $I_\infty - I_0 = \Delta I_\infty$  en la ecuación (A.2.16):

$$\Delta I = \frac{\Delta I_\infty \cdot K \cdot [TC]_T}{1 + K \cdot [TC]_T} \quad (A.2.17)$$

Expresando la ecuación (A.2.17) para el ajuste de los datos experimentales:

$$\Delta I = \frac{P1 \cdot X}{1 + P2 \cdot X} \quad (\text{A.2.18})$$

donde:

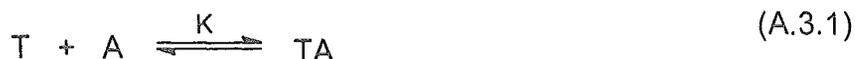
$$P1 = \Delta I_{\infty} \cdot K \quad (\text{A.2.19})$$

$$P2 = K \quad (\text{A.2.20})$$

### APENDICE A.3

#### ECUACION PARA EL CALCULO DE LAS CONSTANTES DE ENLACE TUBOCURARINA-HUESPED POR CONDUCTIVIDAD

Se considera el equilibrio:



donde: T= tubocurarina en forma de su dicloruro, A = especie aniónica en la forma de su sal sódica, TA = complejo tubocurarina-especie aniónica y K = constante de enlace.

#### Caso 1: tubocurarina-monoanion

La conductividad total ( $\kappa$ ) observada en solución para el caso tubocurarina-monoanion, *i.e.*, NaA es:

$$\kappa = \lambda_T C_T + \lambda_{Cl} C_{Cl} + \lambda_{Na} C_{Na} + \lambda_A C_A + \lambda_{TA} C_{TA} \quad (\text{A.3.2})$$

donde:  $\lambda$  es la conductividad molar y  $C$  es la concentración molar de cada una de las especies presentes en el equilibrio.

La constante de enlace para el equilibrio (A.3.1) es:

$$K = \frac{[TA]}{[T][A]} \quad (\text{A.3.3})$$

donde los corchetes [ ] indican las concentraciones en equilibrio.

Despejando [TA] de la ecuación (A.3.3):

$$[TA] = K \cdot [T] \cdot [A] \quad (\text{A.3.4})$$

La concentración de tubocurarina total,  $C_t$  (sólo en este Apéndice para abreviar la simbología) es:

$$C_t = [T] + [TA] \quad (\text{A.3.5})$$

Despejando [TA] de la ecuación (A.3.5):

$$[TA] = C_t - [T] \quad (\text{A.3.6})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.4) en la ecuación (A.3.5.):

$$C_t = [T] + K \cdot [T] \cdot [A] \quad (\text{A.3.7})$$

Si se considera que la  $[T] = [A]$ , para mantener constantes las concentraciones totales en el equilibrio, y ésta se hace igual a  $X$  en la ecuación (A.3.7) se tiene:

$$C_t = X + K \cdot X^2 \quad (\text{A.3.8})$$

Reordenando términos e igualando a cero la ecuación (A.3.8):

$$K \cdot X^2 + X - C_t = 0 \quad (\text{A.3.9})$$

Se divide la ecuación (A.3.9) entre  $K$ :

$$X^2 + \frac{X}{K} - \frac{C_t}{K} = 0 \quad (\text{A.3.10})$$

Se resuelve la ecuación (A.3.10) como una ecuación cuadrática:

$$X = \frac{-\frac{1}{K} + \sqrt{\frac{1}{K^2} + \frac{4 \cdot C_t}{K}}}{2} \quad (\text{A.3.11})$$

Reordenando términos en la ecuación (A.3.11):

$$X = \frac{\sqrt{1 + 4KC_t} - 1}{2K} \quad (\text{A.3.12})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.12) y (A.3.6) en la ecuación (A.3.2):

$$\kappa = \lambda_T \cdot \frac{\sqrt{1 + 4KC_t} - 1}{2K} + 2 \cdot \lambda_{Cl} \cdot C_t + \lambda_{Na} \cdot C_t + \lambda_A \cdot \frac{\sqrt{1 + 4KC_t} - 1}{2K} + \lambda_{TA} \cdot \left( C_t - \frac{\sqrt{1 + 4KC_t} - 1}{2K} \right) \quad (\text{A.3.13})$$

en la ecuación (A.3.13) se ha sustituido  $C_{Na}$  por  $C_t$  (concentración total) ya que la concentración de la sal del monoanion es la misma que la de la tubocurarina y en este caso sólo se tiene un  $\text{Na}^+$  por cada contraion. También en la ecuación (A.3.13) la concentración de  $\text{Cl}^-$ ,  $C_{Cl}$  se sustituye por  $2 C_t$ , el doble de la concentratación total ya que estan enlazados dos iones  $\text{Cl}^-$  a cada molécula de tubocurarina.

Sustituyendo la ecuación de Onsager (A.3.14),

$$\lambda = \lambda^\circ - a_i \sqrt{I} \quad (\text{A.3.14})$$

donde  $\lambda_i$  es la conductividad molar y  $\lambda_i^0$  es la conductividad molar a dilución infinita,  $a_i$  constante de Onsager y  $I$  es la fuerza iónica; en la ecuación (A.3.13) y reagrupando términos:

$$\kappa = \left( \lambda_T^0 + \lambda_A^0 - \lambda_{TA}^0 + (a_{TA} - a_T - a_A)\sqrt{I} \right) \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + \left( 2 \cdot \lambda_{Cl}^0 + \lambda_{Na}^0 + \lambda_{TA}^0 - (2 \cdot a_{Cl} + a_{Na} + a_{TA}) \cdot \sqrt{I} \right) \cdot C_i \quad (\text{A.3.15})$$

Se calcula la fuerza iónica de la mezcla de acuerdo a la ecuación (A.3.16)

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2 \quad (\text{A.3.16})$$

donde  $C_i$  es la concentración y  $Z_i$  es la carga de cada especie presente en solución; así para la mezcla dicloruro de tubocurarina y sal monosódica del anion, se tiene:

$$I = \frac{1}{2} (C_T \cdot 4 + C_A + C_{Cl} + C_{Na}) \quad (\text{A.3.17})$$

Si se sustituye  $C_T$  y  $C_A$  por sus concentraciones en equilibrio,  $X$  y  $C_{Cl}$  y  $C_{Na}$  por sus concentraciones totales  $C_i$  en la ecuación (A.3.17) se tiene:

$$I = \frac{1}{2} (5X + 3C_i) \quad (\text{A.3.18})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.12) en la ecuación (A.3.18) y reagrupando términos:

$$I = \frac{2.5 \cdot (\sqrt{1+4KC_i} - 1 + 3KC_i)}{2 \cdot K} \quad (\text{A.3.19})$$

La conductividad calculada por aditividad  $\kappa_{cal}$ , esta dada por la suma de las conductividades del dicloruro de tubocurarina y de la sal monosódica del anion:

$$\kappa_{cal} = \kappa_{TCl_2} + \kappa_{NaA} \quad (\text{A.3.20})$$

Sustituyendo cada uno de los términos de la ecuación (A.3.20) por su expresión correspondiente de acuerdo a la ecuación de Onsager (A.3.14) se tiene:

$$\kappa_{TCl_2} = \lambda_T^0 \cdot C_T - a_T \sqrt{I} \cdot C_T + \lambda_{Cl}^0 \cdot C_{Cl} - a_{Cl} \sqrt{I} \cdot C_{Cl} \quad (\text{A.3.21})$$

$$\kappa_{NaA} = \lambda_{Na}^0 \cdot C_{Na} - a_{Na} \sqrt{I} \cdot C_{Na} + \lambda_A^0 \cdot C_A - a_A \sqrt{I} \cdot C_A \quad (\text{A.3.22})$$

Calculando la fuerza iónica de cada una de las soluciones anteriores:

$$I = \frac{1}{2}(4 \cdot C_i + 2 \cdot C_i) = 3 \cdot C_i \quad (\text{A.3.23})$$

$$I = \frac{1}{2}(C_i + C_i) = C_i \quad (\text{A.3.24})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.23) en la ecuación (A.3.21) y la ecuación (A.3.24) en la ecuación (A.3.22) y expresando todas las concentraciones en función de  $C_i$ :

$$\kappa_{TC_2} = \lambda_T^0 \cdot C_i - a_T \sqrt{3 \cdot C_i} \cdot C_i + \lambda_{Cl}^0 \cdot 2 \cdot C_i - a_{Cl} \sqrt{3 \cdot C_i} \cdot 2 \cdot C_i \quad (\text{A.3.25})$$

$$\kappa_{TC_2} = (\lambda_T^0 + 2 \cdot \lambda_{Cl}^0) \cdot C_i - (a_T + 2 \cdot a_{Cl}) \sqrt{3 \cdot C_i} \cdot C_i \quad (\text{A.3.26})$$

$$\kappa_{NaA} = \lambda_{Na}^0 \cdot C_i - a_{Na} \sqrt{C_i} \cdot C_i + \lambda_A^0 \cdot C_i - a_A \sqrt{C_i} \cdot C_i \quad (\text{A.3.27})$$

$$\kappa_{NaA} = (\lambda_{Na}^0 + \lambda_A^0) \cdot C_i - (a_{Na} + a_A) \sqrt{C_i} \cdot C_i \quad (\text{A.3.28})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.26) y (A.3.28) en la ecuación (A.3.20) y reagrupando términos:

$$\kappa_{cal} = (\lambda_T^0 + 2 \cdot \lambda_{Cl}^0 + \lambda_{Na}^0 + \lambda_A^0) \cdot C_i - (a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + a_{Na} + a_A) \cdot C_i \sqrt{C_i} \quad (\text{A.3.29})$$

Debido a que en el estudio realizado se analizaron los cambios de conductividad  $\Delta\kappa$ , i.e., conductividad calculada menos conductividad observada:

$$\Delta\kappa = \kappa_{cal} - \kappa \quad (\text{A.3.30})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.29) y (A.3.15) en la ecuación (A.3.30):

$$\begin{aligned} \Delta\kappa = & (\lambda_T^0 + 2 \cdot \lambda_{Cl}^0 + \lambda_{Na}^0 + \lambda_A^0) \cdot C_i - (a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + a_{Na} + a_A) \cdot C_i \sqrt{C_i} - \\ & (\lambda_T^0 + \lambda_A^0 - \lambda_{TA}^0 + (a_{TA} - a_T - a_A) \sqrt{I}) \cdot \frac{\sqrt{1 + 4KC_i} - 1}{2K} - \\ & (2 \cdot \lambda_{Cl}^0 + \lambda_{Na}^0 + \lambda_{TA}^0) \cdot C_i + (2 \cdot a_{Cl} + a_{Na} + a_{TA}) \sqrt{I} \cdot C_i \end{aligned} \quad (\text{A.3.31})$$

Reduciendo y reordenando términos se tiene:

$$\Delta K = (\lambda_T + \lambda_N - \lambda_{TA}) \cdot C_i - (\lambda_T + \lambda_N - \lambda_{TA}) \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} - \quad (A.3.32)$$

$$(a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + a_{Na} + a_A) \cdot C_i \sqrt{C_i} - (a_{TA} - a_T - a_A) \sqrt{I} \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} +$$

$$(2 \cdot a_{Cl} + a_{Na} + a_{TA}) \sqrt{I} \cdot C_i$$

Al cuarto término de la ecuación (A.3.32):

$$a_{TA} - a_T - a_A \quad (A.3.33)$$

se le suma y resta los coeficientes de Onsager del ion cloruro, así:

$$a_{TA} - a_T - a_A + a_{Cl} - a_{Cl} \quad (A.3.34)$$

Reagrupando algunos términos de la ecuación (A.3.32) y (A.3.34) se tiene:

$$C_{TA} = C_i - \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} \quad (A.3.35)$$

$$A_{TCl_2} = a_T + 2 \cdot a_{Cl} \quad (A.3.36)$$

$$A_{NaA} = a_{Na} + a_A \quad (A.3.37)$$

$$A_{NaCl} = a_{Na} + a_{Cl} \quad (A.3.38)$$

$$A_{(TA)Cl} = a_{TA} + a_{Cl} \quad (A.3.39)$$

$$A_{T(ACl)} = a_T + a_A + a_{Cl} \quad (A.3.40)$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.35), (A.3.36), (A.3.37), (A.3.38), (A.3.39) y (A.3.40) en la ecuación (A.3.32) se tiene:

$$\Delta K = (\lambda_T + \lambda_N - \lambda_{TA}) \cdot C_{TA} - (\sqrt{3} \cdot A_{TCl_2} + A_{NaA}) \cdot C_i \sqrt{C_i} - \quad (A.3.41)$$

$$(A_{(TA)Cl} - A_{T(ACl)}) \sqrt{I} \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + (A_{NaCl} + A_{(TA)Cl}) \sqrt{I} \cdot C_i$$

donde  $A_{(TA)Cl}$  y  $A_{T(ACl)}$  corresponden a las constantes de Onsager de los complejos 1:1, (TA)Cl y 1:2, T(ACl). Reagrupando algunos términos de la ecuación (A.3.41):

$$A_j = \lambda_T^0 + \lambda_A^0 - \lambda_{TA}^0 \quad (A.3.42)$$

$$A_2 = A_{NaA} + A_{TCl_2} \cdot \sqrt{3} \quad (\text{A.3.43})$$

$$A_3 = A_{(TA)Cl} - A_{T(A)Cl} \quad (\text{A.3.44})$$

$$A_4 = A_{NaCl} + A_{(TA)Cl} \quad (\text{A.3.45})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.42), (A.3.43), (A.3.44) y (A.3.45) en la ecuación (A.3.41):

$$\Delta\kappa = A_1 \cdot C_{TA} - A_2 \cdot C_i \sqrt{C_i} - A_3 \cdot \sqrt{I} \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + A_4 \sqrt{I} \cdot C_i \quad (\text{A.3.46})$$

Debido a que el término  $A_3$  en la ecuación (A.3.46) corresponde a una diferencia de constantes (A.3.44), se consideró que su diferencia es muy pequeña en comparación a los valores de las constantes  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$  (ver detalles más adelante), por lo que se eliminó el término  $A_3$  para simplificar la ecuación (A.3.46). De esta forma, eliminando el término  $A_3$  y sustituyendo las ecuaciones (A.3.19) y (A.3.35) en la ecuación (A.3.46):

$$\Delta\kappa = A_1 \cdot \left( C_i - \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2 \cdot K} \right) - A_2 \cdot C_i^{3/2} + A_4 \cdot C_i \cdot \frac{2.5 \cdot \sqrt{1+4KC_i} - 1 + 3KC_i}{2 \cdot K} \quad (\text{A.3.47})$$

La ecuación (A.3.47) es la ecuación final empleada para el ajuste de los datos experimentales la mezcla dicloruro de tubocurarina mas sal monosódica del monoanion. Para el empleo de la ecuación (A.3.47) se consideraron dos parámetros de ajuste:  $P1=2K$  y  $P2=A_4$ , en tanto que los términos  $A_1$  y  $A_2$  fueron calculados, ver detalles más adelante.

## Caso 2: tubocurarina-dianion

Para el caso de la mezcla dicloruro de tubocurarina y sal disódica del dianion, *i.e.*,  $Na_2A$ , la conductividad observada esta dada por:

$$\kappa = \lambda_T C_T + \lambda_{Cl} C_{Cl} + \lambda_{Na} C_{Na} + \lambda_A C_A \quad (\text{A.3.48})$$

Ecuación similar a la ecuación (A.3.2) sin embargo en este caso no se incluye la contribución del complejo TA, ya este es neutro y por lo tanto no presenta conductividad. Expresando, en la ecuación (A.3.48), las concentraciones de todas las especies presentes en términos de la concentración total  $C_i$  y de la concentración en equilibrio  $X$  se obtiene la siguiente expresión, análoga a la ecuación (A.3.13):

$$\kappa = \lambda_T \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + 2 \cdot \lambda_{Cl} \cdot C_i + 2 \cdot \lambda_{Na} \cdot C_i + \lambda_A \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} \quad (\text{A.3.49})$$

Sustituyendo la ecuación de Onsager (A.3.14) y reagrupando términos en la ecuación (A.3.49) se obtiene la ecuación (A.3.50), análoga a la ecuación (A.3.15):

$$\kappa = (\lambda_T + \lambda_A - (a_T + a_A)\sqrt{I}) \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + (2 \cdot \lambda_{Cl} + 2 \cdot \lambda_{Na} + (2 \cdot a_{Cl} + 2 \cdot a_{Na}) \cdot \sqrt{I}) \cdot C_i \quad (\text{A.3.50})$$

Calculando la fuerza iónica de la mezcla dicloruro de tubocurarina y sal disódica del dianion por el empleo de la ecuación (A.3.16):

$$I = \frac{1}{2}(C_T \cdot 4 + C_A \cdot 4 + C_{Cl} + C_{Na}) \quad (\text{A.3.51})$$

Si se sustituye  $C_T$  y  $C_A$  por sus concentraciones en equilibrio,  $X$  y  $C_{Cl}$  y  $C_{Na}$  por sus concentraciones totales  $C_i$  en la ecuación (A.3.51) se tiene:

$$I = \frac{1}{2}(8X + 4C_i) \quad (\text{A.3.52})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.12) en la ecuación (A.3.52) y reagrupando términos:

$$I = \frac{2 \cdot (\sqrt{1+4KC_i} - 1 + 2KC_i)}{K} \quad (\text{A.3.53})$$

La conductividad calculada  $\kappa_{cal}$ , esta dada por la suma de las conductividades del dicloruro de tubocurarina y de la sal disódica del dianion:

$$\kappa_{cal} = \kappa_{TCl_2} + \kappa_{Na_2A} \quad (\text{A.3.54})$$

El primer término de la ecuación (A.3.54) es el mismo en ambos tipos de mezclas, *i.e.*, tubocurarina-monoanion y tubocurarina-dianion y esta dado por la expresión (A.3.26). El segundo término de la ecuación (A.3.54) se expresa de acuerdo a la ecuación de Onsager (A.3.14):

$$\kappa_{Na_2A} = 2 \cdot \lambda_{Na} \cdot C_{Na} - 2 \cdot a_{Na} \sqrt{I} \cdot C_{Na} + \lambda_A \cdot C_A - a_A \sqrt{I} \cdot C_A \quad (\text{A.3.55})$$

Calculando la fuerza iónica de la solución de  $Na_2A$  por el empleo de la ecuación (A.3.16) y considerando que la concentración de Na es dos veces la concentración total  $C_i$  y la del dianion es igual a la concentración  $C_i$ :

$$I = \frac{1}{2}(2 \cdot C_i + 4 \cdot C_i) = 3 \cdot C_i \quad (\text{A.3.56})$$

Sustituyendo la ecuación (A.3.56) en la ecuación (A.3.55) y expresando todas las concentraciones en función de  $C_i$ :

$$\kappa_{Na_2A} = 2 \cdot \lambda_{Na}^0 \cdot C_i - 2 \cdot a_{Na} \sqrt{3 \cdot C_i} \cdot C_i + \lambda_A^0 \cdot C_i - a_A \sqrt{3 \cdot C_i} \cdot C_i \quad (\text{A.3.57})$$

Reagrupando términos en la ecuación (A.3.57):

$$\kappa_{Na_2A} = (2 \cdot \lambda_{Na}^0 + \lambda_A^0) \cdot C_i - (2 \cdot a_{Na} \sqrt{3} + a_A \sqrt{3}) \sqrt{C_i} \cdot C_i \quad (\text{A.3.58})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.26) y (A.3.58) en la ecuación (A.3.54) y reagrupando términos:

$$\kappa_{cal} = (\lambda_T + 2 \cdot \lambda_{Cl} + 2 \cdot \lambda_{Na} + \lambda_A) \cdot C_i - (a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Na} \sqrt{3} + a_A \sqrt{3}) \cdot C_i \sqrt{C_i} \quad (\text{A.3.59})$$

En este caso, al igual que en el caso de la mezcla tubocurarina-monoanion se analizaron los cambios de conductividad  $\Delta\kappa$ , de acuerdo a la ecuación (A.3.30). Así sustituyendo las ecuaciones (A.3.59) y (A.3.50) en la ecuación (A.3.30):

$$\begin{aligned} \Delta\kappa = & (\lambda_T + 2 \cdot \lambda_{Cl} + \lambda_{Na} + \lambda_A) \cdot C_i - (a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Na} \sqrt{3} + a_A \sqrt{3}) \cdot C_i \sqrt{C_i} - \\ & (\lambda_T + \lambda_A + (a_T + a_A) \sqrt{I}) \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} - (2 \cdot \lambda_{Cl} + \lambda_{Na}) \cdot C_i + \\ & (2 \cdot a_{Cl} + 2 \cdot a_{Na}) \sqrt{I} \cdot C_i \end{aligned} \quad (\text{A.3.60})$$

Reduciendo y reordenando términos se tiene:

$$\begin{aligned} \Delta\kappa = & (\lambda_T + \lambda_A) \cdot C_i - (\lambda_T + \lambda_A) \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} - \\ & (a_T \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Cl} \sqrt{3} + 2 \cdot a_{Na} \sqrt{3} + a_A \sqrt{3}) \cdot C_i \sqrt{C_i} + \\ & (a_T + a_A) \sqrt{I} \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + (2 \cdot a_{Cl} + 2 \cdot a_{Na}) \sqrt{I} \cdot C_i \end{aligned} \quad (\text{A.3.61})$$

Reagrupando algunos términos de la ecuación (A.3.61) se tiene:

$$A_{Na_2A} = 2 \cdot a_{Na} + a_A \quad (\text{A.3.62})$$

$$A_{TA} = a_T + a_A \quad (\text{A.3.63})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.3.35), (A.3.36), (A.3.38), (A.3.62) y (A.3.63) en la ecuación (A.3.61) y reagrupando términos se tiene:

$$\Delta\kappa = (\lambda_T^0 + \lambda_A^0) \cdot C_{TA} - (A_{TCl_2} + A_{Na_2A}) \cdot \sqrt{3} \cdot C_i \cdot \sqrt{C_i} - A_{TA} \cdot \sqrt{I} \cdot \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2K} + 2 \cdot A_{NaCl} \cdot \sqrt{I} \cdot C_i \quad (\text{A.3.64})$$

Reagrupando algunos términos de la ecuación (A.3.64):

$$A_1 = \lambda_T^0 + \lambda_A^0 \quad (\text{A.3.65})$$

$$A_2 = A_{TCl_2} + A_{Na_2A} \quad (\text{A.3.66})$$

$$A_3 = A_{TA} \quad (\text{A.3.67})$$

$$A_4 = 2 \cdot A_{NaCl} \quad (\text{A.3.68})$$

El término  $A_3 = A_{TA}$  en la ecuación (A.3.64) corresponde a la constante de Onsager para el complejo  $TA$ , complejo neutro que no presenta conductividad y por lo tanto se elimina este término de la ecuación (A.3.64). Así, eliminando los términos asociados a  $A_3$  en la ecuación (A.3.64) y sustituyendo las ecuaciones (A.3.35), (A.3.65), (A.3.66), (A.3.67) y (A.3.68) en la ecuación (A.3.64):

$$\Delta\kappa = A_1 \cdot \left( C_i - \frac{\sqrt{1+4KC_i} - 1}{2 \cdot K} \right) - A_2 \cdot C_i^{3/2} + A_4 \cdot C_i \cdot \frac{2.5 \cdot \sqrt{1+4KC_i} - 1 + 3KC_i}{2 \cdot K} \quad (\text{A.3.69})$$

La ecuación (A.3.69) es la ecuación final empleada para el ajuste de los datos experimentales la mezcla dicloruro de tubocurarina mas sal disódica del dianion. Para el empleo de la ecuación (A.3.69) se consideró un parámetro de ajuste:  $PI=2K$ , en tanto que los términos  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$  fueron calculados, ver detalles más adelante. Esta ecuación es la misma que la obtenida para el caso tubocurarina-monoanion, la diferencia entre los dos sistemas estudiados se encuentra en las constantes  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$ , comparar ecuaciones (A.3.42), (A.3.43) y (A.3.45) del sistema tubocurarina-monoanion con las ecuaciones (A.3.65), (A.3.66) y (A.3.68) para el sistema tubocurarina-dianion.

## Procedimiento de cálculo de las constantes de asociación

1. De las conductividades medidas de la tubocurarina y de la sal de aminoácido estudiado se calcula la conductividad molar  $\lambda$  por el empleo de la ecuación:

$$\lambda = \frac{\text{conductividad medida} \cdot 1000}{[\text{sal}]} \quad (\text{A.3.70})$$

Por el empleo de la ecuación de Onsager (A.3.14) se calcula  $\lambda_0$  y  $a$  para el dicloruro de tubocurarina, para la sal monosódica del monoanion y para la sal disódica del dianion.

2. Se midió la conductividad de 15 soluciones de NaCl en el intervalo de concentraciones  $1 \times 10^{-4}$ – $6 \times 10^{-3}$  M. Para cada una de estas soluciones se calcula las  $\lambda$ 's correspondientes y se grafican vs raíz cuadrada de la fuerza iónica de la solución para obtener, por el empleo de la ecuación (A.3.14) una relación lineal donde, los valores de  $\lambda^0$  y  $a$  para el NaCl son:

$$\lambda^0 = 106.93 \pm 1.84 \quad \text{y} \quad A = -86.8 \pm 35.35 \quad (\text{A.3.71})$$

Los valores reportados [Robinson y Stokes, 1968] de  $\lambda^0$  son:  $\lambda^0$  (NaCl) = 126.35,  $\lambda^0$  (Na<sup>+</sup>) = 50 y  $\lambda^0$  (Cl<sup>-</sup>) = 76.35. El valor experimental de  $\lambda^0$  (NaCl) es 15.37% más bajo que el reportado, el cual podría deberse a errores en la calibración del conductímetro.

3. Se calculan los valores de  $\lambda^0$  (Na<sup>+</sup>) y  $\lambda^0$  (Cl<sup>-</sup>) para este estudio, considerando que éstos son 15.37 % más bajos que los valores reportados. Así los valores correspondientes en este estudio son:

$$\lambda^0 (\text{Na}^+) = 42.7 \quad \text{y} \quad \lambda^0 (\text{Cl}^-) = 64.7 \quad (\text{A.3.72})$$

4. Se calculan los valores de  $\lambda^0$  para las especies iónicas: T<sup>2+</sup>, TA<sup>+</sup>, A<sup>-</sup> y A<sup>2-</sup> de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\lambda^0 (\text{T}^{2+}) = \lambda^0 (\text{TCl}_2) - 2 \cdot \lambda^0 (\text{Cl}^-) = 34.6 \quad (\text{A.3.73})$$

$$\lambda^0 (\text{TA}) = \frac{1}{2} \lambda^0 (\text{T}^{2+}) = 17.3 \quad (\text{A.3.74})$$

$$\lambda^0 (\text{A}^-) = \lambda^0 (\text{NaA}) - \lambda^0 (\text{Na}^+) \quad (\text{A.3.75})$$

$$\lambda^0 (\text{A}^{2-}) = \lambda^0 (\text{Na}_2\text{A}) - 2 \cdot \lambda^0 (\text{Na}^+) \quad (\text{A.3.76})$$

Los valores de  $\lambda^0$  de las especies neutras  $\text{TCl}_2$ ,  $\text{NaA}$  y  $\text{Na}_2\text{A}$  obtenidos por ajuste lineal y los valores de  $\lambda^0$  calculados para las especies aniónicas se muestran en la Tabla A.3.1.

5. Los valores de la constante de Onsager  $A$  empleados para  $\text{NaCl}$  y  $\text{TCl}_2$  fueron:

$$A(\text{NaCl}) = 85 \quad \text{y} \quad A(\text{TCl}_2) = 220 \quad (\text{A.3.77})$$

mientras que los valores de  $A$  para  $\text{NaA}$  y  $\text{Na}_2\text{A}$  para cada una de las especies estudiadas se muestran en la Tabla A.3.1.

6. Empleando los valores de  $\lambda^0$  y  $a$  correspondientes, se calculan los valores de términos  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$  con las ecuaciones (A.3.42), (A.3.43) y (A.3.45) para la interacción tubocurarina-monoanion y, con las ecuaciones (A.3.65), (A.3.66) y (A.3.68) para la interacción tubocurarina-monoanion ver Tabla A.3.1.

7. Las diferencias entre las conductancias calculadas y observadas de las mezclas ( $\Delta\kappa$ ) se grafican vs la concentración total de TC (o huésped) y se ajustan con las ecuaciones (A.3.47) y (A.3.69), empleando como datos los valores calculados de  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$  mostrados en la Tabla A.3.1, correspondientes para cada sal.

**Tabla A.3.1.** Valores de  $\lambda^0$  de las especies neutras y los valores calculados para las especies iónicas y valores calculados de los parámetros  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_4$ <sup>a</sup> para las especies monoaniónicas y dianiónicas.

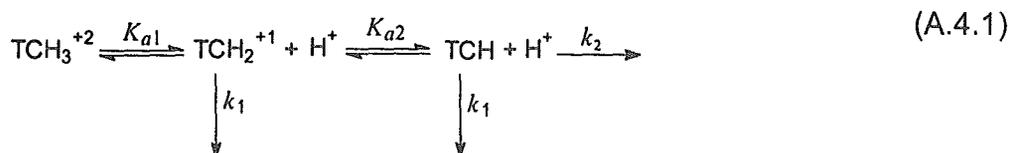
Sustrato $\text{A}^-$	$\lambda^0$ ( $\text{NaA}$ )	$A$ ( $\text{NaA}$ )	$\lambda^0$ ( $\text{A}^-$ )	$A_1$ $\lambda_T^0 + \lambda_A^0 - \lambda_{TA}^0$	$A_2$ $A_{\text{NaA}} + A_{\text{TCl}_2} \sqrt{3}$	$A_4^b$ $A_{\text{NaCl}} + A_{(\text{TA})\text{Cl}}$
Sustrato $\text{A}^{2-}$	$\lambda^0$ ( $\text{Na}_2\text{A}$ )	$A$ ( $\text{Na}_2\text{A}$ )	$\lambda^0$ ( $\text{A}^{2-}$ )	$A_1$ $\lambda_T^0 + \lambda_A^0$	$A_2$ $(A_{\text{NaA}} + A_{\text{TCl}_2}) \sqrt{3}$	$A_4$ $2 A_{\text{NaCl}}$
NADFA	71.6	157.0	28.9	0.0471	0.532	0.17
NADA	67.6	71.0	24.9	0.05	0.446	0.17
APHB	76.0	171.5	33.3	0.067	0.546	0.17
AMHB	72.23	92.0	29.53	0.059	0.467	0.17
AFTL	173.9	301.0	88.5	0.123	0.900	0.17
AISFTL	168.3	71.2	82.9	0.117	0.502	0.17
ATRFTL	203.1	314.2	117.7	0.152	0.922	0.17
AOXAL	205.6	108.8	120.2	0.155	0.567	0.17
AMAL	201.9	280.1	116.5	0.151	0.863	0.17
ASUCC	176.6	124.0	91.2	0.126	0.594	0.17
AGLUT	179.2	186.7	93.8	0.128	0.702	0.17
AADIP	181.6	225.8	96.2	0.131	0.777	0.17

<sup>a</sup> Valores divididos entre 1000. <sup>b</sup> Valor aproximado como  $2 A_{\text{NaCl}}$ .

## APENDICE A.4

### ECUACION PARA EL CALCULO DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE SEGUNDO ORDEN $k_1$ y $k_2$ DE LA REACCION DE HIDROLISIS DEL ACETATO DEL *para*-NITROFENILO POR LA TUBOCURARINA

De acuerdo al siguiente esquema de reacción (A.4.1) se considera que ambos hidroxilos aromáticos desprotonados de la TC reaccionan independientemente:



donde  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$  son las constantes de acidez de los grupos fenólicos asignados a los oxígenos 6 y 2, respectivamente (Figura 2.23) y  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción de los fenolatos correspondientes.

Las constantes de acidez para cada grupo fenilo de los equilibrios mostrados en (A.4.1) están dadas por:

$$K_{a1} = \frac{[\text{TCH}_2^{+1}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{TCH}_3^{+2}]} \tag{A.4.2}$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{TCH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{TCH}_2^{+1}]} \tag{A.4.3}$$

La constante de velocidad observada puede escribirse como:

$$k_{obs} = k_1 \cdot [\text{TCH}_2^{+1}] + (k_1 + k_2) \cdot [\text{TCH}] \tag{A.4.4}$$

Donde  $k_{obs}$  es la constante de pseudo-primer orden. Para expresar la  $k_{obs}$  en términos sólo de las constantes de acidez y las concentración total de la tubocurarina  $[\text{TCH}_2^{+2}]_T$  y de  $\text{H}^+$ , únicas concentraciones conocidas, se emplea la ecuación del balance de masa para la TC :

$$[\text{TCH}_3^{+2}]_T = [\text{TCH}_3^{+2}] + [\text{TCH}_2^{+1}] + [\text{TCH}] \tag{A.4.5}$$

Como puede observarse en la ecuación (A.4.5) no se incluye la concentración en equilibrio de  $\text{TC}^-$  (comparar la ecuación A.4.5 con la ecuación A.1.12 del Apéndice A.1), ya que se está trabajando a pH 9.0 y el siguiente  $pK_a$  de la TC (ver Tabla 5.1) está a 10.3 y por lo tanto la especie  $\text{TC}^-$  no tiene una contribución importante.

Expresando en la ecuación (A.4.5),  $[TCH_3^{+2}]$  y  $[TCH_2^+]$  en función de las constantes de acidez y de la concentración en equilibrio de  $[TCH]$ , ecuaciones (A.4.2) y (A.4.3), respectivamente:

$$[TCH_3^{+2}]_T = \frac{[TCH_2^+] \cdot [H^+]}{K_{a1}} + \frac{[TCH] \cdot [H^+]}{K_{a2}} + [TCH] \quad (A.4.6)$$

$$[TCH_3^{+2}]_T = \frac{[TCH] \cdot [H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \frac{[TCH] \cdot [H^+]}{K_{a2}} + [TCH] \quad (A.4.7)$$

Factorizando  $[TCH]$  en la ecuación (A.4.7):

$$[TCH_3^{+2}]_T = [TCH] \cdot \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} \right) \quad (A.4.8)$$

Despejando  $[TCH]$  de la ecuación (A.4.8)

$$[TCH] = \frac{[TCH_3^{+2}]_T}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \quad (A.4.9)$$

Expresando en la ecuación (A.4.5),  $[TCH_3^{+2}]$  y  $[TCH]$  en función de las constantes de acidez y de concentración en equilibrio de  $[TCH_2^+]$ , ecuaciones (A.4.2) y (A.4.3), respectivamente:

$$[TCH_3^{+2}]_T = \frac{[TCH_2^+] \cdot [H^+]}{K_{a1}} + [TCH_2^+] + \frac{K_{a2}[TCH_2^+]}{[H^+]} \quad (A.4.10)$$

Factorizando  $[TCH_2^+]$  en la ecuación (A.4.7):

$$[TCH_3^{+2}]_T = [TCH_2^+] \cdot \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]} \right) \quad (A.4.11)$$

Despejando  $[TCH_2^+]$  de la ecuación (A.4.11)

$$[TCH_2^+] = \frac{[TCH_3^{+2}]_T}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} \quad (A.4.12)$$

Multiplicando la ecuación (A.4.12) por  $\frac{[H^+]}{K_{a2}}$

$$[TCH_2^*] = \frac{[TCH_3^{*2}]_T \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \quad (\text{A.4.13})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.4.9) y (A.4.13) en la ecuación (A.4.4):

$$k_{\text{obs}} = k_1 \cdot \left( \frac{[TCH_3^{*2}]_T \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \right) + (k_1 + k_2) \cdot \left( \frac{[TCH_3^{*2}]_T}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \right) \quad (\text{A.4.14})$$

$$k_{\text{obs}} = \left( \frac{k_1 \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}} + (k_1 + k_2)}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \right) \cdot [TCH_3^{*2}]_T \quad (\text{A.4.15})$$

Si se define:

$$k_{2,\text{obs}} = \frac{k_{\text{obs}}}{[TCH_3^{*2}]_T} \quad (\text{A.4.16})$$

Sustituyendo (A.4.5) en la ecuación (A.4.6):

$$k_{2,\text{obs}} = \left( \frac{k_1 \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}} + (k_1 + k_2)}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}} \right) \quad (\text{A.4.17})$$

Considerando en la ecuación (A.4.17):

$$[H^+] = 10^{-pH}, \quad pH = X \quad \Rightarrow \quad [H^+] = 10^{-X} \quad (\text{A.4.18})$$

e incluyendo los valores de los  $pK_a$ 's de los fenoles O6 y O2 de la tubocurarina (valores calculados en este trabajo, Tabla 5.1, en la sección, 5.2)  $pK_{a1} = 7.15$ , y  $pK_{a2} = 8.67$ , respectivamente.  $K_{a1} = 6.9 \times 10^{-8}$  y  $K_{a2} = 2.15 \times 10^{-9}$  y sus valores inversos:  $1/K_{a1} = 1.45 \times 10^7$  y  $1/K_{a2} = 4.65 \times 10^8$ :

$$k_{2,obs} = \left( \frac{k_1 \cdot \frac{4.65 \times 10^8}{10^x} + (k_1 + k_2)}{1 + \frac{4.65 \times 10^8}{10^x} + \frac{1.45 \times 10^7}{10^x} \cdot \frac{4.65 \times 10^8}{10^x}} \right) \quad (A.4.19)$$

Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación (A.4.19), con dos parámetros de ajuste:

$$P1 = k_1 + k_2 \quad (A.4.20)$$

$$P2 = k_1 \quad (A.4.21)$$

El parámetro de ajuste  $P2$  proporciona directamente el valor de  $k_1$ , mientras que la combinación de ambos parámetros,  $P1$  y  $P2$  permite el cálculo de  $k_2$ .

## APENDICE A.5

### DESARROLLO DE LA ECUACION DE ESTUDIO DE LA HIDROLISIS DE LOS ESTERES ENANTIOMERICOS DEL *para*-NITROFENILO-N-CARBOBENCIOXI FENILALANINA POR LA TUBOCURARINA

El siguiente esquema de reacción (A.5.1) ilustra el caso más simple de reacciones catalizadas por enzimas [Fersht, 1985]:



donde E se refiere a la enzima, S al sustrato, ES al intermediario (complejo) formado por E y S y P es el producto,  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las constantes de velocidad directa e inversa del equilibrio y  $k_2$  es la constante de velocidad de pseudo-primer orden para la transformación del intermediario ES a P.

Se ha encontrado que no siempre es válido suponer que un sistema catalizado por enzimas está esencialmente en equilibrio con respecto a la formación del complejo enzima-sustrato. Por lo tanto se reemplaza la suposición de equilibrio con la aproximación del estado estacionario, ecuación (A.5.2):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] = 0 \quad (\text{A.5.2})$$

Despejando la concentración del complejo ES

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E] \cdot [S]}{k_{-1} + k_2} = \frac{[E] \cdot [S]}{K_m} \quad (\text{A.5.3})$$

Donde  $K_m$  es la constante de Michaelis:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{A.5.4})$$

En la condición de exceso de E:

$$[E]_r \gg [S]_r \quad (\text{A.5.5})$$

Entonces

$$[E]_r = [E] \quad (\text{A.5.6})$$

y la ecuación del balance de masa para el sustrato es:

$$[S]_r = [S] + [ES] + [P] \quad (\text{A.5.7})$$

Sustituyendo la concentración del complejo ES por la expresión de la (A.5.3):

$$[S]_r = [S] + \frac{[S] \cdot [E]_r}{K_m} + [P] \quad (\text{A.5.8})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.5.8):

$$[S]_r = [S] \cdot \left(1 + \frac{[E]_r}{K_m}\right) + [P] \quad (\text{A.5.9})$$

Despejando [S] de la ecuación (A.5.9):

$$[S] = \frac{[S]_r - [P]}{1 + \frac{[E]_r}{K_m}} \quad (\text{A.5.10})$$

Sustituyendo la ecuación (A.5.10) en la ecuación (A.5.3):

$$[ES] = \frac{[E]_r \cdot ([S]_r - [P])}{K_m + [E]_r} \quad (\text{A.5.11})$$

Reescribiendo la ecuación (A.5.11) como:

$$[ES] = a - b \cdot [P] \quad (\text{A.5.12})$$

Donde:

$$a = \frac{[E]_r \cdot [S]_r}{K_m + [E]_r}; \quad b = \frac{[E]_r}{K_m + [E]_r} \quad (\text{A.5.13})$$

Si se considera que:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (\text{A.5.14})$$

donde  $v$  es la velocidad de reacción.

Sustituyendo la ecuación (A.5.12) en la ecuación (A.5.14):

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot (a - b \cdot [P]) \quad (\text{A.5.15})$$

Separando variables en la ecuación (A.5.15):

$$\frac{d[P]}{a - b \cdot [P]} = k_2 \cdot dt \quad (\text{A.5.16})$$

Integrando la ecuación (A.5.16):

$$\ln(a - b \cdot [P]) = k_2 \cdot bt + \ln a \quad (\text{A.5.17})$$

Rearreglando términos:

$$\ln\left(1 - \frac{b}{a}[P]\right) = -k_2 \cdot bt \quad (\text{A.5.18})$$

Tomando exponenciales en ambos miembros de la ecuación (A.5.18)

$$1 - \frac{b}{a}[P] = e^{-k_2 \cdot bt} \quad (\text{A.5.19})$$

Despejando P de la ecuación (A.5.19):

$$[P] = \frac{a}{b} \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot bt}) \quad (\text{A.5.20})$$

Reemplazando las expresiones de  $a$  y  $b$  de la ecuación (A.5.13) en la ecuación (A.5.20):

$$[P] = [S]_T \cdot (1 - e^{-k_{obs}^c \cdot t}) \quad (\text{A.5.21})$$

donde  $k_{obs}^c$  es la constante catalítica observada y esta dada por la ecuación:

$$k_{obs}^c = \frac{k_2 \cdot [E]_T}{K_m + [E]_T} \quad (\text{A.5.22})$$

Es importante observar que  $K_m$ , la constante de Michaelis, no es general una constante de equilibrio. Sólo cuando  $k_{-1} \gg k_2$  en la ecuación (A.5.4),  $K_m$  puede ser interpretada como una constante de equilibrio, en tales casos es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, ver ecuación (A.5.23):

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_S = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (\text{A.5.23})$$

En el caso de estudio donde la TC sería equivalente a la enzima E y los ésteres enantioméricos del *para*-nitrofenil N-carbobenciloxi-D/L-fenilalanina al sustrato, S;  $k_{-1} \gg$

$k_2$  muy probablemente ya que la TC tiene una reactividad mucho menor que la enzima. Así la ecuación (A.5.22) puede escribirse como:

$$k_{obs}^c = \frac{k_2 \cdot [TC]_T}{K_s + [TC]_T} \quad (A.5.24)$$

y la absorbancia del producto esta definida como:

$$A = \varepsilon_p \cdot [S]_T \cdot (1 - e^{-k_{obs}^c t}) \quad (A.5.25)$$

en tanto que la absorbancia observada  $A_{obs}$  esta dada por:

$$A_{obs} = A_0 + \Delta A_\infty \cdot (1 - e^{-k_{obs}^c t}) \quad (A.5.26)$$

donde  $A_0$  es la absorbancia inicial,  $\Delta A_\infty$  es el cambio de absorbancia al tiempo infinito.

Los datos experimentales de las cinéticas, gráficas de absorbancia vs tiempo fueron ajustados con la ecuación (A.5.26) expresada de la forma:

$$A_{obs} = P1 + P2 \cdot (1 - \exp(-P3 \cdot X)) \quad (A.5.27)$$

donde:

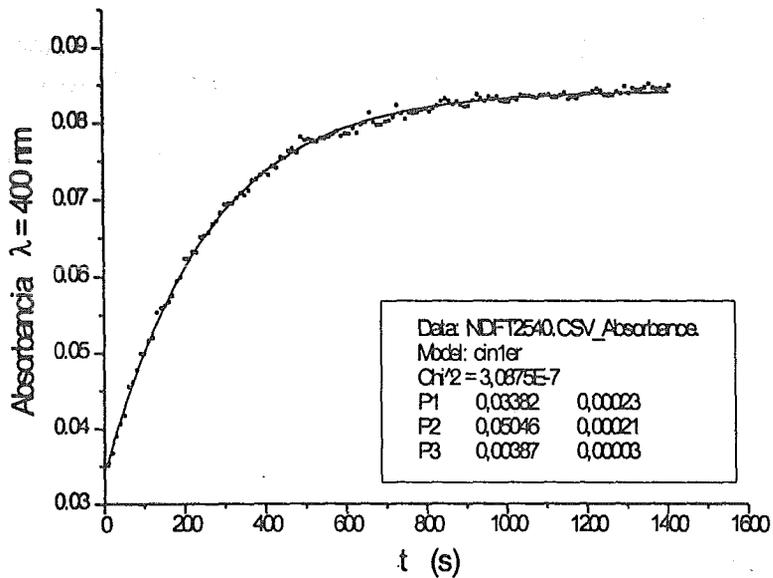
$$P1 = A_0 \quad (A.5.28)$$

$$P2 = \Delta A_\infty \quad (A.5.29)$$

$$P3 = k_{obs}^c \quad (A.5.30)$$

$$X = t \quad (A.5.31)$$

La Figura A.5.1 muestra como ejemplo el ajuste no lineal de los datos obtenidos para la cinética de hidrólisis del *para*-nitrofenilo-N-carbobenciloxi-D-fenilalanina por la TC.



**Figura A.5.1.** Gráfica de absorbancia a  $\lambda=400$  nm vs  $t$  para la cinética de hidrólisis de *para*-nitrofenilo-*N*-carbobenciloxi-*D*-fenilalanina  $4 \times 10^{-6}$  M por la TC  $2.21 \times 10^{-3}$  M a pH 9.0. La línea continua muestra el ajuste no-lineal de los datos experimentales con la ecuación (A.5.26) o bien la ecuación (A.5.27), el recuadro de la gráfica presenta los parámetros de ajuste finales de acuerdo a las ecuaciones (A.5.28) a (A.5.30).

## APENDICE A.6

### ECUACION PARA EL CALCULO DE DOS $pK_a$ 's DE LA RIFAMPICINA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La primera y segunda ionización de la rifampicina pueden expresarse a través de las siguientes reacciones de equilibrio:



donde:

$RH_2^+$  = rifampicina previa a la ionización

$RH$  = rifampicina después de la primera ionización

$R^-$  = rifampicina después de la segunda ionización

$H^+$  = hidrógeno ionizado

Las expresiones de las constantes de acidez para los equilibrios anteriores son:

$$K_{a1} = \frac{[RH][H^+]}{[RH_2^+]} \quad (A.6.3)$$

$$K_{a2} = \frac{[R^-][H^+]}{[RH]} \quad (A.6.4)$$

donde:

$K_{a1}$  = constante de acidez del primera ionización

$K_{a2}$  = constante de acidez del segunda ionización

[ ] = concentración en equilibrio de cada especie

Despejando las concentraciones en equilibrio de  $RH$  y  $R^-$  de las ecuaciones (A.6.3) y (A.6.4):

$$[RH] = \frac{K_{a1} \cdot [RH_2^+]}{[H^+]}, \quad [R^-] = \frac{K_{a2} \cdot [RH]}{[H^+]} \quad (A.6.5)$$

Se escribe la ecuación de balance de masa para la concentración total de rifampicina no ionizada  $[RH_2^+]_T$ :

$$[RH_2^+]_T = [RH_2^+] + [RH] + [R^-] \quad (\text{A.6.6})$$

Se expresa  $[RH_2^+]_T$  en función de la concentración en equilibrio de  $RH_2^+$ , sustituyendo las expresiones de la ecuación (A.6.5) en la ecuación (A.6.6):

$$[RH_2^+]_T = [RH_2^+] + \frac{K_{a1} \cdot [RH_2^+]}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [RH_2^+]}{[H^+] \cdot [H^+]} \quad (\text{A.6.7})$$

Reagrupando términos:

$$[RH_2^+]_T = [RH_2^+] \cdot \left( 1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} \right) \quad (\text{A.6.8})$$

Despejando  $RH_2^+$ :

$$[RH_2^+] = \frac{[RH_2^+]_T}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}} \quad (\text{A.6.9})$$

La absorbancia total ( $A_T$ ), es igual a la suma de las absorbancias de cada una de las especies presentes:

$$A_T = A_{RH_2^+} + A_{RH} + A_{R^-} \quad (\text{A.6.10})$$

$$A_T = \varepsilon_{RH_2^+} \cdot [RH_2^+] + \varepsilon_{RH} \cdot [RH] + \varepsilon_{R^-} \cdot [R^-] \quad (\text{A.6.11})$$

Expresando  $RH$  y  $R^-$  en función de  $RH_2^+$ , empleando las expresiones de la ecuación (A.6.5):

$$A_T = \varepsilon_{RH_2^+} \cdot [RH_2^+] + \frac{\varepsilon_{RH} \cdot K_{a1} \cdot [RH_2^+]}{[H^+]} + \frac{\varepsilon_{R^-} \cdot K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [RH_2^+]}{[H^+] \cdot [H^+]} \quad (\text{A.6.12})$$

Reagrupando términos:

$$A_T = [RH_2^+] \cdot \left( \varepsilon_{RH_2^+} + \frac{\varepsilon_{RH} \cdot K_{a1}}{[H^+]} + \frac{\varepsilon_{R^-} \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} \right) \quad (\text{A.6.13})$$

Sustituyendo la ecuación (A.6.9) en la ecuación (A.6.13):

$$A_T = \frac{[RH_2^+]_T}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}} \cdot \left( \varepsilon_{RH_2^+} + \frac{\varepsilon_{RH} \cdot K_{a1}}{[H^+]} + \frac{\varepsilon_{R^-} \cdot K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2} \right) \quad (\text{A.6.14})$$

Abriendo el paréntesis:

$$A_T = \frac{\varepsilon_{RH_1^+} \cdot [RH_1^+]_T + \varepsilon_{RH} \cdot [RH_1^+]_T \cdot \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \varepsilon_R \cdot [RH_1^+]_T \cdot \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}} \quad (\text{A.6.15})$$

Multiplicando la ecuación (A.6.15) por  $\frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}}$ :

$$A_T = \frac{\varepsilon_{RH_1^+} \cdot [RH_1^+]_T \cdot \frac{[H^+]^2}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \varepsilon_{RH} \cdot [RH_1^+]_T \cdot \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \varepsilon_R \cdot [RH_1^+]_T}{\frac{[H^+]}{K_{a1} \cdot K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1} \quad (\text{A.6.16})$$

Expresando la ecuación (A.6.16) para el ajuste de los datos experimentales:

$$A_T = \frac{\frac{P1}{10^{2x}} \cdot \frac{P2 \cdot P3}{1} + \frac{P4}{10^x} \cdot \frac{P3}{1} + P5}{1 + \frac{10^x \cdot P3}{1} + \frac{10^{2x} \cdot P2 \cdot P3}{1}} \quad (\text{A.6.17})$$

donde:

$$10^{-2x} = [H^+]^2 = 10^{-2pH} \quad (\text{A.6.18})$$

$$10^{-x} = [H^+] = 10^{-pH} \quad (\text{A.6.19})$$

$$P1 = \varepsilon_{RH_1^+} \cdot [RH_1^+]_T \quad (\text{A.6.20})$$

$$P4 = \varepsilon_{RH} \cdot [RH_1^+]_T \quad (\text{A.6.21})$$

$$P5 = \varepsilon_R \cdot [RH_1^+]_T \quad (\text{A.6.22})$$

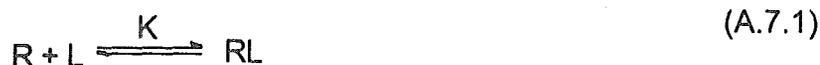
$$P2 = K_{a1} \quad (\text{A.6.23})$$

$$P3 = K_{a2} \quad (\text{A.6.24})$$

## APENDICE A.7

### ECUACION PARA EL CALCULO DE LA CONSTANTE DE ENLACE RIFAMPICINA-SUSTRATO POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La formación de un complejo rifampicina-ligante con una estequiometría 1:1 esta dada por la siguiente ecuación de equilibrio:



donde:  $R$  = rifampicina,  $L$  = ligante,  $RL$  = complejo rifampicina-ligante

La constante de equilibrio para el proceso (A.7.1) es:

$$K = \frac{[RL]}{[R][L]} \Rightarrow [RL] = K \cdot [R] \cdot [L] \quad (\text{A.7.2})$$

Se escriben las ecuaciones de balance de masa, considerando que  $[L] > [R]$ .

$$[R]_T = [R] + [RL] \quad (\text{A.7.3})$$

$$[L]_T = [L] \quad (\text{A.7.4})$$

$$[R]_T = [R] + K \cdot [R] \cdot [L] \quad (\text{A.7.5})$$

Se expresan las concentraciones de  $R$  y  $RL$  en función de  $R_T$  y  $L$ , concentraciones conocidas:

$$[R]_T = [R] \cdot (1 + K \cdot [L]) \Rightarrow [R] = \frac{[R]_T}{1 + K \cdot [L]} \quad [RL] = \frac{K \cdot [R]_T \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad (\text{A.7.6})$$

donde:

$[R]_T$  = concentración total de R

$[L]_T$  = concentración total de L

La absorbancia observada ( $A_{obs}$ ), es igual a la suma de las absorbancias de cada una de las especies presentes

$$A_{obs} = A_R + A_{RL} + A_L \quad (\text{A.7.7})$$

$$A_{obs} = \varepsilon_R \cdot [R] + \varepsilon_{RL} \cdot [RL] + \varepsilon_L \cdot [L] \quad (\text{A.7.8})$$

Se sustituyen las concentraciones de las especies  $R$ ,  $RL$  y  $L$ , empleando la ecuación (A.7.6)

$$A_{obs} = \varepsilon_R \cdot \left( \frac{[R]_T}{1 + K \cdot [L]} \right) + \varepsilon_{RL} \cdot \left( \frac{K \cdot [R]_T \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \right) + \varepsilon_L \cdot [L] \quad (\text{A.7.9})$$

Reagrupando términos:

$$A_{obs} = \left( \frac{\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \right) \cdot R_T + \varepsilon_L \cdot [L] \quad (\text{A.7.10})$$

Si se analiza el cambio de absorbancia ( $\Delta A$ ), i.e.,  $A_{obs}$  menos la absorbancia del ligante ( $A_L$ ):

$$\Delta A = A_{obs} - A_L \quad (\text{A.7.11})$$

Sustituyendo la ecuación (A.7.10) en la ecuación (A.7.11) y expresando  $A_L$  en función de la concentración de  $L$ :

$$\Delta A = \left( \frac{\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \right) \cdot R_T + \varepsilon_L \cdot [L] - \varepsilon_L \cdot [L] \quad (\text{A.7.12})$$

$$\Delta A = \left( \frac{\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \right) \cdot R_T \quad (\text{A.7.13})$$

Considerando (ver sección 7.2.1.1 para una descripción detallada del procedimiento experimental):

$V_0$  = volumen inicial en la celda = 2.5 ml

$\Delta V$  = cambios de volumen = 0.05 ml

$X$  = número de adiciones = 0, 1, ... 10

$[R]_{0,s}$  = concentración inicial de rifampicina en el experimento =  $2.0 \times 10^{-5}$  M

$[L]_0$  = concentración inicial del ligante, el cual se adiciona a la celda =  $1.0 \times 10^{-2}$  M (generalmente)

La concentración total de  $R$  después de cada adición puede expresarse como:

$$[R]_T = \frac{[R]_{0,s} \cdot V_0}{V_0 + \Delta V \cdot X} \quad (\text{A.7.14})$$

la concentración del L después de cada adición puede expresarse como:

$$[L] = \frac{[L]_0 \cdot \Delta V \cdot X}{V_0 + \Delta V \cdot X} \quad (\text{A.7.15})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.7.14) y (A.7.15) en la ecuación (A.7.13):

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot \frac{[L]_0 \cdot \Delta V \cdot X}{V_0 + \Delta V \cdot X}}{1 + K \cdot \frac{[L]_0 \cdot \Delta V \cdot X}{V_0 + \Delta V \cdot X}} \cdot \frac{[R]_{0,s} \cdot V_0}{V_0 + \Delta V \cdot X} \quad (\text{A.7.16})$$

Multiplicando la ecuación (A.7.16) por  $V_0 + \Delta V \cdot X$ :

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R \cdot (V_0 + \Delta V \cdot X) + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]_0 \cdot \Delta V \cdot X}{V_0 + \Delta V \cdot X + K \cdot [L]_0 \cdot \Delta V \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s} \cdot V_0}{V_0 + \Delta V \cdot X} \quad (\text{A.7.17})$$

Sustituyendo  $V_0 = 2.5$  y  $\Delta V = 0.05$  en la ecuación (A.7.17)

$$\Delta A = \frac{2.5 \cdot \varepsilon_R + (\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]_0) \cdot 0.05 \cdot X}{2.5 + (1 + K \cdot [L]_0) \cdot 0.05 \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s} \cdot 2.5}{2.5 + 0.05 \cdot X} \quad (\text{A.7.18})$$

Dividiendo la ecuación (A.7.18) entre 2.5:

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R + (\varepsilon_R + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]_0) \cdot 0.02 \cdot X}{1 + 0.02 \cdot (1 + K \cdot [L]_0) \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (\text{A.7.19})$$

Expresando la ecuación (A.7.19) para ajustar los datos experimentales:

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R + (\varepsilon_R + P1 \cdot [L]_0) \cdot 0.02 \cdot X}{1 + 0.02 \cdot (1 + P2 \cdot [L]_0) \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (\text{A.7.20})$$

La ecuación (A.7.20) es una ecuación con dos parámetros de ajuste, donde:

$$P1 = \varepsilon_R \cdot K \quad (\text{A.7.21})$$

$$P2 = K \quad (\text{A.7.22})$$

Para ajustar los datos experimentales,  $\Delta A$  se calcula de la siguiente manera. En la ecuación (A.7.11) se expresa  $A_L$  en función de la concentración de  $L$ , empleando la ecuación (A.7.15):

$$\Delta A = A_{obs} - \frac{\varepsilon_L \cdot [L]_0 \cdot \Delta V \cdot X}{V_0 + \Delta V \cdot X} \quad (\text{A.7.23})$$

Sustituyendo  $V_0 = 2.5$  y  $\Delta V = 0.05$  en la ecuación (A.7.23):

$$\Delta A = A_{obs} - \frac{\varepsilon_L \cdot [L]_0 \cdot 0.05 \cdot X}{2.5 + 0.05 \cdot X} \quad (\text{A.7.24})$$

Dividiendo la ecuación (A.7.24) entre 0.05:

$$\Delta A = A_{obs} - \frac{\varepsilon_L \cdot [L]_0 \cdot X}{50 + X} \quad (\text{A.7.25})$$

Para determinar  $\Delta A$  debido solo al efecto de dilución, es decir, en ausencia del ligante, se considera que  $[L] = 0$  en la ecuación (A.7.19) se tiene:

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R + \varepsilon_R \cdot 0.02 \cdot X}{1 + 0.02 \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (\text{A.7.26})$$

Reagrupando términos:

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R \cdot (1 + 0.02 \cdot X)}{1 + 0.02 \cdot X} \cdot \frac{[R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (\text{A.7.27})$$

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R \cdot [R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X} \quad (\text{A.7.28})$$

Otra forma de analizar los datos experimentales consiste en:

rearreglar la ecuación (A.7.19):

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R \cdot [R]_{0,s} + \varepsilon_R \cdot 0.002 \cdot X \cdot [R]_{0,s} + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]_0 \cdot 0.002 \cdot X \cdot [R]_{0,s}}{(1 + 0.02 \cdot (1 + K \cdot [L]_0) \cdot X) \cdot (1 + 0.02 \cdot X)} \quad (\text{A.7.29})$$

dividir la ecuación (A.7.29) entre  $\frac{\varepsilon_R [R]_{0,s}}{1 + 0.02 \cdot X}$  y reducir términos:

$$\Delta A = \frac{\varepsilon_R \cdot [R]_{0,s} + \varepsilon_R \cdot 0.02 \cdot X \cdot [R]_{0,s} + \varepsilon_{RL} \cdot K \cdot [L]_0 \cdot 0.02 \cdot X \cdot [R]_{0,s}}{(1 + 0.02 \cdot (1 + K \cdot [L]_0) \cdot X) \cdot \varepsilon_R \cdot [R]_{0,s}} \quad (\text{A.7.30})$$

factorizando en el numerador  $\varepsilon_R [R]_{0,s}$

$$\Delta A = \frac{\left(1 + 0.02 \cdot X + \frac{\varepsilon_{RL}}{\varepsilon_R} K \cdot [L]_0 \cdot 0.02 \cdot X\right) \cdot \varepsilon_R \cdot [R]_{0,s}}{(1 + 0.02 \cdot (1 + K \cdot [L]_0) \cdot X) \cdot \varepsilon_R \cdot [R]_{0,s}} \quad (\text{A.7.31})$$

reduciendo términos y reorganizando la ecuación (A.7.31)

$$\Delta A = \frac{1 + \left(0.02 + \frac{\varepsilon_{RL}}{\varepsilon_R} \cdot K \cdot [L]_0 \cdot 0.02\right) \cdot X}{1 + (0.02 + 0.02 \cdot K \cdot [L]_0) \cdot X} \quad (\text{A.7.32})$$

Expresando la ecuación (A.7.32) para el ajuste de los datos experimentales:

$$\Delta A = \frac{1 + P1 \cdot X}{1 + P2 \cdot X} \quad (\text{A.7.33})$$

donde:

$$P1 = 0.02 \cdot \left(\frac{\varepsilon_{RL}}{\varepsilon_R}\right) \cdot K \cdot L_0 \cdot 0.02 \quad (\text{A.7.34})$$

$$P2 = 0.02 \cdot (1 + K \cdot L_0) \quad \Rightarrow \quad K = \frac{\frac{P2}{0.02} - 1}{L_0} \quad (\text{A.7.35})$$

## APENDICE A.8

### ECUACION PARA EL CALCULO DE UN $pK_a$ DE LA RIFAMPICINA A PARTIR DE ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA

Se considera el siguiente equilibrio que involucra una sola ionización de la rifampicina (R):



donde RD se refiere a la rifampicina deuterada y  $D^+$  al ion deuterio y  $K_a$  es la constante de acidez para el N4 del anillo de piperazina de la rifampicina (ver Tabla 2.4 y Figura 2.26).

El desplazamiento químico observado  $\delta_{\text{obs}}$  esta dado por:

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{RD} \cdot \alpha_{RD} + \delta_{R^-} \cdot \alpha_{R^-} \quad (\text{A.8.2})$$

donde  $\delta$  es el desplazamiento químico de la especie indicada, estos desplazamientos químicos están ponderados en la ecuación (A.8.2) por las fracciones molares  $\alpha$  de la especie correspondiente, de acuerdo a:

$$\alpha_{RD} = \frac{[RD]}{[RD]_t} \quad (\text{A.8.3})$$

$$\alpha_{R^-} = \frac{[R^-]}{[RD]_t} \quad (\text{A.8.4})$$

La constante de acidez para el equilibrio mostrado en (A.8.1) esta dada por:

$$K_a = \frac{[R^-] \cdot [D^+]}{[RD]} \quad (\text{A.8.5})$$

La ecuación para el balance de masa de la rifampicina esta dado por:

$$[RD]_t = [RD] + [R^-] \quad (\text{A.8.6})$$

Despejando [R] de la ecuación (A.8.5):

$$[R^-] = \frac{K_a \cdot [RD]}{[D^+]} \quad (\text{A.8.7})$$

Sustituyendo la ecuación (A.8.7) en la ecuación (A.8.6):

$$[RD]_T = [RD] + \frac{K_a \cdot [RD]}{[D^+]} \quad (\text{A.8.8})$$

Factorizando [RD] en la ecuación (A.8.8):

$$[RD]_T = [RD] \cdot \left(1 + \frac{K_a}{[D^+]}\right) \quad (\text{A.8.9})$$

Despejando [RD] en la ecuación (A.8.9):

$$[RD] = \frac{[RD]_T}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}} \quad (\text{A.8.10})$$

Sustituyendo la ecuación (A.8.10) en la ecuación (A.8.3):

$$\alpha_{RD} = \frac{\frac{[RD]_T}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}}}{[RD]_T} \quad (\text{A.8.11})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.8.11):

$$\alpha_{RD} = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}} \quad (\text{A.8.12})$$

Despejando [RD] de la ecuación (A.8.5):

$$[RD] = \frac{[R^-] \cdot [D^+]}{K_a} \quad (\text{A.8.13})$$

Sustituyendo la ecuación (A.8.13) en la ecuación (A.8.6):

$$[RD]_T = \frac{[R^-] \cdot [D^+]}{K_a} + [R^-] \quad (\text{A.8.14})$$

Factorizando [R] en la ecuación (A.8.14):

$$[RD]_T = [R^-] \cdot \left(1 + \frac{[D^+]}{K_a}\right) \quad (\text{A.8.15})$$

Despejando [R] en la ecuación (A.8.15):

$$[R^-] = \frac{[RD]_T}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} \quad (\text{A.8.16})$$

Multiplicando la ecuación (A.8.16) por  $\frac{K_a}{[D^+]}$ :

$$[R^-] = \frac{[RD]_T \cdot \frac{K_a}{[D^+]}}{\left(1 + \frac{[D^+]}{K_a}\right) \cdot \frac{K_a}{[D^+]}} \quad (\text{A.8.17})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.8.17):

$$[R^-] = \frac{[RD]_T \cdot \frac{K_a}{[D^+]}}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}} \quad (\text{A.8.18})$$

Sustituyendo la ecuación (A.8.18) en la ecuación (A.8.3):

$$\alpha_{R^-} = \frac{\frac{[RD]_T \cdot \frac{K_a}{[D^+]}}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}}}{[RD]_T} \quad (\text{A.8.19})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.8.19):

$$\alpha_{R^-} = \frac{\frac{K_a}{[D^+]}}{1 + \frac{K_a}{[D^+]}} \quad (\text{A.8.20})$$

Multiplicando las ecuaciones (A.8.12) y (A.8.20) por  $\frac{[D^+]}{K_a}$  y reorganizando términos se tiene:

$$\alpha_{RD} = \frac{\frac{[D^+]}{K_a}}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} \quad (\text{A.8.21})$$

$$\alpha_{R^-} = \frac{1}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} \quad (\text{A.8.22})$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.8.21) y (A.8.22) en la ecuación (A.8.2)

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{RD} \cdot \frac{\frac{[D^+]}{K_a}}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} + \delta_{R^-} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} \quad (\text{A.8.23})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.8.23):

$$\delta_{\text{obs}} = \frac{\delta_{RD} \cdot \frac{[D^+]}{K_a} + \delta_{R^-}}{1 + \frac{[D^+]}{K_a}} \quad (\text{A.8.24})$$

Considerando en la ecuación (A.8.24):

$$[D^+] = 10^{-pD}, \quad pD = X \quad \Rightarrow \quad [D^+] = 10^{-X} \quad (\text{A.8.25})$$

se obtiene:

$$\delta_{\text{obs}} = \frac{\delta_{RD} \cdot \frac{1}{K_a} \cdot \frac{1}{10^X} + \delta_{R^-}}{1 + \frac{1}{K_a} \cdot \frac{1}{10^X}} \quad (\text{A.8.26})$$

Rearreglando términos en la ecuación (A.8.26):

$$\delta_{\text{obs}} = \frac{\delta_{R^-} + \frac{\delta_{RD}}{K_a \cdot 10^x}}{1 + \frac{1}{K_a \cdot 10^x}} \quad (\text{A.8.27})$$

Para el ajuste de los datos experimentales se consideraron tres parámetros en la ecuación (A.8.27):

$$P1 = \delta_R \quad (\text{A.8.28})$$

$$P2 = \delta_{R^-} \quad (\text{A.8.29})$$

$$P3 = K_a \quad (\text{A.8.30})$$

Así el parámetro de ajuste  $P3$  proporciona directamente el valor de  $K_a$ , y se obtiene el valor del  $\text{p}K_a$  de la rifampicina por la aplicación de la relación  $\log (1/ K_a)$ .

## APENDICE B

### TABLAS QUE PRESENTAN LOS DATOS OBTENIDOS POR LAS DIFERENTES TECNICAS EXPERIMENTALES PARA EL CALCULO DE LAS CONSTANTES DE ASOCIACION DE LAS ESPECIES TC-HUESPED Y DE LOS $pK_a$ 'S DE LA TC

**Tabla B.1.** Cambio de intensidad de fluorescencia de ANS ( $\lambda_{exc} = 367$  nm y  $\lambda_{em} = 515$  nm) en la interacción TC-ANS,  $[ANS]=2 \times 10^{-6}$  M.

[TC] (M)	$\Delta I$ (cps)
$1.0 \times 10^{-5}$	2500
$2.0 \times 10^{-5}$	2500
$3.0 \times 10^{-5}$	6600
$5.0 \times 10^{-5}$	9000
$1.0 \times 10^{-4}$	16500
$1.5 \times 10^{-4}$	23200
$2.0 \times 10^{-4}$	28800

**Tabla B.2.** Cambio de intensidad de fluorescencia de TC ( $\lambda_{exc} = 280$  nm y  $\lambda_{em} = 339$  nm) en la interacción TC-NADA,  $[TC]=1 \times 10^{-5}$  M.

[NADA] (M)	$\Delta I$ (cps)
$3.0 \times 10^{-3}$	6729.995
$4.0 \times 10^{-3}$	18289.994
$5.0 \times 10^{-3}$	23679.994
$6.0 \times 10^{-3}$	53229.992
$7.0 \times 10^{-3}$	11949.994
$9.0 \times 10^{-3}$	6939.995
$1.0 \times 10^{-2}$	40679.992
$2.0 \times 10^{-2}$	28449.994
$2.5 \times 10^{-2}$	50729.992
$3.0 \times 10^{-2}$	38149.992

**Tabla B.3.** Cambio de intensidad de fluorescencia de TC ( $\lambda_{exc} = 280$  nm y  $\lambda_{em} = 307$  nm) en la interacción TC-NALA,  $[TC]=1 \times 10^{-5}$  M.

[NALA] (M)	$\Delta I$ (cps)
$5.0 \times 10^{-3}$	42089
$1.0 \times 10^{-2}$	77070
$1.5 \times 10^{-2}$	92340
$2.0 \times 10^{-2}$	142100
$2.5 \times 10^{-2}$	153710
$3.0 \times 10^{-2}$	236770
$3.5 \times 10^{-2}$	236540

**Tabla B.4.** Cambio de intensidad de fluorescencia de TC ( $\lambda_{exc} = 280$  nm y  $\lambda_{em} = 314$  nm) en la interacción TC-NADFA,  $[TC]=1 \times 10^{-5}$  M.

[NADFA] (M)	$\Delta I$ (cps)
$5.0 \times 10^{-4}$	3800
$1.0 \times 10^{-3}$	14000
$2.0 \times 10^{-3}$	24500
$3.0 \times 10^{-3}$	23500
$4.0 \times 10^{-3}$	35800
$5.0 \times 10^{-3}$	37500

**Tabla B.5.** Cambio de intensidad de fluorescencia de TC ( $\lambda_{exc} = 280$  nm y  $\lambda_{em} = 307$  nm) en la interacción TC-NALFA,  $[TC]=1 \times 10^{-5}$  M.

[NALFA] (M)	$\Delta I$ (cps)
$5.0 \times 10^{-4}$	5500
$1.0 \times 10^{-3}$	9800
$2.0 \times 10^{-3}$	22400
$3.0 \times 10^{-3}$	38200
$4.0 \times 10^{-3}$	33300
$1.0 \times 10^{-3}$	40000

**Tabla B.6.** Conductividad de la TC, NADA y de la mezcla TC-NADA a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	NADA	TC-NADA calculada	TC-NADA observada	Diferencia calc-obs
$5.0 \times 10^{-4}$	83.0	32.0	115.0	106.0	9.0
$1.0 \times 10^{-3}$	158.5	65.0	223.5	223.5	0.0
$1.5 \times 10^{-3}$	228.5	96.5	325.0	313.5	11.5
$2.0 \times 10^{-3}$	318.5	126.5	445.0	418.5	26.5
$3.0 \times 10^{-3}$	458.5	186.0	644.5	611.0	33.5

**Tabla B.7.** Conductividad de la TC, NALA y de la mezcla TC-NALA a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	NALA	TC-NALA calculada	TC-NALA observada	Diferencia calc-obs
$5.0 \times 10^{-4}$	78.5	31.0	109.5	110.0	-0.5
$1.0 \times 10^{-3}$	150.25	64.0	214.25	209.5	4.75
$1.5 \times 10^{-3}$	228.5	91.0	319.5	301.0	18.5
$2.0 \times 10^{-3}$	288.5	120.5	409.0	411.0	-2.0
$3.0 \times 10^{-3}$	423.5	183.5	607.0	588.5	18.5

**Tabla B.8.** Conductividad de la TC, NADFA y de la mezcla TC-NADFA a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	NADFA	TC-NADFA calculada	TC-NADFA observada	Diferencia calc-obs
$5.0 \times 10^{-4}$	74.44	31.44	105.88	101.94	3.94
$1.0 \times 10^{-3}$	144.94	63.44	208.38	195.94	12.44
$1.5 \times 10^{-3}$	209.94	96.94	306.88	286.44	20.44
$2.0 \times 10^{-3}$	278.94	126.44	405.38	366.44	38.94
$3.0 \times 10^{-3}$	453.94	173.94	627.88	558.94	68.94

**Tabla B.9.** Conductividad de la TC, NALFA y de la mezcla TC-NALFA a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	NALFA	TC-NALFA calculada	TC-NALFA observada	Diferencia calc-obs
$5.0 \times 10^{-4}$	70.5	29.0	99.5	98.5	1.0
$1.0 \times 10^{-3}$	142.0	55.5	197.5	195.25	2.25
$1.5 \times 10^{-3}$	212.5	85.0	297.5	279.0	18.5
$2.0 \times 10^{-3}$	274.0	115.0	389.0	381.5	7.5
$3.0 \times 10^{-3}$	396.5	170.0	566.5	569.0	-2.5

**Tabla B.10. Conductividad de la TC, AMHB y de la mezcla TC-AMHB a pH 7.0.**

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AMHB	TC-AMHB calculada	TC-AMHB observada	Diferencia calc-obs
$7.0 \times 10^{-4}$	105.65	47.15	152.80	145.15	7.65
$1.0 \times 10^{-3}$	149.65	69.15	218.80	207.65	11.15
$1.5 \times 10^{-3}$	221.35	102.15	323.50	304.15	19.35
$2.0 \times 10^{-3}$	284.15	138.15	422.30	404.15	18.15
$2.5 \times 10^{-3}$	356.65	169.15	525.80	509.15	16.65
$3.0 \times 10^{-3}$	419.15	199.15	618.30	579.15	39.15

**Tabla B.11. Conductividad de la TC, APHB y de la mezcla TC-APHB a pH 7.0.**

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	APHB	TC-APHB calculada	TC-APHB observada	Diferencia calc-obs
$1.0 \times 10^{-4}$	15.45	8.55	24.00	22.45	1.55
$3.0 \times 10^{-4}$	48.45	21.45	69.90	70.45	-0.55
$5.0 \times 10^{-4}$	75.95	36.45	112.40	107.45	4.95
$7.0 \times 10^{-4}$	106.95	49.95	156.90	150.70	6.20
$1.0 \times 10^{-3}$	151.95	65.95	217.90	213.95	3.95
$1.5 \times 10^{-3}$	212.95	96.95	309.90	298.95	10.95
$2.0 \times 10^{-3}$	283.95	134.95	418.90	403.95	14.95
$2.5 \times 10^{-3}$	353.95	166.45	520.40	493.95	26.45
$3.0 \times 10^{-3}$	433.95	190.50	624.45	593.95	30.50

**Tabla B.12. Conductividad de la TC, AFTL y de la mezcla TC-AFTL a pH 7.0.**

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AFTL	TC-AFTL calculada	TC-AFTL observada	Diferencia calc-obs
$1.0 \times 10^{-4}$	16.724	18.3	35.024	33.146	1.878
$3.0 \times 10^{-4}$	47.044	49.11	96.154	89.846	6.308
$5.0 \times 10^{-4}$	79.344	79.61	158.954	155.046	3.908
$7.0 \times 10^{-4}$	106.744	111.36	218.104	212.746	5.358
$1.0 \times 10^{-3}$	149.344	158.46	307.804	296.746	11.058
$1.5 \times 10^{-3}$	224.944	231.8	456.744	446.746	9.998
$2.0 \times 10^{-3}$	296.944	309.8	606.744	575.746	30.998
$2.5 \times 10^{-3}$	355.944	378.8	734.744	708.746	25.998
$3.0 \times 10^{-3}$	429.944	463.8	893.744	838.746	54.998
$3.0 \times 10^{-3}$	452.275	413.022	865.297	842.06	23.237
$3.52 \times 10^{-3}$	513.275	484.022	997.297	970.06	27.237
$4.0 \times 10^{-3}$	574.275	568.022	1142.297	1106.06	36.237
$4.52 \times 10^{-3}$	659.275	620.022	1279.297	1279.06	0.237
$5.0 \times 10^{-3}$	739.275	671.022	1410.297	1330.06	80.237
$5.52 \times 10^{-3}$	822.275	759.022	1581.297	1489.06	92.237
$6.0 \times 10^{-3}$	858.275	807.022	1665.297	1646.06	19.237

**Tabla B.13.** Conductividad de la TC, AISFT y de la mezcla TC-AISFTL a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AISFTL	TC-AISFTL calculada	TC-AISFTL observada	Diferencia calc-obs
$1.0 \times 10^{-4}$	16.388	18.784	35.172	35.066	0.106
$3.0 \times 10^{-4}$	46.858	50.634	97.492	89.866	7.626
$5.0 \times 10^{-4}$	78.658	83.434	162.092	164.666	-2.574
$7.0 \times 10^{-4}$	112.658	118.234	230.892	210.066	20.826
$1.0 \times 10^{-3}$	154.458	161.934	316.392	309.066	7.326
$1.5 \times 10^{-3}$	222.758	244.934	467.692	449.066	18.626
$2.0 \times 10^{-3}$	301.758	325.934	627.692	601.066	26.626
$2.5 \times 10^{-3}$	375.758	409.934	785.692	734.066	51.626
$3.0 \times 10^{-3}$	440.758	482.934	923.692	851.066	72.626

**Tabla B.14.** Conductividad de la TC, ATRFTL y de la mezcla TC-ATRFTL a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	ATRFTL	TC-ATRFTL calculada	TC-ATRFTL observada	Diferencia calc-obs
$1.0 \times 10^{-4}$	19.494	21.084	40.578	36.67	3.908
$3.0 \times 10^{-4}$	54.094	61.684	115.778	107.57	8.208
$5.0 \times 10^{-4}$	92.194	92.784	184.978	166.87	18.108
$7.0 \times 10^{-4}$	121.694	122.884	244.578	228.07	16.508
$1.0 \times 10^{-3}$	171.794	181.184	352.978	318.07	34.908
$1.5 \times 10^{-3}$	253.094	263.184	516.278	461.07	55.208
$2.0 \times 10^{-3}$	340.094	349.184	689.278	607.07	82.208
$2.5 \times 10^{-3}$	400.094	421.184	821.278	739.07	82.208
$3.0 \times 10^{-3}$	479.094	512.184	991.278	869.07	122.208

**Tabla B.15.** Conductividad de la TC, AFA y de la mezcla TC-AFA a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AFA	TC-AFA calculada	TC-AFA observada	Diferencia calc-obs
$7.0 \times 10^{-4}$	106.10	45.10	151.20	147.10	4.10
$1.0 \times 10^{-3}$	146.10	65.60	211.70	199.10	12.60
$1.5 \times 10^{-3}$	207.60	96.10	303.70	291.60	12.10
$2.0 \times 10^{-3}$	279.80	121.60	401.40	411.60	-10.20
$2.5 \times 10^{-3}$	349.10	152.85	501.95	504.10	-2.15
$3.0 \times 10^{-3}$	409.10	181.10	590.20	591.60	-1.40

**Tabla B.16.** Conductividad de la TC, AOXAL y de la mezcla TC-AOXAL a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AOXAL	TC-AOXAL calculada	TC-AOXAL observada	Diferencia calc-obs
$1.0 \times 10^{-4}$	16.21	20.6	36.81	36.697	0.113
$3.0 \times 10^{-4}$	53.6	64.9	118.5	107.797	10.703
$5.0 \times 10^{-4}$	76.8	103.2	180.0	179.597	0.403
$7.0 \times 10^{-4}$	105.1	147.5	252.6	244.897	7.703
$1.0 \times 10^{-3}$	149.4	199.5	348.9	340.897	8.003
$1.5 \times 10^{-3}$	226.8	295.5	522.3	503.897	18.403
$2.0 \times 10^{-3}$	292.8	392.5	685.3	657.897	27.403
$2.5 \times 10^{-3}$	361.8	485.5	847.3	817.897	29.403
$3.0 \times 10^{-3}$	427.8	587.5	1015.3	977.897	37.403

**Tabla B.17.** Conductividad de la TC, AMAL y de la mezcla TC-AMAL a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AMAL	TC-AMAL calculada	TC-AMAL observada	Diferencia calc - obs
$1.0 \times 10^{-4}$	16.21	20.879	37.089	33.52	3.569
$3.0 \times 10^{-4}$	53.6	60.979	114.579	96.82	17.759
$5.0 \times 10^{-4}$	76.8	92.079	168.879	168.72	0.159
$7.0 \times 10^{-4}$	105.1	135.079	240.179	227.02	13.159
$1.0 \times 10^{-3}$	149.4	185.679	335.079	322.02	13.059
$1.5 \times 10^{-3}$	226.8	271.979	498.779	465.02	33.759
$2.0 \times 10^{-3}$	292.8	358.979	651.779	603.02	48.759
$2.5 \times 10^{-3}$	361.8	443.979	805.779	751.02	54.759
$3.0 \times 10^{-3}$	427.8	529.979	957.779	883.02	74.759

**Tabla B.18.** Conductividad de la TC, ASUCC y de la mezcla TC-ASUCC a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	ASUCC	TC-ASUCC calculada	TC-ASUCC observada	Diferencia calc - obs
$1.0 \times 10^{-4}$	20.636	20.0	40.636	29.845	10.791
$3.0 \times 10^{-4}$	47.636	53.9	101.536	101.245	0.291
$5.0 \times 10^{-4}$	81.536	84.6	166.136	161.145	4.991
$7.0 \times 10^{-4}$	110.136	121.7	231.836	223.045	8.791
$1.0 \times 10^{-3}$	155.638	179.5	335.138	313.045	22.093
$1.5 \times 10^{-3}$	226.936	253.0	479.936	463.045	16.891
$2.0 \times 10^{-3}$	305.936	346.0	651.936	611.045	40.891
$2.5 \times 10^{-3}$	388.936	421.0	809.936	740.045	69.891
$3.0 \times 10^{-3}$	424.936	497.0	921.936	879.045	42.891

**Tabla B.19.** Conductividad de la TC, AGLUT y de la mezcla TC-AGLUT a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AGLUT	TC-AGLUT calculada	TC-AGLUT observada	Diferencia calc - obs
$1.0 \times 10^{-4}$	20.42	16.849	37.269	34.038	3.231
$3.0 \times 10^{-4}$	48.72	50.299	99.019	95.638	3.381
$5.0 \times 10^{-4}$	80.72	87.299	168.019	166.338	1.681
$7.0 \times 10^{-4}$	109.52	115.699	225.219	218.038	7.181
$1.0 \times 10^{-3}$	152.92	172.099	325.019	317.038	7.981
$1.5 \times 10^{-3}$	223.12	245.599	468.719	452.038	16.681
$2.0 \times 10^{-3}$	295.12	330.599	625.719	609.038	16.681
$2.5 \times 10^{-3}$	365.12	411.599	776.719	739.038	37.681
$3.0 \times 10^{-3}$	437.12	480.599	917.719	891.038	26.681

**Tabla B.20.** Conductividad de la TC, AADIP y de la mezcla TC-AADIP a pH 7.0.

Concentración (M)	Conductividad ( $\mu$ mho)				
	TC	AADIP	TC-AADIP calculada	TC-AADIP observada	Diferencia calc - obs
$1.0 \times 10^{-4}$	20.42	20.494	40.914	32.305	8.609
$3.0 \times 10^{-4}$	48.72	49.094	97.814	95.705	2.109
$5.0 \times 10^{-4}$	80.72	88.794	169.514	156.005	13.509
$7.0 \times 10^{-4}$	109.52	118.594	228.114	214.805	13.309
$1.0 \times 10^{-3}$	152.92	171.094	324.014	305.805	18.209
$1.5 \times 10^{-3}$	223.12	247.894	471.014	442.805	28.209
$2.0 \times 10^{-3}$	295.12	331.894	627.014	589.805	37.209
$2.5 \times 10^{-3}$	365.12	401.894	767.014	709.805	57.209
$3.0 \times 10^{-3}$	437.12	480.894	918.014	854.805	63.209

**Tabla B.21.** Conductividad de TC y NADFA, para el cálculo de la estequiometría del complejo TC-NADFA por el método de Job.

[TC] (M)	[NADFA] (M)	$f_{\text{NADFA}}$	Conductividad (mho)		
			observada	calculada <sup>a</sup>	Diferencia obs - calc
$5.0 \times 10^{-3}$	0.0	0.0	0.00069	0.00070	$-1.5 \times 10^{-8}$
$4.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	0.2	0.00061	0.00062	$-3.0115 \times 10^{-6}$
$3.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	0.4	0.00053	0.00054	$-1 \times 10^{-5}$
$2.5 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3}$	0.5	0.00049	0.00050	$-1 \times 10^{-5}$
$2.0 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-3}$	0.6	0.00047	0.00046	$3.985 \times 10^{-6}$
$1.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	0.8	0.00038	0.00039	$-1 \times 10^{-5}$
0.0	$5.0 \times 10^{-3}$	1.0	0.00031	0.00031	$-1.5 \times 10^{-8}$

<sup>a</sup> La conductividad se calculó por un ajuste lineal empleando la ecuación  $Y = A + BX$ , donde A es el valor de la conductividad de la TC libre, B es la diferencia de la conductividad de la TC libre menos la conductividad de NADFA libre y X es la fracción molar de NADFA.

**Tabla B.22.** Conductividad de TC y APHB, para el cálculo de la estequiometría del complejo TC-APHB por el método de Job.

[TC] (M)	[APHB] (M)	$f_{\text{APHB}}$	Conductividad (mho)		
			observada	calculada <sup>a</sup>	Diferencia obs - calc
$5.0 \times 10^{-3}$	0.0	0.0	0.00071	0.00071	$-1 \times 10^{-8}$
$4.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	0.2	0.00063	0.00064	$-5.39 \times 10^{-6}$
$3.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	0.4	0.00055	0.00056	$-2 \times 10^{-5}$
$2.5 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3}$	0.5	0.00052	0.00053	$-5.49 \times 10^{-6}$
$2.0 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-3}$	0.6	0.00048	0.00049	$-1 \times 10^{-5}$
$1.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	0.8	0.00041	0.00042	$-5.59 \times 10^{-6}$
0.0	$5.0 \times 10^{-3}$	1.0	0.00035	0.00035	$-1 \times 10^{-8}$

<sup>a</sup> La conductividad se calculó por un ajuste lineal empleando la ecuación  $Y = A + BX$ , donde A es el valor de la conductividad de la TC libre, B es la diferencia de la conductividad de la TC libre menos la conductividad de APHB libre y X es la fracción molar de APHB.

**Tabla B.23.** Conductividad de TC y ATRFTL, para el cálculo de la estequiometría del complejo TC-ATRFTL por el método de Job.

[TC] (M)	[ATRFTL] (M)	$f_{\text{ATRFTL}}$	Conductividad (mho)		
			observada	calculada <sup>a</sup>	Diferencia obs - calc
$5.0 \times 10^{-3}$	0.0	0.0	0.00072	0.00072	$-1.05 \times 10^{-7}$
$4.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	0.2	0.00070	0.00074	$-3 \times 10^{-5}$
$3.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	0.4	0.00071	0.00075	$-4 \times 10^{-5}$
$2.5 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3}$	0.5	0.00071	0.00076	$-5 \times 10^{-5}$
$2.0 \times 10^{-3}$	$3.0 \times 10^{-3}$	0.6	0.00072	0.00076	$-4 \times 10^{-5}$
$1.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	0.8	0.00075	0.00078	$-3 \times 10^{-5}$
0.0	$5.0 \times 10^{-3}$	1.0	0.00079	0.00079	$-1.05 \times 10^{-7}$

<sup>a</sup> La conductividad se calculó por un ajuste lineal empleando la ecuación  $Y = A + BX$ , donde A es el valor de la conductividad de la TC libre, B es la diferencia de la conductividad de la TC libre menos la conductividad de ATRFTL libre y X es la fracción molar de ATRFTL.

**Tabla B.24.** Desplazamiento químico y cambio de desplazamiento químico inducidos por el AB en los protones H1, H16 y H36a<sup>a</sup> de la TC como función de la concentración del AB,  $[\text{TC}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}^a$ .

[AB] (M)	H1		H16		H36a	
	$\delta_{\text{TC}}$	$\Delta\delta$	$\delta_{\text{TC}}$	$\Delta\delta$	$\delta_{\text{TC}}$	$\Delta\delta$
0	2.762	0	6.600	0	2.807	0
$9.10 \times 10^{-4}$	2.744	-0.018	6.581	-0.019	2.785	-0.022
$1.70 \times 10^{-3}$	2.728	-0.034	6.566	-0.035	2.781	-0.026
$2.86 \times 10^{-3}$	2.713	-0.049	6.551	-0.049	2.770	-0.037

<sup>a</sup> Ver en la Figura 2.23 la numeración de protones.

**Tabla B.25.** Desplazamiento químico y cambio de desplazamiento químico inducidos por el AS en los protones H18a, H18b y H16a<sup>a</sup> de la TC como función de la concentración del AS, [TC] = 5x10<sup>-4</sup> M<sup>a</sup>.

[AS] (M)	H18a		H18b		H16a	
	$\delta_{TC}$	$\Delta\delta$	$\delta_{TC}$	$\Delta\delta$	$\delta_{TC}$	$\Delta\delta$
0	2.941	0	2.977	0	6.600	0
2.00 x 10 <sup>-4</sup>	2.938	-0.003	2.974	-0.003	6.598	-0.002
3.90 x 10 <sup>-4</sup>	2.933	-0.008	2.967	-0.010	6.593	-0.007
5.70 x 10 <sup>-4</sup>	2.929	-0.012	2.965	-0.012	6.591	-0.009
2.06 x 10 <sup>-3</sup>	2.903	-0.038	2.940	-0.037	6.568	-0.032
2.65 x 10 <sup>-3</sup>	2.891	-0.050	2.927	-0.050	6.556	-0.044
3.15 x 10 <sup>-3</sup>	2.881	-0.060	2.920	-0.057	6.555	-0.045
3.98 x 10 <sup>-3</sup>	2.876	-0.065	2.910	-0.067	6.539	-0.061

<sup>a</sup> Ver en la Figura 2.23 la numeración de protones.

**Tabla B.26.** Desplazamiento químico y cambio de desplazamiento químico inducidos por el AMHB en los protones H1 y H16a<sup>a</sup> de la TC como función de la concentración del AMHB, [TC] = 5x10<sup>-4</sup> M<sup>a</sup>.

[AMHB] (M)	H1		H16a	
	$\delta_{TC}$	$\Delta\delta$	$\delta_{TC}$	$\Delta\delta$
0	2.762	0	6.600	0
4.80 x 10 <sup>-4</sup>	2.741	-0.021	6.584	-0.016
9.10 x 10 <sup>-4</sup>	2.719	-0.043	6.567	-0.033
1.30 x 10 <sup>-3</sup>	2.702	-0.060	6.556	-0.044
1.70 x 10 <sup>-3</sup>	2.686	-0.076	6.545	-0.055

<sup>a</sup> Ver en la Figura 2.23 la numeración de protones.

**Tabla B.27.** Desplazamiento químico y cambio de desplazamiento químico inducidos por el APHB en el protón H16b<sup>a</sup> de la TC como función de la concentración del APHB, [TC] = 1x10<sup>-3</sup> M<sup>a</sup>.

[APHB] (M)	$\delta_{TC}$ H16b (ppm)	$\Delta\delta$ ( $\delta_{TC} - \delta_{TC-APHB}$ ) (ppm)
0	6.661	0
5.30 x 10 <sup>-4</sup>	6.650	-0.011
1.00 x 10 <sup>-3</sup>	6.646	-0.015
1.43 x 10 <sup>-3</sup>	6.642	-0.019
2.17 x 10 <sup>-3</sup>	6.633	-0.028
2.80 x 10 <sup>-3</sup>	6.628	-0.033

<sup>a</sup> Ver en la Figura 2.23 la numeración de protones.

**Tabla B.28.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's como resultado de la titulación de la TC con NaOH 2.0 M, [TC] =  $3.57 \times 10^{-5}$  M.

pH	$\lambda = 254$ nm	$\lambda = 290$ nm	$\lambda = 298$ nm
4.00	0.1367	0.2922	0.0176
4.31	0.1420	0.2968	0.0230
4.61	0.1421	0.2968	0.0232
4.91	0.1433	0.2976	0.0243
5.22	0.1422	0.2972	0.0242
5.46	0.1220	0.2763	0.0075
5.52	0.1425	0.2973	0.0248
5.81	0.1452	0.2990	0.0273
6.00	0.1477	0.3007	0.0295
6.03	0.1276	0.2822	0.0101
6.50	0.1436	0.2921	0.0230
7.00	0.1680	0.3052	0.0404
7.30	0.1965	0.3176	0.0611
7.63	0.2582	0.3484	0.1069
7.94	0.3510	0.3940	0.1752
8.20	0.4546	0.4447	0.2506
8.50	0.5885	0.5099	0.3483
8.80	0.7367	0.5827	0.4559
9.10	0.8721	0.6466	0.5528
9.40	0.9858	0.7002	0.6324
9.70	1.0750	0.7396	0.6938
10.01	1.1390	0.7675	0.7378
10.32	1.1920	0.7980	0.7766
10.60	1.2060	0.8012	0.7847
10.89	1.2170	0.8039	0.7906
11.10	1.2210	0.8047	0.7927

**Tabla B.29.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's como resultado de la retitulación de la TC con HCl 4.0 M, [TC] =  $3.57 \times 10^{-5}$  M.

pH	$\lambda = 254$ nm	$\lambda = 290$ nm	$\lambda = 298$ nm
10.95	1.2250	0.8164	0.8010
9.94	1.1690	0.7923	0.7617
9.00	0.8884	0.6636	0.5662
7.91	0.3931	0.4201	0.2050
6.99	0.2110	0.3322	0.0724
5.99	0.1702	0.3097	0.0421
5.00	0.1657	0.3066	0.0384
3.98	0.1657	0.3068	0.0390

## APENDICE C

### TABLAS QUE PRESENTAN LOS DATOS OBTENIDOS DE LAS DIFERENTES TECNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES TC-HUESPED A pH 9.0 EMPLEADOS PARA EL CALCULO DE LAS CONSTANTES DE ENLACE CORRESPONDIENTES

**Tabla C.1.** Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para TC y la mezcla TC-ANS a pH 9.0, [ANS] =  $5 \times 10^{-6}$  M.

[TC] (M)	$\lambda = 490 \text{ nm}$		$\lambda = 516 \text{ nm}$		$\lambda = 540 \text{ nm}$	
	$I_{TC}$	$I_{TC-ANS}$	$I_{TC}$	$I_{TC-ANS}$	$I_{TC}$	$I_{TC-ANS}$
0	0	4397.778	0	5450.555	0	4492.222
$2.0 \times 10^{-4}$	195.000	5901.111	148.3333	6582.222	83.88889	5282.222
$3.9 \times 10^{-4}$	446.1111	7411.111	310.5555	7907.222	190.5555	6132.222
$5.7 \times 10^{-4}$	569.4445	8642.777	400.5555	9182.222	207.2222	7177.222
$7.4 \times 10^{-4}$	789.4445	10179.44	420.5555	10045.55	270.5555	7815.555
$9.1 \times 10^{-4}$	909.4444	11467.78	590.55555	11228.89	305.5555	8145.555
$1.07 \times 10^{-4}$	1049.444	12724.44	603.8889	12045.55	343.8889	8988.889
$1.23 \times 10^{-3}$	1322.778	13619.44	773.8889	13065.56	385.5555	9592.222
$1.38 \times 10^{-3}$	1549.444	15369.44	857.2222	13625.56	475.5555	9390.556
$1.53 \times 10^{-3}$	1669.444	16539.44	1003.889	14368.89	558.8889	10078.89
$1.67 \times 10^{-3}$	1869.444	18297.78	1078.889	15753.89	535.5555	10795.55
$1.8 \times 10^{-3}$	2246.111	18732.78	1220.556	16037.22	663.8889	10878.89
$1.94 \times 10^{-3}$	1961.111	18641.11	1157.222	15753.89	625.5555	10803.89
0	0	5123.333	0	5815.0	0	5070
$2.06 \times 10^{-3}$	1625	25133.332	905	20288.332	515	13456.666
$2.19 \times 10^{-3}$	1880	26868.332	1155	21996.666	623.333	14378.333
$2.31 \times 10^{-3}$	2078.333	28299.998	1105	22938.332	663.333	14778.333
$2.42 \times 10^{-3}$	2205.00	29748.332	1283.333	23068.332	735.0	15286.666
$2.54 \times 10^{-3}$	2526.667	31305	1326.667	24893.332	795	15868.333
$2.65 \times 10^{-3}$	3346.667	32851.664	1651.667	25276.666	990	15706.666
$2.75 \times 10^{-3}$	3200	35143.332	1770	26296.666	943.333	16369.999
$2.86 \times 10^{-3}$	3465	35245.00	2060	26448.332	1073.333	16548.332

**Tabla C.2.** Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para NADFA y la mezcla TC-NADFA a pH 9.0,  $[TC] = 1.17 \times 10^{-5}$  M.

[NADFA] (M)	$\lambda = 337$ nm		$\lambda = 363$ nm		$\lambda = 389$ nm	
	$I_{NADFA}$	$I_{TC-NADFA}$	$I_{NADFA}$	$I_{TC-NADFA}$	$I_{NADFA}$	$I_{TC-NADFA}$
0	0	1935.458	0	2676.723	0	1936.749
$1.12 \times 10^{-4}$	140.265	1909.625	193.000	2755.527	120.603	1952.812
$2.19 \times 10^{-4}$	174.001	1859.751	321.806	2615.969	216.490	1859.477
$4.04 \times 10^{-4}$	155.252	1735.721	246.448	2457.753	217.675	1777.143
$5.14 \times 10^{-4}$	309.769	1782.383	362.452	2526.087	331.432	1859.964
$7.05 \times 10^{-4}$	221.227	1669.691	295.166	2157.460	233.665	1643.992
$1.05 \times 10^{-3}$	491.940	1766.369	552.981	2306.353	382.587	1820.630
$1.09 \times 10^{-3}$	361.858	1937.689	404.120	2532.354	259.691	1839.884
$2.14 \times 10^{-3}$	496.313	1878.134	491.784	2394.927	337.656	1838.502
$3.14 \times 10^{-3}$	742.565	2164.521	696.068	2610.837	581.176	1993.251
$4.10 \times 10^{-3}$	943.919	2221.626	810.057	2690.470	739.168	2001.907
$5.01 \times 10^{-3}$	1018.785	2342.427	957.842	2830.558	762.905	2109.420

**Tabla C.3.** Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para DFAME y la mezcla TC-DFAME a pH 9.0,  $[TC] = 1.17 \times 10^{-5}$  M.

[DFAME] (M)	$\lambda = 337$ nm		$\lambda = 363$ nm		$\lambda = 389$ nm	
	$I_{DFAME}$	$I_{TC-DFAME}$	$I_{DFAME}$	$I_{TC-DFAME}$	$I_{DFAME}$	$I_{TC-DFAME}$
0	0	2189.713	0	2911.651	813.532	2236.897
$1.12 \times 10^{-4}$	106.520	2058.084	138.130	2742.190	91.8467	2088.204
$2.19 \times 10^{-4}$	127.022	2257.565	168.773	2831.960	118.609	2137.858
$4.04 \times 10^{-4}$	269.675	2009.064	279.558	2778.000	256.581	1932.619
$5.14 \times 10^{-4}$	223.613	2167.435	269.491	2847.778	204.945	2196.580
$7.05 \times 10^{-4}$	367.075	1973.634	391.996	2573.424	306.433	1917.205
$1.05 \times 10^{-3}$	663.684	2140.701	582.941	2679.980	444.153	2066.632
$1.08 \times 10^{-3}$	353.597	2004.422	352.926	2547.546	288.775	1963.911
$2.12 \times 10^{-3}$	296.726	2181.938	284.964	2628.326	182.652	1962.421
$3.11 \times 10^{-3}$	500.157	2208.547	424.300	2606.052	299.280	2016.073
$4.05 \times 10^{-3}$	531.500	2562.518	431.563	2995.538	430.698	2691.021
$5.11 \times 10^{-3}$	852.856	2247.700	745.766	3022.391	560.309	2411.758

**Tabla C.4.** Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para LFAME y la mezcla TC-LFAME a pH 9.0,  $[TC] = 1.17 \times 10^{-5}$  M.

[LFAME] (M)	$\lambda = 337$ nm		$\lambda = 363$ nm		$\lambda = 389$ nm	
	$I_{LFAME}$	$I_{TC-LFAME}$	$I_{LFAME}$	$I_{TC-LFAME}$	$I_{LFAME}$	$I_{TC-LFAME}$
0	0	1808.272	0	2845.310	0	2257.005
$1.12 \times 10^{-4}$	250.311	2352.654	263.406	2612.907	207.223	2095.717
$2.19 \times 10^{-4}$	63.3379	2002.957	116.821	2507.388	95.3675	1937.597
$4.04 \times 10^{-4}$	200.443	1979.110	166.012	2571.095	100.576	2133.429
$5.14 \times 10^{-4}$	185.065	1939.661	234.746	2406.085	167.718	1794.355
$7.05 \times 10^{-4}$	236.068	1924.439	243.564	2145.915	219.221	1707.309
$1.05 \times 10^{-3}$	316.726	1745.968	288.919	2639.572	247.427	2089.847
$1.08 \times 10^{-3}$	160.134	2117.114	127.597	2696.734	158.750	1908.974
$2.12 \times 10^{-3}$	219.101	2009.844	214.670	2674.435	118.059	1980.608
$3.11 \times 10^{-3}$	499.102	2247.512	397.558	2558.516	294.116	2109.200
$4.05 \times 10^{-3}$	483.434	2200.513	368.798	2416.226	296.679	2023.924
$5.11 \times 10^{-3}$	608.362	2206.055	424.843	2422.448	332.691	1984.869

**Tabla C.5.** Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para NADFA y las mezclas ANS-NADFA y TC-ANS-NADFA a pH 9.0,  $[TC] = 9.1 \times 10^{-4}$  M y  $[ANS] = 5.04 \times 10^{-6}$  M.

[NADFA] (M)	$\lambda = 500$ nm			$\lambda = 516$ nm		
	$I_{NADFA}$	$I_{ANS-NADFA}$	$I_{TC-ANS-NADFA}$	$I_{NADFA}$	$I_{ANS-NADFA}$	$I_{TC-ANS-NADFA}$
0	0	4462.617	12002.770	0	4859.250	11272.330
$8 \times 10^{-5}$	86.2789	4604.632	11613.362	49.3498	5019.535	10951.682
$1.6 \times 10^{-4}$	135.892	4515.279	10657.876	88.9249	5046.690	9999.696
$3.1 \times 10^{-4}$	176.324	4550.0	10159.786	134.292	5003.333	9803.963
$5.8 \times 10^{-4}$	308.730	4479.272	9691.795	194.371	4640.952	9300.241
$7.6 \times 10^{-4}$	159.524	4921.225	10706.692	148.106	5429.309	10209.953
$1.5 \times 10^{-3}$	269.706	4789.968	10294.974	230.629	5194.985	9966.550
$2.91 \times 10^{-3}$	355.475	4817.675	9671.556	369.482	5162.187	9154.821
$5.48 \times 10^{-3}$	651.494	4912.403	9276.329	625.595	5137.542	8891.487
$2.14 \times 10^{-3}$	201.989	4865.115	10051.745	129.027	5198.450	9750.834
$4.22 \times 10^{-3}$	362.641	4937.791	10047.839	278.647	5314.148	9549.427
$8.17 \times 10^{-3}$	623.942	4991.415	9386.424	438.148	5206.593	8920.752
$1.54 \times 10^{-2}$	1363.426	5480.581	9325.562	876.538	5474.634	8805.850

Tabla C.5. (Continuación).

[NADFA] (M)	$\lambda = 540 \text{ nm}$		
	$I_{\text{NADFA}}$	$I_{\text{ANS-NADFA}}$	$I_{\text{TC-ANS-NADFA}}$
0		4324.088	8203.938
$8 \times 10^{-5}$	11.1254	4336.363	7871.841
$1.6 \times 10^{-4}$	37.6926	4300.534	7574.000
$3.1 \times 10^{-4}$	71.3227	4133.333	7344.435
$5.8 \times 10^{-4}$	124.622	4071.131	7128.068
$7.6 \times 10^{-4}$	130.044	4724.986	7705.615
$1.5 \times 10^{-3}$	263.556	4635.328	7686.042
$2.91 \times 10^{-3}$	462.745	4597.738	7102.017
$5.48 \times 10^{-3}$	796.898	4611.831	6908.008
$2.14 \times 10^{-3}$	90.3787	4507.842	7285.734
$4.22 \times 10^{-3}$	164.594	4463.477	7222.380
$8.17 \times 10^{-3}$	271.637	4430.223	6591.527
$1.54 \times 10^{-2}$	466.670	4517.131	6557.464

Tabla C.6. Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para NALFA y las mezclas ANS-NALFA y TC-ANS-NALFA a pH 9.0, [TC] =  $9.1 \times 10^{-4}$  M y [ANS] =  $5.04 \times 10^{-6}$  M.

[NALFA] (M)	$\lambda = 500 \text{ nm}$			$\lambda = 516 \text{ nm}$		
	$I_{\text{NALFA}}$	$I_{\text{ANS-NALFA}}$	$I_{\text{TC-ANS-NALFA}}$	$I_{\text{NALFA}}$	$I_{\text{ANS-NALFA}}$	$I_{\text{TC-ANS-NALFA}}$
0	0	5087.083	9932.199	0	5486.656	9780.258
$8 \times 10^{-5}$	84.0373	5109.655	9702.542	32.7862	5433.216	9584.319
$1.5 \times 10^{-4}$	77.3471	5116.448	9528.607	27.7094	5528.213	9297.715
$2.9 \times 10^{-4}$	124.204	4895.930	8910.908	70.5927	5254.166	8697.101
$5.5 \times 10^{-4}$	112.073	4719.863	8399.042	125.203	4925.456	8130.002
$7.7 \times 10^{-4}$	83.729	5306.514	9469.499	54.9196	5814.065	9127.017
$1.51 \times 10^{-3}$	116.844	5201.012	9422.895	94.1117	5697.596	9364.373
$2.93 \times 10^{-3}$	140.076	5148.600	9247.453	119.804	5347.388	8920.143
$5.52 \times 10^{-3}$	234.043	4945.000	9445.586	167.546	5371.667	9076.503
$4.19 \times 10^{-3}$	179.747	5409.302	10453.496	123.862	5588.277	9893.270
$8.12 \times 10^{-3}$	256.440	6845.188	10591.127	208.703	7375.737	10064.876
$1.53 \times 10^{-2}$	458.187	5682.457	10656.034	299.227	5571.616	9926.383

**Tabla C.6. (Continuación).**

[NALFA] (M)	$\lambda = 540 \text{ nm}$		
	$I_{\text{NALFA}}$	$I_{\text{ANS-NALFA}}$	$I_{\text{TC-ANS-NALFA}}$
0	0	4663.367	7348,890
$8 \times 10^{-5}$	16.5037	4673.815	7300.418
$1.5 \times 10^{-4}$	12.8033	4672.697	7040.517
$2.9 \times 10^{-4}$	31.5656	4471.758	6569.962
$5.5 \times 10^{-4}$	56.0428	4217.890	6270.543
$7.7 \times 10^{-4}$	30.3140	4806.374	7095.664
$1.51 \times 10^{-3}$	55.9838	4781.110	7102.039
$2.93 \times 10^{-3}$	89.4012	4643.983	6705.518
$5.52 \times 10^{-3}$	102.013	4333.333	6925.649
$4.19 \times 10^{-3}$	87.0333	4731.388	7358.987
$8.12 \times 10^{-3}$	117.853	5257.805	7369.475
$1.53 \times 10^{-2}$	156.669	4602.365	7462.951

**Tabla C.7. Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para DFAME y las mezclas ANS-DFAME y TC-ANS-DFAME a pH 9.0, [TC] =  $9.1 \times 10^{-4}$  M y [ANS] =  $5.04 \times 10^{-6}$  M.**

[DFAME] (M)	$\lambda = 500 \text{ nm}$			$\lambda = 516 \text{ nm}$		
	$I_{\text{DFAME}}$	$I_{\text{ANS-DFAME}}$	$I_{\text{TC-ANS-DFAME}}$	$I_{\text{DFAME}}$	$I_{\text{ANS-DFAME}}$	$I_{\text{TC-ANS-DFAME}}$
0	0	4802.905	9750.588	0	5247.644	9123.75
$8 \times 10^{-5}$	126.653	7429.228	9931.734	80.5565	6165.319	9212.1
$1.6 \times 10^{-4}$	50.2228	4682.930	9066.769	25.7995	4997.002	8483.583
$3.1 \times 10^{-4}$	183.370	4595.238	8898.917	104.312	4904.797	8237.535
$5.8 \times 10^{-4}$	203.990	4178.059	7658.832	112.127	4371.976	7074.89
$7.7 \times 10^{-4}$	382.151	4871.639	8993.608	208.315	5010.803	8603.164
$1.52 \times 10^{-3}$	690.645	5150.207	8871.324	473.752	5102.405	8317.122
$2.95 \times 10^{-3}$	1292.692	5551.103	8954.774	716.737	5435.228	8345.938
$2.13 \times 10^{-3}$	988.323	5682.004	9231.107	643.888	5614.185	8450.618
$4.18 \times 10^{-3}$	2025.653	6517.547	10044.498	1292.014	6079.193	8940.696
$8.11 \times 10^{-3}$	3881.615	7744.866	10750.259	2431.082	6917.507	9306.002
$1.53 \times 10^{-2}$	6665.107	10274.051	12839.846	4310.054	8264.36	10502.622

Tabla C.7. (Continuación).

[DFAME] (M)	$\lambda = 540 \text{ nm}$		
	$I_{DFAME}$	$I_{ANS-DFAME}$	$I_{TC-ANS-DFAME}$
0	0	4275.671	6744.834
$8 \times 10^{-5}$	38.2419	4657.004	6749.250
$1.5 \times 10^{-4}$	36.6679	4315.335	6212.706
$2.9 \times 10^{-4}$	66.9203	4150.262	6030.714
$5.5 \times 10^{-4}$	90.5067	3698.506	5303.809
$7.7 \times 10^{-4}$	121.081	4240.808	6282.557
$1.51 \times 10^{-3}$	270.418	4250.497	5955.160
$2.93 \times 10^{-3}$	476.143	4256.541	6091.101
$5.52 \times 10^{-3}$	355.153	4462.096	6213.605
$4.19 \times 10^{-3}$	637.010	4692.831	6497.396
$8.12 \times 10^{-3}$	1124.216	5005.144	6470.485
$1.53 \times 10^{-2}$	2089.885	5633.903	6936.420

Tabla C.8. Intensidad de fluorescencia a diferentes  $\lambda$ 's para LFAME y las mezclas ANS-LFAME y TC-ANS-LFAME a pH 9.0, [TC] =  $9.1 \times 10^{-4}$  M y [ANS] =  $5.04 \times 10^{-6}$  M.

[LFAME] (M)	$\lambda = 500 \text{ nm}$			$\lambda = 516 \text{ nm}$		
	$I_{LFAME}$	$I_{ANS-LFAME}$	$I_{TC-ANS-LFAME}$	$I_{LFAME}$	$I_{ANS-LFAME}$	$I_{TC-ANS-LFAME}$
0	0	4739.627	9195.564	0	5172.329	8850.365
$8 \times 10^{-5}$	34.0433	4677.556	9086.122	36.5459	5006.912	8581.979
$1.6 \times 10^{-4}$	45.9080	4632.503	8780.326	63.0603	5012.623	8439.469
$3.0 \times 10^{-4}$	67.9773	4536.108	8544.300	44.9589	4882.807	8178.120
$5.7 \times 10^{-4}$	98.8047	4431.148	7844.694	95.1866	4620.837	7497.391
$7.7 \times 10^{-4}$	105.823	4828.095	8735.284	89.1920	5071.243	8438.628
$1.51 \times 10^{-3}$	115.850	4830.635	8385.426	120.7930	5144.653	8093.427
$2.93 \times 10^{-3}$	222.580	4858.825	8353.605	193.3680	5023.060	7991.696
$5.52 \times 10^{-3}$	341.462	4789.098	7591.667	232.790	4856.187	7238.333
$2.08 \times 10^{-3}$	224.775	5053.835	8790.755	159.042	5344.681	8290.798
$4.10 \times 10^{-3}$	310.779	5012.667	8775.239	193.058	5276.173	8442.012
$7.95 \times 10^{-3}$	420.163	5039.122	9149.396	277.988	5216.670	8504.642
$1.50 \times 10^{-2}$	693.442	5289.925	8443.516	443.931	5314.159	7841.434

Tabla C.8. (Continuación).

[LFAME] (M)	$\lambda = 540 \text{ nm}$		
	$I_{\text{LFAME}}$	$I_{\text{ANS-LFAME}}$	$I_{\text{TC-ANS-LFAME}}$
0	0	4232.478	6559.595
$8 \times 10^{-5}$	-13.1820	4258.058	6492.055
$1.6 \times 10^{-4}$	35.2396	4204.833	6264.524
$3.0 \times 10^{-4}$	42.2156	4095.234	6132.988
$5.7 \times 10^{-4}$	56.8798	3788.210	5660.643
$7.7 \times 10^{-4}$	77.8696	4314.503	6407.305
$1.51 \times 10^{-3}$	136.609	4382.823	6137.303
$2.93 \times 10^{-3}$	128.447	4155.807	5965.334
$5.52 \times 10^{-3}$	153.684	3966.654	5443.333
$2.08 \times 10^{-3}$	109.882	4411.063	6144.142
$4.10 \times 10^{-3}$	157.758	4236.083	6263.113
$7.95 \times 10^{-3}$	187.169	4291.247	6148.929
$1.50 \times 10^{-2}$	262.815	4243.273	5887.480

Tabla C.9. Absorbancia a diferentes  $\lambda$ 's para NADA y la mezcla TC-NADA a pH 9.0, [TC] =  $4 \times 10^{-5}$  M.

[NADA] (M)	$\lambda = 242 \text{ nm}$		$\lambda = 286 \text{ nm}$		$\lambda = 290 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NADA}}$	$A_{\text{TC-NADA}}$	$A_{\text{NADA}}$	$A_{\text{TC-NADA}}$	$A_{\text{NADA}}$	$A_{\text{TC-NADA}}$
0	0	1.02850	0	0.39487	0	0.38229
$9.33 \times 10^{-4}$	0.00470	1.00850	0.00136	0.38538	0.00070	0.37364
$1.83 \times 10^{-3}$	0.00774	0.98679	0.00204	0.37791	0.00162	0.36638
$2.70 \times 10^{-3}$	0.01012	0.97292	0.00258	0.37103	0.00197	0.35979
$3.53 \times 10^{-3}$	0.01378	0.95518	0.00356	0.36469	0.00281	0.35260
$4.33 \times 10^{-3}$	0.01198	0.94389	0.00040	0.35934	-0.00029	0.34802
$5.10 \times 10^{-3}$	0.01422	0.92940	0.00131	0.35367	0.00069	0.34270
$5.85 \times 10^{-3}$	0.01640	0.91638	0.00175	0.34894	0.00093	0.33800
$6.57 \times 10^{-3}$	0.01724	0.90497	0.00102	0.34329	0.00058	0.33244
$7.27 \times 10^{-3}$	0.01974	0.89023	0.00227	0.33704	0.00151	0.32706
$7.94 \times 10^{-3}$	0.02286	0.88019	0.00359	0.33083	0.00311	0.32066
$8.59 \times 10^{-3}$	0.02682	0.86798	0.00677	0.32816	0.00592	0.3185
$9.22 \times 10^{-3}$	0.02577	0.85486	0.00513	0.32254	0.00444	0.31190
$9.83 \times 10^{-3}$	0.02843	0.84579	0.00589	0.31854	0.00496	0.30806
$1.042 \times 10^{-2}$	0.02951	0.83142	0.00584	0.31297	0.00514	0.30205
$1.099 \times 10^{-2}$	0.03523	0.82501	0.00938	0.30937	0.00870	0.29854
$1.155 \times 10^{-2}$	0.03081	0.81876	0.00423	0.30852	0.00374	0.29767
$1.209 \times 10^{-2}$	0.03139	0.80267	0.00369	0.30106	0.00288	0.29092
$1.261 \times 10^{-2}$	0.03323	0.79141	0.00421	0.29521	0.00375	0.28468
$1.312 \times 10^{-2}$	0.03481	0.78696	0.00465	0.29388	0.00383	0.28360
$1.361 \times 10^{-2}$	0.03665	0.77585	0.00529	0.28810	0.00455	0.27838

Tabla C.9. (Continuación).

[NADA] (M)	$\lambda = 294 \text{ nm}$		$\lambda = 300 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NADA}}$	$A_{\text{TC-NADA}}$	$A_{\text{NADA}}$	$A_{\text{TC-NADA}}$
0	0	0.34766	0	0.30563
$9.33 \times 10^{-4}$	0.00108	0.34027	0.00079	0.29918
$1.83 \times 10^{-3}$	0.00156	0.33342	0.00143	0.29349
$2.70 \times 10^{-3}$	0.00253	0.32735	0.00232	0.28842
$3.53 \times 10^{-3}$	0.00308	0.32140	0.00267	0.28259
$4.33 \times 10^{-3}$	-0.00034	0.31720	-0.00043	0.27925
$5.10 \times 10^{-3}$	0.00041	0.31209	0.00046	0.27490
$5.85 \times 10^{-3}$	0.00104	0.30783	0.00090	0.27147
$6.57 \times 10^{-3}$	0.00049	0.30261	0.00014	0.26633
$7.27 \times 10^{-3}$	0.00168	0.29790	0.00130	0.26198
$7.94 \times 10^{-3}$	0.00308	0.29218	0.00279	0.25694
$8.59 \times 10^{-3}$	0.00607	0.29002	0.00545	0.25543
$9.22 \times 10^{-3}$	0.00412	0.28429	0.00374	0.24997
$9.83 \times 10^{-3}$	0.00497	0.28084	0.00458	0.24771
$1.042 \times 10^{-2}$	0.00505	0.27531	0.00462	0.24243
$1.099 \times 10^{-2}$	0.00821	0.27193	0.00734	0.23958
$1.155 \times 10^{-2}$	0.00346	0.27132	0.00314	0.23882
$1.209 \times 10^{-2}$	0.00299	0.26500	0.00229	0.23346
$1.261 \times 10^{-2}$	0.00368	0.25945	0.00298	0.22803
$1.312 \times 10^{-2}$	0.00348	0.25888	0.00284	0.22772
$1.361 \times 10^{-2}$	0.00452	0.25314	0.00380	0.22311

Tabla C.10. Absorbancia a diferentes  $\lambda$ 's para NALA y la mezcla TC-NALA a pH 9.0, [TC] =  $4 \times 10^{-5}$  M.

[NALA] (M)	$\lambda = 242 \text{ nm}$		$\lambda = 286 \text{ nm}$		$\lambda = 290 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NALA}}$	$A_{\text{TC-NALA}}$	$A_{\text{NALA}}$	$A_{\text{TC-NALA}}$	$A_{\text{NALA}}$	$A_{\text{TC-NALA}}$
0	0	1.0537	0	0.40929	0	0.39516
$9.10 \times 10^{-4}$	0.00580	1.0327	0.00143	0.40141	0.00110	0.38789
$1.78 \times 10^{-3}$	0.01118	1.0181	0.00304	0.39381	0.00261	0.38234
$2.63 \times 10^{-3}$	0.01445	0.99974	0.00526	0.38690	0.00487	0.37535
$3.44 \times 10^{-3}$	0.01634	0.98296	0.00519	0.38025	0.00462	0.36879
$4.22 \times 10^{-3}$	0.02055	0.96872	0.00653	0.37163	0.00601	0.36047
$4.97 \times 10^{-3}$	0.02214	0.95432	0.00740	0.36641	0.00693	0.35519
$5.70 \times 10^{-3}$	0.02232	0.94020	0.00439	0.35933	0.00404	0.34808
$6.40 \times 10^{-3}$	0.02448	0.92836	0.00558	0.35379	0.00504	0.34332
$7.08 \times 10^{-3}$	0.02678	0.91513	0.00568	0.35068	0.00504	0.33974
$7.73 \times 10^{-3}$	0.03146	0.90073	0.00868	0.34335	0.00774	0.33244
$8.37 \times 10^{-3}$	0.03047	0.89104	0.00584	0.33824	0.00557	0.32860
$8.98 \times 10^{-3}$	0.03436	0.88350	0.00757	0.33743	0.00710	0.32726
$9.57 \times 10^{-3}$	0.03404	0.86786	0.00620	0.32878	0.00565	0.31865
$1.015 \times 10^{-2}$	0.03578	0.86156	0.00624	0.32776	0.00572	0.31792
$1.071 \times 10^{-2}$	0.03824	0.84778	0.00682	0.32004	0.00632	0.31001
$1.125 \times 10^{-2}$	0.04121	0.83838	0.00797	0.31592	0.00760	0.30589
$1.177 \times 10^{-2}$	0.04941	0.82777	0.01451	0.31293	0.01384	0.30235
$1.228 \times 10^{-2}$	0.04623	0.81296	0.01009	0.30492	0.00938	0.29424
$1.278 \times 10^{-2}$	0.04614	0.80641	0.00990	0.30214	0.00946	0.29166
$1.326 \times 10^{-2}$	0.04733	0.79730	0.00851	0.29926	0.00783	0.28871

Tabla C.10. (Continuación).

[NALA] (M)	$\lambda = 294 \text{ nm}$		$\lambda = 300 \text{ nm}$	
	$A_{NALA}$	$A_{TC-NALA}$	$A_{NALA}$	$A_{TC-NALA}$
0	0	0.36108	0	0.31802
$9.10 \times 10^{-4}$	0.00105	0.35498	0.00145	0.31332
$1.78 \times 10^{-3}$	0.00269	0.34845	0.00262	0.30750
$2.63 \times 10^{-3}$	0.00450	0.34294	0.00433	0.30287
$3.44 \times 10^{-3}$	0.00461	0.33621	0.00462	0.29718
$4.22 \times 10^{-3}$	0.00562	0.32892	0.00537	0.29018
$4.97 \times 10^{-3}$	0.00650	0.32411	0.00610	0.28670
$5.70 \times 10^{-3}$	0.00400	0.31789	0.00360	0.28036
$6.40 \times 10^{-3}$	0.00462	0.31303	0.00449	0.27640
$7.08 \times 10^{-3}$	0.00496	0.31047	0.00465	0.27455
$7.73 \times 10^{-3}$	0.00731	0.30344	0.00682	0.26782
$8.37 \times 10^{-3}$	0.00497	0.29950	0.00484	0.26529
$8.98 \times 10^{-3}$	0.00668	0.29912	0.00618	0.26411
$9.57 \times 10^{-3}$	0.00536	0.29027	0.00511	0.25632
$1.015 \times 10^{-2}$	0.00531	0.29012	0.00496	0.25658
$1.071 \times 10^{-2}$	0.00583	0.28294	0.00574	0.24960
$1.125 \times 10^{-2}$	0.00743	0.27934	0.00687	0.24689
$1.177 \times 10^{-2}$	0.01308	0.27577	0.01239	0.24413
$1.228 \times 10^{-2}$	0.00897	0.26865	0.00867	0.23700
$1.278 \times 10^{-2}$	0.00906	0.26601	0.00873	0.23492
$1.326 \times 10^{-2}$	0.00769	0.26358	0.00748	0.23283

Tabla C.11. Absorbancia a diferentes  $\lambda$ 's para NADFA y la mezcla TC-NADFA a pH 9,  $[TC]=4 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

[NADFA] (M)	$\lambda = 242 \text{ nm}$		$\lambda = 260 \text{ nm}$		$\lambda = 290 \text{ nm}$	
	$A_{NADFA}$	$A_{TC-NADFA}$	$A_{NADFA}$	$A_{TC-NADFA}$	$A_{NADFA}$	$A_{TC-NADFA}$
0	0	1.0396	0	0.36412	0	0.38660
$8.51 \times 10^{-4}$	0.07983	1.0984	0.12289	0.49117	0.00198	0.37912
$1.67 \times 10^{-3}$	0.16139	1.1546	0.25032	0.60527	0.00351	0.37411
$2.46 \times 10^{-3}$	0.23274	1.2058	0.36382	0.71342	0.00409	0.36601
$3.21 \times 10^{-3}$	0.30374	1.2528	0.47568	0.81609	0.00470	0.35858
$3.94 \times 10^{-3}$	0.37456	1.3066	0.58499	0.91934	0.00568	0.35445
$4.65 \times 10^{-3}$	0.44247	1.3530	0.69145	1.0165	0.00726	0.34695
$5.33 \times 10^{-3}$	0.50604	1.3929	0.79169	1.1041	0.00787	0.34163
$5.98 \times 10^{-3}$	0.56871	1.4445	0.88690	1.1971	0.00934	0.33722
$6.62 \times 10^{-3}$	0.62883	1.4779	0.98074	1.2835	0.01216	0.33163
$7.23 \times 10^{-3}$	0.68513	1.5200	1.0705	1.3692	0.01076	0.32892
$7.82 \times 10^{-3}$	0.73915	1.5467	1.1537	1.4438	0.01054	0.32153
$8.40 \times 10^{-3}$	0.79535	1.5870	1.2375	1.5218	0.01146	0.31673
$8.95 \times 10^{-3}$	0.84641	1.6268	1.3202	1.6015	0.01213	0.31400
$9.49 \times 10^{-3}$	0.89545	1.6644	1.3913	1.6643	0.01137	0.30833
$1.00 \times 10^{-2}$	0.94682	1.6945	1.4707	1.7348	0.01231	0.30519
$1.05 \times 10^{-2}$	0.99442	1.7444	1.5410	1.7966	0.01366	0.30046
$1.10 \times 10^{-2}$	1.0412	1.7575	1.6077	1.8496	0.01538	0.29715
$1.15 \times 10^{-2}$	1.0880	1.7893	1.6737	1.9212	0.01584	0.29500
$1.19 \times 10^{-2}$	1.1286	1.8382	1.7423	1.9868	0.01602	0.30022
$1.24 \times 10^{-2}$	1.1694	1.8460	1.7984	2.0527	0.01572	0.28838

Tabla C.11. (Continuación).

[NADFA] (M)	$\lambda = 294 \text{ nm}$		$\lambda = 300 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NADFA}}$	$A_{\text{TC-NADFA}}$	$A_{\text{NADFA}}$	$A_{\text{TC-NADFA}}$
0	0	0.34700	0	0.3031
$8.51 \times 10^{-4}$	0.00156	0.34044	0.00163	0.29730
$1.67 \times 10^{-3}$	0.00310	0.33580	0.00284	0.29349
$2.46 \times 10^{-3}$	0.00349	0.32829	0.00337	0.28653
$3.21 \times 10^{-3}$	0.00398	0.32129	0.00378	0.28044
$3.94 \times 10^{-3}$	0.00493	0.31752	0.00481	0.27748
$4.65 \times 10^{-3}$	0.00665	0.31097	0.00606	0.27135
$5.33 \times 10^{-3}$	0.00713	0.30598	0.00665	0.26704
$5.98 \times 10^{-3}$	0.00841	0.30219	0.00784	0.26427
$6.62 \times 10^{-3}$	0.01131	0.29697	0.01096	0.25922
$7.23 \times 10^{-3}$	0.00995	0.29446	0.00932	0.25728
$7.82 \times 10^{-3}$	0.00992	0.28769	0.00963	0.25107
$8.40 \times 10^{-3}$	0.01060	0.28358	0.01001	0.24733
$8.95 \times 10^{-3}$	0.01123	0.28168	0.01044	0.24617
$9.49 \times 10^{-3}$	0.01042	0.27626	0.00970	0.24127
$1.00 \times 10^{-2}$	0.01169	0.27312	0.01103	0.23846
$1.05 \times 10^{-2}$	0.01270	0.26900	0.01201	0.23474
$1.10 \times 10^{-2}$	0.01436	0.26599	0.01344	0.23219
$1.15 \times 10^{-2}$	0.01488	0.26402	0.01382	0.23050
$1.19 \times 10^{-2}$	0.01483	0.26917	0.01402	0.23557
$1.24 \times 10^{-2}$	0.01471	0.25790	0.01382	0.22531

Tabla C.12. Absorbancia a diferentes  $\lambda$ 's para NALFA y la mezcla TC-NALFA a pH 9,  $[\text{TC}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

[NALFA] (M)	$\lambda = 242 \text{ nm}$		$\lambda = 244 \text{ nm}$		$\lambda = 290 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NALFA}}$	$A_{\text{TC-NALFA}}$	$A_{\text{NALFA}}$	$A_{\text{TC-NALFA}}$	$A_{\text{NALFA}}^a$	$A_{\text{TC-NALFA}}$
0	0	1.0472	0	0.93631	-0.00003	0.38890
$9.39 \times 10^{-4}$	0.07516	1.0891	0.08424	0.99106	0.00159	0.38008
$1.84 \times 10^{-3}$	0.14313	1.1353	0.16074	1.0476	0.00315	0.37323
$2.71 \times 10^{-3}$	0.20842	1.1793	0.23497	1.1073	0.00465	0.36774
$3.55 \times 10^{-3}$	0.27400	1.2217	0.30818	1.1575	0.00610	0.35863
$4.35 \times 10^{-3}$	0.33014	1.2613	0.37335	1.2120	0.00748	0.35153
$5.13 \times 10^{-3}$	0.39340	1.3006	0.44556	1.2637	0.00883	0.34660
$5.88 \times 10^{-3}$	0.45004	1.3403	0.50928	1.3025	0.01013	0.34122
$6.61 \times 10^{-3}$	0.50430	1.3763	0.57085	1.3552	0.01139	0.33594
$7.31 \times 10^{-3}$	0.55582	1.4086	0.62953	1.3991	0.01259	0.33009
$7.98 \times 10^{-3}$	0.60748	1.4473	0.68796	1.4368	0.01375	0.32523
$8.64 \times 10^{-3}$	0.65504	1.4796	0.74074	1.4788	0.01489	0.31996
$9.27 \times 10^{-3}$	0.70139	1.5130	0.79677	1.5225	0.01598	0.31618
$9.88 \times 10^{-3}$	0.74850	1.5536	0.84854	1.5562	0.01703	0.31227
$1.048 \times 10^{-2}$	0.78979	1.5738	0.89517	1.5971	0.01807	0.30583
$1.105 \times 10^{-2}$	0.83374	1.5977	0.94316	1.6381	0.01905	0.30583
$1.161 \times 10^{-2}$	0.87367	1.6305	0.98891	1.6626	0.02002	0.29794
$1.215 \times 10^{-2}$	0.91284	1.6547	1.0345	1.7000	0.02095	0.29822
$1.268 \times 10^{-2}$	0.94710	1.6889	1.0746	1.7268	0.02187	0.29091
$1.319 \times 10^{-2}$	0.98552	1.6986	1.1154	1.7565	0.02275	0.28648
$1.368 \times 10^{-2}$	1.0224	1.7339	1.1537	1.7798	0.02360	0.28188

<sup>a</sup> Datos de absorbancia recalculados por regresión lineal de los datos originales.

Tabla C.12. (Continuación).

[NALFA] (M)	$\lambda = 294 \text{ nm}$		$\lambda = 300 \text{ nm}$	
	$A_{\text{NALFA}}^a$	$A_{\text{TC-NALFA}}$	$A_{\text{NALFA}}^a$	$A_{\text{TC-NALFA}}$
0	-0.00010	0.35429	0.00062	0.31242
$9.39 \times 10^{-4}$	0.00147	0.34546	0.00193	0.30461
$1.84 \times 10^{-3}$	0.00297	0.33884	0.00318	0.29887
$2.71 \times 10^{-3}$	0.00442	0.33461	0.00439	0.29501
$3.55 \times 10^{-3}$	0.00582	0.32562	0.00555	0.28670
$4.35 \times 10^{-3}$	0.00715	0.31972	0.00666	0.28169
$5.13 \times 10^{-3}$	0.00845	0.31485	0.00775	0.27724
$5.88 \times 10^{-3}$	0.00970	0.30989	0.00879	0.27266
$6.61 \times 10^{-3}$	0.01092	0.30476	0.0098	0.26869
$7.31 \times 10^{-3}$	0.01208	0.29950	0.01078	0.26318
$7.98 \times 10^{-3}$	0.01320	0.29514	0.01171	0.25964
$8.64 \times 10^{-3}$	0.01430	0.29001	0.01262	0.25523
$9.27 \times 10^{-3}$	0.01535	0.28661	0.0135	0.25233
$9.88 \times 10^{-3}$	0.01637	0.28349	0.01435	0.24959
$1.048 \times 10^{-2}$	0.01736	0.27733	0.01518	0.24405
$1.105 \times 10^{-2}$	0.01831	0.27728	0.01597	0.24432
$1.161 \times 10^{-2}$	0.01925	0.27061	0.01675	0.23822
$1.215 \times 10^{-2}$	0.02015	0.27086	0.0175	0.23869
$1.268 \times 10^{-2}$	0.02103	0.26340	0.01824	0.23186
$1.319 \times 10^{-2}$	0.02188	0.25999	0.01895	0.22888
$1.368 \times 10^{-2}$	0.02270	0.25534	0.01963	0.22424

Tabla C.13. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-NADFA [TC] =  $5 \times 10^{-4}$  M.

[NADFA] (M)	H1		H2O	
	$\delta_{\text{TC}}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{\text{TC}}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	2.6307	0	3.1711	0
$2.49 \times 10^{-3}$	2.6323	0.0016	3.1719	0.0008
$4.80 \times 10^{-3}$	2.6296	-0.0051	3.1708	-0.0003
$7.17 \times 10^{-3}$	2.6219	-0.0088	3.1701	-0.001
$9.36 \times 10^{-3}$	2.6193	-0.0114	3.1670	-0.0041
$1.17 \times 10^{-2}$	2.6148	-0.0159	3.1667	-0.0044
$1.39 \times 10^{-2}$	2.6137	-0.0170	3.1652	-0.0059
$1.63 \times 10^{-2}$	2.6128	-0.0179	3.1649	-0.0062
$1.85 \times 10^{-2}$	2.6130	-0.0177	3.1680	-0.0031

Tabla C.14. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-NALFA, [TC] =  $5 \times 10^{-4}$  M.

[NALFA] (M)	H1		H13		H29	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	2.6251	0	6.793	0	7.0720	0
$1.72 \times 10^{-4}$	2.6264	0.0013	6.793	0	7.0652	-0.0068
$3.43 \times 10^{-4}$	2.6235	-0.0016	6.784	-0.009	7.0630	-0.009
$7.67 \times 10^{-4}$	2.6238	-0.0013	6.793	0	7.0634	-0.0086
$1.19 \times 10^{-3}$	2.6201	-0.0050	6.784	-0.009	7.0642	-0.0078
$1.60 \times 10^{-3}$	2.6150	-0.0101	-	-	7.0601	-0.0119
$2.42 \times 10^{-3}$	2.6111	-0.0140	6.775	-0.018	7.0585	-0.0135
$3.23 \times 10^{-3}$	2.6063	-0.0188	6.775	-0.018	7.0630	-0.009
$4.79 \times 10^{-3}$	2.5983	-0.0268	6.775	-0.018	7.0540	-0.018

Tabla C.14. (Continuación).

[NALFA] (M)	H36a		H16	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	2.820	0	6.685	0
$1.72 \times 10^{-4}$	-	-	6.685	0
$3.43 \times 10^{-4}$	2.820	0	6.676	-0.009
$7.67 \times 10^{-4}$	2.820	0	6.676	-0.009
$1.19 \times 10^{-3}$	2.810	-0.010	6.676	-0.009
$1.60 \times 10^{-3}$	2.811	-0.009	-	-
$2.42 \times 10^{-3}$	2.802	-0.018	6.676	-0.009
$3.23 \times 10^{-3}$	2.802	-0.018	6.676	-0.009
$4.79 \times 10^{-3}$	2.793	-0.027	6.676	-0.009

Tabla C.15. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-DFAME, [TC] =  $2 \times 10^{-3}$  M.

[DFAME] (M)	H29		H14a		H14b	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.818	0	6.773	0	6.753	0
$1.0 \times 10^{-3}$	6.818	0	6.776	0.003	6.751	-0.002
$2.1 \times 10^{-3}$	6.815	-0.003	6.773	0	6.748	-0.005
$4.1 \times 10^{-3}$	6.822	0.004	6.777	0.004	6.754	0.001
$8.1 \times 10^{-3}$	6.820	0.002	6.776	0.003	6.756	0.003
$1.6 \times 10^{-2}$	6.826	0.008	6.783	0.010	6.765	0.012
$3.0 \times 10^{-2}$	6.829	0.011	6.786	0.013	6.770	0.017
$5.3 \times 10^{-2}$	6.829	0.011	6.787	0.014	6.774	0.021

Tabla C.15. (Continuación).

[DFAME] (M)	H32a		H7		H13a	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.722	0	6.574	0	6.538	0
$1.0 \times 10^{-3}$	6.724	0.002	6.576	0.002	6.541	0.003
$2.1 \times 10^{-3}$	6.721	-0.001	6.573	-0.001	6.539	0.001
$4.1 \times 10^{-3}$	6.728	0.006	6.580	0.006	6.548	0.010
$8.1 \times 10^{-3}$	6.731	0.009	6.582	0.008	6.551	0.013
$1.6 \times 10^{-2}$	6.739	0.017	6.590	0.016	6.565	0.027
$3.0 \times 10^{-2}$	6.751	0.029	6.599	0.025	6.579	0.041
$5.3 \times 10^{-2}$	6.764	0.042	6.608	0.034	6.594	0.056

Tabla C.15. (Continuación).

[DFAME] (M)	H13b		pico 9		H33a	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.518	0	6.452	0	6.935	0
$1.0 \times 10^{-3}$	6.521	0.003	6.452	0	6.935	0
$2.1 \times 10^{-3}$	6.518	0	6.449	-0.003	6.933	-0.002
$4.1 \times 10^{-3}$	6.528	0.010	6.457	0.005	6.938	0.003
$8.1 \times 10^{-3}$	6.532	0.014	6.455	0.003	6.938	0.003
$1.6 \times 10^{-2}$	6.544	0.026	6.463	0.011	6.945	0.01
$3.0 \times 10^{-2}$	6.559	0.041	6.467	0.015	6.952	0.017
$5.3 \times 10^{-2}$	6.573	0.055	6.469	0.017	6.953	0.018

Tabla C.15. (Continuación).

[DFAME] (M)	H33b		H36a		H36b	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	5.914	0	2.577	0	2.547	0
$1.0 \times 10^{-3}$	5.916	0.002	2.577	0	2.547	0
$2.1 \times 10^{-3}$	5.912	-0.002	2.573	-0.004	2.545	-0.002
$4.1 \times 10^{-3}$	5.920	0.006	2.580	0.003	2.550	0.003
$8.1 \times 10^{-3}$	5.920	0.006	2.580	0.003	2.550	0.003
$1.6 \times 10^{-2}$	5.926	0.012	2.586	0.009	2.537	0.01
$3.0 \times 10^{-2}$	5.932	0.018	2.589	0.012	2.570	0.013
$5.3 \times 10^{-2}$	5.933	0.019	2.591	0.014	2.560	0.013

Tabla C.15. (Continuación).

[DFAME] (M)	H36c		H1	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	2.517	0	2.356	0
$1.0 \times 10^{-3}$	2.518	0.001	2.357	0.001
$2.1 \times 10^{-3}$	2.516	-0.001	2.354	-0.002
$4.1 \times 10^{-3}$	2.521	0.004	2.363	0.007
$8.1 \times 10^{-3}$	2.522	0.005	2.365	0.009
$1.6 \times 10^{-2}$	2.528	0.011	2.373	0.017
$3.0 \times 10^{-2}$	2.534	0.014	2.380	0.024
$5.3 \times 10^{-2}$	2.531	0.014	2.382	0.026

Tabla C.16. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-LFAME,  $[TC] = 2 \times 10^{-3}$  M.

[LFAME] (M)	H14a		H14b		H7	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.770	0	6.750	0	6.574	0
$1.1 \times 10^{-3}$	6.776	0.006	6.753	0.003	6.579	0.005
$2.2 \times 10^{-3}$	6.774	0.004	6.753	0.003	6.577	0.003
$4.4 \times 10^{-3}$	6.773	0.003	6.751	0.001	6.579	0.005
$8.7 \times 10^{-3}$	6.777	0.007	6.756	0.006	6.583	0.009
$1.7 \times 10^{-2}$	6.779	0.009	6.759	0.009	6.588	0.014
$3.2 \times 10^{-2}$	6.782	0.012	6.765	0.015	6.599	0.025
$5.7 \times 10^{-2}$	6.785	0.015	6.762	0.012	6.611	0.037

Tabla C.16. (Continuación).

[LFAME] (M)	H13a		H13b		pico 9	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.539	0	6.519	0	6.451	0
$1.1 \times 10^{-3}$	6.544	0.005	6.524	0.005	6.454	0.003
$2.2 \times 10^{-3}$	6.545	0.006	6.524	0.005	6.454	0.003
$4.4 \times 10^{-3}$	6.547	0.008	6.527	0.008	6.452	0.001
$8.7 \times 10^{-3}$	6.553	0.014	6.533	0.014	6.455	0.004
$1.7 \times 10^{-2}$	6.561	0.022	6.541	0.022	6.457	0.006
$3.2 \times 10^{-2}$	6.579	0.040	6.557	0.038	6.461	0.010
$5.7 \times 10^{-2}$	6.599	0.060	6.577	0.058	6.461	0.010

Tabla C.16. (Continuación).

[LFAME] (M)	H33a		H33b		H25	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	5.935	0	5.915	0	4.952	0
$1.1 \times 10^{-3}$	5.938	0.003	5.918	0.003	4.955	0.003
$2.2 \times 10^{-3}$	5.935	0	5.915	0	4.950	-0.002
$4.4 \times 10^{-3}$	5.936	0.001	5.918	0.003	4.953	0.001
$8.7 \times 10^{-3}$	5.939	0.004	5.920	0.005	4.953	0.001
$1.7 \times 10^{-2}$	5.944	0.009	5.921	0.006	4.953	0.001
$3.2 \times 10^{-2}$	5.945	0.010	5.927	0.012	4.952	0
$5.7 \times 10^{-2}$	5.950	0.015	5.929	0.014	4.941	-0.011

Tabla C.16. (Continuación).

[LFAME] (M)	H37b		H37d		H1	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	3.980	0	3.933	0	2.354	0
$1.1 \times 10^{-3}$	3.983	0.003	3.937	0.004	2.359	0.005
$2.2 \times 10^{-3}$	3.983	0.003	3.932	-0.001	2.359	0.005
$4.4 \times 10^{-3}$	3.980	0	3.929	-0.004	2.359	0.005
$8.7 \times 10^{-3}$	3.980	0	3.926	-0.007	2.363	0.009
$1.7 \times 10^{-2}$	3.974	-0.006	3.922	-0.011	2.368	0.014
$3.2 \times 10^{-2}$	3.966	-0.014	3.916	-0.017	2.377	0.023
$5.7 \times 10^{-2}$	3.964	-0.016	-	-	2.377	0.023

Tabla C.17. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-DFA, [TC] =  $2 \times 10^{-3}$  M.

[DFA] (M)	H32		H13a		H13b	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.702	0	6.553	0	6.533	0
$2.1 \times 10^{-3}$	6.704	0.002	6.553	0	6.533	0
$4.2 \times 10^{-3}$	6.710	0.008	6.556	0.003	6.536	0.003
$8.2 \times 10^{-3}$	6.713	0.011	6.557	0.004	6.538	0.005
$1.55 \times 10^{-2}$	6.721	0.019	6.562	0.009	6.541	0.008
$2.82 \times 10^{-2}$	6.729	0.027	6.564	0.011	6.542	0.009
$4.76 \times 10^{-2}$	6.742	0.040	6.568	0.015	6.548	0.015

Tabla C.17. (Continuación).

[DFA] (M)	H4,H9		pico 35	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	3.627	0	2.368	0
$2.1 \times 10^{-3}$	3.627	0	2.370	0.002
$4.2 \times 10^{-3}$	3.630	0.003	2.371	0.003
$8.2 \times 10^{-3}$	3.632	0.005	2.373	0.005
$1.55 \times 10^{-2}$	3.635	0.008	2.377	0.009
$2.82 \times 10^{-2}$	3.638	0.011	2.379	0.011
$4.76 \times 10^{-2}$	-	-	2.383	0.015

Tabla C.18. Desplazamientos químicos y cambios de desplazamiento químico para diferentes protones de la TC inducidos por la complejación TC-LFA, [TC] =  $2 \times 10^{-3}$  M.

[LFA] (M)	H32		H18a		H18b	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	6.728	0	3.102	0	3.078	0
$1.0 \times 10^{-3}$	6.731	0.003	3.104	0.002	3.078	0
$2.0 \times 10^{-3}$	6.730	0.002	3.102	0	3.078	0
$4.0 \times 10^{-3}$	6.731	0.003	3.102	0	3.076	-0.002
$7.8 \times 10^{-3}$	6.735	0.007	3.101	-0.001	3.076	-0.002
$1.5 \times 10^{-2}$	6.730	0.002	3.091	-0.011	3.067	-0.011
$2.7 \times 10^{-2}$	6.739	0.011	3.088	-0.014	3.064	-0.014
$4.7 \times 10^{-2}$	6.739	0.011	3.081	-0.021	-	-

Tabla C.18. (Continuación).

[LFA] (M)	H36		H2	
	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\delta_{TC}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0	2.907	0	2.769	0
$1.0 \times 10^{-3}$	2.908	0.001	2.769	0
$2.0 \times 10^{-3}$	2.907	0	2.769	0
$4.0 \times 10^{-3}$	2.908	0.001	2.769	0
$7.8 \times 10^{-3}$	2.907	0	2.769	0
$1.5 \times 10^{-2}$	2.899	-0.008	2.762	-0.007
$2.7 \times 10^{-2}$	2.901	-0.006	2.762	-0.007
$4.7 \times 10^{-2}$	2.896	-0.011	2.759	-0.010

## APENDICE D

### TABLAS QUE PRESENTAN LAS ABSORBANCIAS A DIFERENTES $\lambda$ 's DE LA MEZCLA RIFAMPICINA - SUSTRATO Y SUSTRATO EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE LAS CONSTANTES DE ENLACE CORRESPONDIENTES

**Tabla D.1.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-NADFA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [NADFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 292$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.5780	0.5894	0.5738	0.2564	0.4516	0.2639
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.5938	0.5928	0.5944	0.2532	0.4468	0.2602
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.6072	0.5936	0.6136	0.2486	0.4382	0.2546
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.6205	0.5945	0.6327	0.2451	0.4315	0.2513
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.6321	0.5961	0.6494	0.2405	0.4234	0.2474
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.6435	0.5975	0.6671	0.2365	0.4153	0.2415
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.6592	0.6004	0.6886	0.2348	0.4097	0.2380
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.6660	0.5997	0.7003	0.2292	0.4021	0.2333
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.6789	0.6029	0.7189	0.2277	0.3971	0.2312
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.6872	0.6011	0.7312	0.2218	0.3879	0.2253
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.6940	0.6023	0.7460	0.2187	0.3816	0.2214

**Tabla D.2.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para NADFA a pH 6.0.

Concentración [NADFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 292$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0202	0.0090	0.0225	$1 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	0.0011
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0410	0.0186	0.0472	$-1 \times 10^{-4}$	$-8 \times 10^{-4}$	$-6 \times 10^{-5}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0676	0.0329	0.0788	0.0013	$8 \times 10^{-4}$	0.0013
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0796	0.0372	0.0951	-0.0013	-0.0013	$-8 \times 10^{-5}$
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.1040	0.0517	0.1239	0.0024	0.0026	0.0038
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.1196	0.0580	0.1457	$-7 \times 10^{-4}$	$-8 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-5}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.1329	0.0657	0.1632	0.0016	$8 \times 10^{-4}$	0.0013
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.1514	0.0749	0.1874	$-4 \times 10^{-4}$	$-4 \times 10^{-4}$	0.0012
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.1727	0.0863	0.2144	$-1 \times 10^{-4}$	$-3 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.1909	0.0966	0.2380	0.0014	0.0011	0.0019

**Tabla D.3.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-NALFA a pH 6.0  
[RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [NALFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 258$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm
0.0	0.6097	0.6190	0.6003	0.5982	0.2681	0.4720
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.6261	0.6223	0.6223	0.6238	0.2634	0.4647
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.6402	0.6242	0.6417	0.6461	0.2596	0.4573
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.6516	0.6250	0.6578	0.6657	0.2557	0.4497
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.6653	0.6268	0.6762	0.6878	0.2517	0.4416
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.6775	0.6286	0.6931	0.7071	0.2486	0.4356
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.6891	0.6302	0.7097	0.7271	0.2443	0.4275
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.7025	0.7025	0.7272	0.7473	0.2420	0.4215
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.7120	0.7120	0.7426	0.7655	0.2378	0.4138
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.7217	0.7217	0.7569	0.7827	0.2341	0.4068
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.7313	0.7313	0.7716	0.8006	0.2314	0.4016

**Tabla D.4.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para NALFA a pH 6.0.

Concentración [NALFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 258$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0179	0.0096	0.0272	0.0303	$4 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0408	0.0215	0.0548	0.0609	0.0014	$9 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0662	0.0347	0.0862	0.0959	0.0020	0.0014
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0909	0.0479	0.1163	0.1292	0.0032	0.0024
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.1116	0.0577	0.1421	0.1588	0.0023	0.0016
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.1331	0.0683	0.1690	0.1882	0.0023	0.0017
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.1520	0.0791	0.1927	0.2148	0.0029	0.0023
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.1724	0.0896	0.2183	0.2431	0.0036	0.0027
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.1891	0.0989	0.2415	0.2692	0.0035	0.0028
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.2076	0.1087	0.2653	0.2957	0.0040	0.0029

**Tabla D.5.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-DFA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [DFA]	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 258$ nm
0.0	0.6066	0.5924	0.5907
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.6034	0.6087	0.6113
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.5997	0.6259	0.6311
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.5957	0.6427	0.6501
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.5944	0.6592	0.6718
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.5878	0.6720	0.6863
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.5846	0.6886	0.7068
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.5794	0.6980	0.7188
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.5772	0.7111	0.7341
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.5754	0.7224	0.7475
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.5736	0.7390	0.7662

**Tabla D.6.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para DFA a pH 6.0.

Concentración [DFA]	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 258$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0065	0.0196	0.0219
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0133	0.0443	0.0495
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0191	0.0695	0.0778
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0276	0.0941	0.1049
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0306	0.1151	0.1295
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0359	0.1358	0.1526
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0405	0.1537	0.1729
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0448	0.1759	0.1974
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0500	0.1945	0.2185
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0565	0.2177	0.2445

**Tabla D.7.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LFA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.6458	0.6596	0.5031	0.2928
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.6418	0.6573	0.4959	0.2881
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.6358	0.6514	0.4868	0.2828
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.6319	0.6483	0.4791	0.2785
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.6285	0.6443	0.4710	0.2736
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.6237	0.6403	0.4641	0.2700
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.6208	0.6382	0.4569	0.2653
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.6166	0.6341	0.4493	0.2608
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.6105	0.6303	0.4413	0.2558
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.6071	0.6273	0.4341	0.2513
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.6048	0.6245	0.4294	0.2487

**Tabla D.8.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LFA a pH 6.0.

Concentración [LFA]	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0104	0.0150	0.0034	0.0019
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0166	0.0216	0.0040	0.0021
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0227	0.0292	0.0051	0.0034
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0289	0.0361	0.0050	0.0029
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0339	0.0424	0.0051	0.0029
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0390	0.0486	0.0055	0.0027
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0453	0.0555	0.0060	0.0034
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0500	0.0610	0.0070	0.0034
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0555	0.0677	0.0074	0.0040
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0598	0.0728	0.0072	0.0036

**Tabla D.9.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-NADA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [NADA]	$\lambda = 228$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.5809	0.6168	0.2655	0.4675	0.2728
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.5855	0.6088	0.2603	0.4597	0.2685
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.5900	0.5985	0.2551	0.4509	0.2632
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.5936	0.5890	0.2504	0.4430	0.2586
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.5977	0.5823	0.2467	0.4348	0.2542
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.5976	0.5733	0.2424	0.4290	0.2504
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.6015	0.5660	0.2380	0.4208	0.2459
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.6064	0.5604	0.2364	0.4158	0.2437
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.6083	0.5546	0.2314	0.4081	0.2386
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.6108	0.5443	0.2273	0.4009	0.2345
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.6123	0.5370	0.2229	0.3941	0.2303

**Tabla D.10.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para NADA a pH 6.0.

Concentración [NADA]	$\lambda = 228$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0134	0.0047	0.0020	0.0010	$7 \times 10^{-4}$
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0299	0.0059	0.0011	$1 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0443	0.0077	0.0013	0.0010	0.0016
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0602	0.0115	0.0025	0.0017	0.0015
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0724	0.0121	0.0015	0.0014	0.0013
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0835	0.0132	0.0013	0.0010	$8 \times 10^{-4}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0953	0.0160	0.0019	0.0018	0.0022
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.1082	0.0174	0.0027	0.0026	0.0023
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.1173	0.0182	0.0017	0.0014	0.0013
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.1283	0.0199	0.0017	0.0013	0.0013

**Tabla D.11.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-NALA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [NALA]	$\lambda = 248$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.5661	0.5730	0.2505	0.4475	0.2617
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.5554	0.5642	0.2458	0.4399	0.2565
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.5461	0.5538	0.2417	0.4323	0.2524
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.5380	0.5453	0.2377	0.4242	0.2481
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.5274	0.5353	0.2329	0.4163	0.2437
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.5180	0.5243	0.2281	0.4083	0.2386
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.5088	0.5159	0.2243	0.4014	0.2350
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.5014	0.5081	0.2216	0.3952	0.2312
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.4928	0.4988	0.2168	0.3878	0.2274
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.4850	0.4910	0.2135	0.3820	0.2232
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.4781	0.4841	0.2105	0.3765	0.2202

**Tabla D.12.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para NALA a pH 6.0.

Concentración [NALA]	$\lambda = 248$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	0.0011	$6 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0021	0.0020	0.0014	0.0012	0.0011
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0015	0.0016	$7 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0011	0.0012	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0013	0.0014	$7 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0020	0.0016	$8 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-4}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0029	0.0026	0.0012	0.0013	$8 \times 10^{-4}$
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0024	0.0021	$1 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0021	0.0018	$9 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0041	0.0035	0.0025	0.0025	0.0016

**Tabla D.13.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-DA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [DA]	$\lambda = 228$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 394$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.5807	0.6038	0.2832	0.4695	0.0754	0.2787
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.5735	0.5972	0.2800	0.4649	0.0751	0.2751
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.5670	0.5898	0.2776	0.4604	0.0763	0.2733
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.5594	0.5810	0.2731	0.4519	0.0745	0.2684
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.5503	0.5712	0.2682	0.4450	0.0732	0.2636
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.5412	0.5606	0.2631	0.4372	0.0714	0.2586
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.5336	0.5539	0.2608	0.4317	0.0718	0.2560
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.5274	0.5464	0.2572	0.4255	0.0720	0.2535
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.5189	0.5383	0.2535	0.4189	0.0705	0.2484
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.5132	0.5300	0.2503	0.4125	0.0705	0.2452
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.5081	0.5251	0.2478	0.4083	0.0694	0.2430

**Tabla D.14.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para DA a pH 6.0.

Concentración [DA]	$\lambda = 228$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 394$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0035	0.0014	0.0015	0.0013	0.0012	0.0012
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0068	0.0038	0.0026	0.0016	0.0013	$9 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0063	0.0022	0.0028	0.0028	0.0031	0.0027
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0074	0.0026	0.0019	0.0016	0.0019	0.0018
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0074	0.0026	0.0017	0.0012	0.0015	0.0011
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0089	0.0031	0.0024	0.0021	0.0018	0.0016
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0093	0.0040	0.0029	0.0018	0.0020	0.0016
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0116	0.0029	0.0034	0.0035	0.0031	0.0025
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0128	0.0060	0.0052	0.0046	0.0043	0.0039
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0114	0.0042	0.0035	0.0029	0.0027	0.0025

**Tabla D.15.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LA a pH 6.0,  $[RIFAM] = 2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LA]	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.4636	0.2688
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.4548	0.2638
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.4486	0.2601
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.4388	0.2547
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.4306	0.2495
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.4240	0.2458
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.4173	0.2423
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.4092	0.2371
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.4032	0.2336
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.3969	0.2299
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.3904	0.2266

**Tabla D.16.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LA a pH 6.0.

Concentración [LA]	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
$3.8461 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0014	$9 \times 10^{-4}$
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0010	$3 \times 10^{-4}$
$9.0909 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
$1.0714 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0013	$7 \times 10^{-4}$
$1.3793 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-4}$
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0011	$4 \times 10^{-4}$
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0010	$6 \times 10^{-4}$

**Tabla D.17.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LA a pH 6.0 (intervalo de concentraciones más altas),  $[RIFAM] = 2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LA]	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.4542	0.2644
$9.8039 \times 10^{-4}$	0.4465	0.2616
$1.9230 \times 10^{-3}$	0.4391	0.2565
$2.8301 \times 10^{-3}$	0.4385	0.2559
$3.7037 \times 10^{-3}$	0.4266	0.2501
$4.5454 \times 10^{-3}$	0.4194	0.2448
$5.3571 \times 10^{-3}$	0.4121	0.2397
$6.1403 \times 10^{-3}$	0.4064	0.2377
$6.8965 \times 10^{-3}$	0.4030	0.2357
$7.6271 \times 10^{-3}$	0.3978	0.2319
$8.3333 \times 10^{-3}$	0.3894	0.2269

**Tabla D.18.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LA a pH 6.0.

Concentración [LA]	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$9.8039 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
$1.9230 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$
$2.8301 \times 10^{-3}$	0.0013	0.0011
$3.7037 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
$4.5454 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$
$5.3571 \times 10^{-3}$	0.0012	0.0015
$6.1403 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$
$6.8965 \times 10^{-3}$	$-3 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$
$7.6271 \times 10^{-3}$	$7 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
$8.3333 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$

**Tabla D.19.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LTIR a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LTIR]	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.6212	0.2856
$1.7825 \times 10^{-4}$	0.6720	0.2799
$3.4965 \times 10^{-4}$	0.7129	0.2754
$5.1457 \times 10^{-4}$	0.7618	0.2726
$6.7340 \times 10^{-4}$	0.8096	0.2657
$8.2644 \times 10^{-4}$	0.8544	0.2629
$9.7402 \times 10^{-3}$	0.8962	0.2570
$1.1164 \times 10^{-3}$	0.9350	0.2534
$1.2538 \times 10^{-3}$	0.9701	0.2492
$1.3867 \times 10^{-3}$	1.0040	0.2464
$1.5150 \times 10^{-3}$	1.0380	0.2418

**Tabla D.20.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LTIR a pH 6.0.

Concentración [LTIR]	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.7825 \times 10^{-4}$	0.0270	$6 \times 10^{-4}$
$3.4965 \times 10^{-4}$	0.0888	0.0013
$5.1457 \times 10^{-4}$	0.1332	0.0017
$6.7340 \times 10^{-4}$	0.1831	0.0011
$8.2644 \times 10^{-4}$	0.2362	0.0036
$9.7402 \times 10^{-3}$	0.2798	0.0026
$1.1164 \times 10^{-3}$	0.3328	0.0027
$1.2538 \times 10^{-3}$	0.3693	0.0023
$1.3867 \times 10^{-3}$	0.4247	0.0021
$1.5150 \times 10^{-3}$	0.4771	0.0037

**Tabla D.21.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LDHFA a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LDHFA]	$\lambda = 250$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.5642	0.5713	0.4466	0.2631
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.6020	0.6243	0.4402	0.2571
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.6336	0.6674	0.4351	0.2541
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.6730	0.7184	0.4338	0.2543
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.7149	0.7719	0.4272	0.2506
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.7395	0.8106	0.4157	0.2444
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.4668	0.8475	0.4102	0.2394
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.8043	0.8994	0.4020	0.2352
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.8242	0.9258	0.3966	0.2324
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.8529	0.9654	0.3931	0.2305
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.8820	1.0040	0.3862	0.2263

**Tabla D.22.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LDHFA a pH 6.0.

Concentración [LDHFA]	$\lambda = 250$ nm	$\lambda = 256$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0423	0.0542	$-9 \times 10^{-4}$	-0.0011
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0755	0.0969	$3 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-5}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.1198	0.1539	$4 \times 10^{-4}$	$-3 \times 10^{-4}$
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.1716	0.2218	$7 \times 10^{-4}$	$-3 \times 10^{-4}$
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.2043	0.2650	0.0013	$9 \times 10^{-4}$
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.2380	0.3075	$8 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-5}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.2872	0.3715	0.0034	0.0019
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.3247	0.4185	0.0020	$9 \times 10^{-4}$
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.3553	0.4574	0.0029	0.0016
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.3906	0.5024	0.0026	0.0018

**Tabla D.23.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-LTRIP a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [LTRIP]	$\lambda = 300$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.2672	0.4577	0.2666
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.3013	0.4575	0.2653
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.3994	0.4489	0.2600
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.4545	0.4445	0.2572
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.4837	0.4431	0.2567
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.5582	0.4371	0.2533
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.6305	0.4311	0.2494
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.6867	0.4272	0.2469
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.7363	0.4210	0.2431
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.9883	0.4002	0.2301
$1.6666 \times 10^{-3}$	1.0530	0.3958	0.2278

Tabla D.24. Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para LTRIP a pH 6.0.

Concentración [LTRIP]	$\lambda = 300$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0972	0.0013	$1 \times 10^{-3}$
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.1996	0.0020	0.0011
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.3012	0.0064	0.0042
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.3920	0.0032	0.0016
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.4779	0.0040	0.0016
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.5567	0.0052	0.0027
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.6376	0.0087	0.0047
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.7122	0.0058	0.0019
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.7795	0.0057	0.0016
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.8462	0.0073	0.0028

Tabla D.25. Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-TEO a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [TEO]	$\lambda = 306$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.2995	0.4478	0.2476
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.2972	0.4429	0.2451
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.2943	0.4348	0.2407
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.2930	0.4304	0.2388
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.2915	0.4253	0.2359
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.2878	0.4193	0.2324
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.2867	0.4142	0.2303
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.2823	0.4080	0.2257
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.2791	0.3995	0.2214
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.2775	0.3943	0.2190
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.2743	0.3875	0.2159

Tabla D.26. Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para TEO a pH 6.0.

Concentración [TEO]	$\lambda = 306$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0036	0.0018	0.0029
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.0045	0.0011	0.0014
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0067	0.0012	0.0015
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0088	0.0019	0.0025
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0107	0.0020	0.0024
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0109	0.0013	0.0012
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0122	0.0013	0.0013
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0153	0.0029	0.0021
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0176	0.0038	0.0033
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0202	0.0047	0.0037

**Tabla D.27.** Absorbancias a una  $\lambda$  para la mezcla RIFAM-INO a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [INO]	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.2471
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.2445
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.2387
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.2361
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.2336
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.2309
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.2288
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.2223
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.2198
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.2174
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.2156

**Tabla D.28.** Absorbancias a una  $\lambda$  para INO a pH 6.0.

Concentración [INO]	$\lambda = 474$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0016
$3.8461 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0013
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.0031
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0011
$1.0714 \times 10^{-3}$	$7 \times 10^{-4}$
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0022
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0027
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0022
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0019

**Tabla D.29.** Absorbancia a una  $\lambda$  para la mezcla RIFAM-CAF a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [CAF]	$\lambda = 334$ nm
0.0	0.4523
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.4434
$3.8461 \times 10^{-4}$	0.4330
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.4239
$7.4074 \times 10^{-4}$	0.4163
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.4091
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.4004
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.3921
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.3863
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.3794
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.3743

**Tabla D.30.** Absorbancias a una  $\lambda$  para CAF a pH 6.0.

Concentración [CAF]	$\lambda = 334$ nm
$1.9607 \times 10^{-4}$	0.0035
$3.8461 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
$5.6603 \times 10^{-4}$	0.0011
$7.4074 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$
$9.0909 \times 10^{-4}$	0.0020
$1.0714 \times 10^{-3}$	0.0023
$1.2280 \times 10^{-3}$	0.0014
$1.3793 \times 10^{-3}$	0.0024
$1.5254 \times 10^{-3}$	0.0016
$1.6666 \times 10^{-3}$	0.0021

**Tabla D.31.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-ADE a pH 6.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.2808	0.4515	0.2518
$9.8039 \times 10^{-5}$	0.2779	0.4447	0.2481
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.2739	0.4360	0.2433
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.2703	0.4292	0.2399
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.2662	0.4203	0.2347
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.2636	0.4140	0.2309
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.2594	0.4063	0.2267
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.2570	0.3999	0.2235
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.2535	0.3932	0.2197
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.2505	0.3871	0.2161
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.2477	0.3815	0.2129

**Tabla D.32.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para ADE a pH 6.0.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 474$ nm
$9.8039 \times 10^{-5}$	0.0022	$7 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.0033	$1 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-4}$
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.0040	$9 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.0056	0.0011	0.0011
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.0063	0.0014	0.0014
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.0071	0.0013	0.0014
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.0082	0.0014	0.0016
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.0092	0.0014	0.0014
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.0107	0.0019	0.0017
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.0109	0.0016	0.0015

**Tabla D.33.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-ADE a pH 5.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm
0.0	0.2559	0.3869
$9.8039 \times 10^{-5}$	0.2535	0.3792
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.2517	0.3722
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.2515	0.3669
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.2453	0.3574
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.2436	0.3524
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.2408	0.3453
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.2380	0.3396
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.2357	0.3339
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.2346	0.3290
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.2325	0.3238

**Tabla D.34.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para ADE a pH 5.0.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm
$9.8039 \times 10^{-5}$	0.0039	0.0019
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.0035	0.0013
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.0055	0.0018
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.0066	0.0015
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.0084	0.0019
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.0111	0.0030
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.0117	0.0030
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.0153	0.0047
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.0175	0.0058
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.0197	0.0070

**Tabla D.35.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para la mezcla RIFAM-ADE a pH 8.0, [RIFAM] =  $2 \times 10^{-5}$  M.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 392$ nm	$\lambda = 474$ nm
0.0	0.2785	0.4143	0.0677	0.2279
$9.8039 \times 10^{-5}$	0.2751	0.4054	0.0667	0.2239
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.2714	0.3981	0.0659	0.2202
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.2683	0.3921	0.0651	0.2164
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.2669	0.3875	0.0655	0.2146
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.2639	0.3816	0.0647	0.2112
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.2587	0.3732	0.0620	0.2059
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.2594	0.3708	0.0641	0.2052
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.2530	0.3622	0.0608	0.2002
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.2499	0.3566	0.0605	0.1972
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.2458	0.3499	0.0585	0.1933

Tabla D.36. Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's para ADE a pH 8.0.

Concentración [ADE]	$\lambda = 296$ nm	$\lambda = 334$ nm	$\lambda = 392$ nm	$\lambda = 474$ nm
$9.8039 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-3}$	$-2 \times 10^{-4}$	$-6 \times 10^{-4}$	$-2 \times 10^{-4}$
$1.9230 \times 10^{-4}$	0.0031	$9 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	0.0016
$2.8301 \times 10^{-4}$	0.0041	0.0011	$7 \times 10^{-4}$	0.0019
$3.7037 \times 10^{-4}$	0.0042	$3 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	0.0011
$4.5454 \times 10^{-4}$	0.0060	0.0014	$1 \times 10^{-3}$	0.0024
$5.3571 \times 10^{-4}$	0.0071	0.0011	$8 \times 10^{-4}$	0.0020
$6.1403 \times 10^{-4}$	0.0065	$3 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-3}$
$6.8965 \times 10^{-4}$	0.0078	$6 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	0.0014
$7.6271 \times 10^{-4}$	0.0102	0.0021	0.0017	0.0026
$8.3333 \times 10^{-4}$	0.0147	0.0055	0.0046	0.0056

**Tabla D.37.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's resultado de la titulación de RIFAM con NaOH 2 M,  $[RIFAM] = 4 \times 10^{-5}$  M.

pH	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm
2.06	0.6049	0.6068	0.5822
2.30	0.6104	0.6136	0.5878
2.60	0.6208	0.6250	0.5974
2.90	0.6310	0.6349	0.6079
3.21	0.6319	0.6356	0.6083
3.51	0.6258	0.6310	0.6044
3.80	0.6261	0.6310	0.6049
4.11	0.6254	0.6318	0.6070
4.40	0.6200	0.6218	0.6042
4.70	0.6154	0.6257	0.6032
5.00	0.6122	0.6234	0.6033
5.30	0.6107	0.6230	0.6051
5.60	0.6080	0.6206	0.6057
5.90	0.5999	0.6134	0.5997
6.21	0.6007	0.6131	0.6013
6.50	0.5977	0.6101	0.6007
6.80	0.5986	0.6103	0.6013
7.10	0.5893	0.6010	0.5926
7.40	0.5869	0.5974	0.5886
7.70	0.5850	0.5951	0.5844
8.02	0.5842	0.5940	0.5820
8.30	0.5865	0.5958	0.5825
8.62	0.5820	0.5908	0.5760
8.90	0.5832	0.5920	0.5769
9.21	0.5827	0.5904	0.5743
9.50	0.5832	0.5916	0.5751
9.83	0.5838	0.5909	0.5739
10.11	0.5770	0.5837	0.5675
10.40	0.5745	0.5817	0.5655
10.70	0.5780	0.5848	0.5693
11.00	0.5771	0.5841	0.5696
11.30	0.5809	0.5878	0.5737
11.60	0.5811	0.5866	0.5736
11.91	0.5844	0.5876	0.5754

**Tabla D.38.** Absorbancias a diferentes  $\lambda$ 's resultado de la retitulación de RIFAM con HCl 4 M,  $[\text{RIFAM}] = 4 \times 10^{-5}$  M.

pH	$\lambda = 232$ nm	$\lambda = 236$ nm	$\lambda = 256$ nm
11.02	0.5798	0.5814	0.5654
9.92	0.5720	0.5757	0.5590
9.11	0.5642	0.5697	0.5548
7.91	0.5592	0.5645	0.5522
6.98	0.5608	0.5660	0.5534
6.00	0.5694	0.5738	0.5495
4.89	0.5774	0.5787	0.5401
3.99	0.5895	0.5847	0.5384
2.89	0.5875	0.5793	0.5301
2.03	0.5726	0.5617	0.5087



## 10. Bibliografía

- Abraham, M. H. [1982]. Free energies enthalpies, and entropies of solution of gaseous nonpolar nonelectrolytes in water and nonaqueous solvents. The hydrophobic effect. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 2085-2094 (y referencias citadas allí).
- Abraham, M. H., Grellier, P. L., McGill, R. A. [1988]. A quantitative measure of solvent solvophobic effect. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 339-345.
- Adams, S. P., Whitlock, H. W. [1982]. Synthesis, conformation, and complexation behavior of 2,9,18,25-tetraoxa-33,34,35,36 tetrakis(acyloxymethyl)[8,8]-(1,4) naphthalenophanes. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1602-1611.
- Armstrong, D. W., Rundlett, K., Reid III, G. L. [1994a]. Use of a macrocyclic antibiotic, Rifamicin B, and indirect detection for the resolution of racemic amino alcohols by CE. *Anal. Chem.* **66**, 1690-1695.
- Armstrong, D. W., Tang, T., Chen, Sh., Zhou, Y., Bagwill, C., Chen, J.-R. [1994b]. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **66**, 1473-1484.
- Askew, B. [1990]. The design and synthesis of macrobicyclic hosts featuring convergent functional groups. *Tetrahedron Lett.* **31**, 4245-4248.
- Atwood, J. L., Holman, K. T., Streed, J. W. [1996]. Laying traps for elusive prey: recent advances in the non-covalent binding of anions. *Chem. Commun.* 1401-1407.
- Barlow, R. B. [1982]. The ionisation of morphine, hydroxyamphetamine and (+)-tubocurarine chloride and a new method of calculating zwitterion constants. *Brit. J. Pharm.* **75** (3), 503-512.
- Barza, P. [1972]. Analytical study of rifampicin. II. Behavior of rifampicin towards some metallic ions frequently encountered in analytical practice. *Farmacia (Bucharest)* **20**, 499-506.
- Barza, P. [1973]. Analytical study of rifampicin. III. Behavior of rifampicin in the presence of iron (3+) and aluminum (3+) ions from chlorides. *Farmacia (Bucharest)* **21**, 273-280.
- Ba-Saif, S., Luthra, A. K., Williams, A. [1987]. Concertedness in acyl group transfer in solution: a single transition state in acetyl group transfer between phenolate ion nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6362-6368.
- Basosi, R., Pogni, R., Tiezzi, E., Antholine, W. E., Moscinski, L. C. [1987]. Biomolecular dynamics and electron spin resonance spectra of copper complexes of antitumour agents in solution. Part 2. Rifamycins, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **83**, 3675-3682.
- Beck, J. Gerlach H., Prelog, V., Voser, W. [1962]. 74. Stoffwechselprodukte von actinomyceten. Über die konstitution der makrotetrolide monactin, dinactin und trinactin. *Helv. Chim. Acta.* **45**, 620-630.
- Behr, J. P., Lehn, J. M. [1976]. Molecular dynamics of  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 1743-1747.

- Bencini, A., Bianchi, A., Burguete, M. I., García-España E., Luis, S. V., Ramírez, J. A. [1992]. Remarkable shape selectivity in the molecular recognition of carboxylate anions in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1919-1920.
- Bender, M. L., Komiyama, M. [1978]. *Cyclodextrin Chemistry*. Springer, Berlin.
- Bergeron, R. J. [1977]. Cycloamyloses. *J. Chem. Edu.* 204-207.
- Bianchi, A., Micheloni, M., Paoletti, P. [1991]. Thermodynamic aspects of polyazacycloalkane complex with cations and anions. *Coord. Chem. Rev.* **110**, 17-113.
- Boehm, R. [1897]. *Arch. Pharm.* **235**, 660.
- Böhmer, V. [1995]. Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 713-745.
- Bockris, J. O'M, Reddy, A. K. N. [1970]. *Modern Electrochemistry*. Plenum, New York.
- Breslow, R. [1971]. Enzyme models. *Advan. Chem. Ser.* **100**, 21-43.
- Bresolle, F., Audran, M., Pham, T. N., Vallon, J. J. [1996]. *J. Chromat. B*, **687**, 303.
- Brufani, M., Fedeli, W., Giacomello, G., Vaciago, A. [1964]. The X-ray analysis of the structure of rifamycin B. *Experientia* **20**, 339-342.
- Buckingham, A. D. [1978]. En *Intermolecular Interactions: From Diatomics to Biopolymers*. Wiley, New York, p. 20.
- Burley, S. K., Petsko, G. A. [1985]. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* **229**, 23-28.
- Burley, S. K., Petsko, G. A. [1986]. Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Lett.* **203**, 139-143.
- Burley, S. K., Petsko, G. A. [1988]. Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* **39**, 125-189.
- Buss, W. C., Reyes, E., Barela, T. D. [1977]. Metal ion catalyzed oxidation of the antibiotic rifampicin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **17**, 547-550.
- Buss, W. C., Morgan, R., Guttman, J., Barela, T., Stalter, K. [1978]. Rifampicin inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* **200**, 432-434.
- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L., Tecce, G. [1965]. Effect of rifamycin on protein synthesis. *Nature* 417-418.
- Canceilli, J., Cesario, M., Collet, A., Guilhem, J., Lacombe, L., Lozach, B., Pascard, C. [1989]. Structure and properties of cryptophane-E/CHCl<sub>3</sub> complex, a stable van der Waals molecule. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 1246-1248.
- Casey, M. L., Whitlock, H. W. [1975]. Determination of the solution conformation of rifamycin S and derivatives by nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6231-6236.
- Chang, S. K., Hamilton, A. D. [1988]. Molecular recognition of biologically interesting substrates; synthesis of an artificial receptor for barbiturates employing six hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1318-1319.
- Chapman, K. T., Still, W. C. [1989]. A remarkable effect of solvent size on the stability of a molecular complex. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3075-3077 (y referencias citadas allí).
- Chotia, C. [1975]. Structural invariants in protein folding. *Nature* **254**, 304-308.

- Claverie, P. [1978]. En *Intermolecular Interactions: From Diatomics to Biopolymers*, Wiley, New York, p. 167 (y referencias citadas allí).
- Codding, P. W., James, M. N. G. [1973]. Crystal and molecular structure of a potent neuromuscular blocking agent d-tubocurarine dichloride pentahydrate. *Acta Cryst.* **B29**, 935-942.
- Connors, K. A., Infeld, M. H., Kline, B. J. [1969]. Interactant structure and complex stability for complexes of theophylline with cinnamate esters and related compounds in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3597-3077 (y referencias citadas allí).
- Connors, K. A., Sun, S. [1971]. The stability of some molecular complexes in aqueous mixed solvents. Correlation with solvent surface tension. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 7239-7244.
- Connors, K. A. [1987]. *The Measurement of Molecular Complex Stability*. John Wiley & Sons, USA.
- Cordell, G. A. [1981]. *Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach*. John Wiley & Sons, USA, pp. 349-365.
- Costas, M., Kronberg, B., Silveston, R. [1994]. General thermodynamic analysis of the dissolution of non polar molecules into water. *J. Chem. Faraday Trans.* **90**, 1513-1522.
- Covington, A. K., Paabo, M., Robinson, R. A., Bates, R. G. [1968]. Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD ( $p_{aD}$ ) scale and the operational pH in heavy water. *Anal. Chem.* **40**, 700-706.
- Cram, D. J., Cram, J. M. [1974]. Host-guest chemistry. *Science* **183**, 803-809.
- Cudic, P., Zinic, M., Tomisic, V., Simeon, V., Vigneron, J. P., Lehn, J. M. [1995]. Binding of nucleotides in water by phenanthridinium bis(intercalated) receptor molecules. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1073-1075.
- Dean, J. A. [1992]. *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill, USA, pp. 8.12, 8.105, 8.110.
- Delgado, R., Frausto da Silva, J. J. R., Amorim, M. T. S., Cabral, M. F., Chaves, S., Costa, J. [1991]. Dissociation constants of Bronsted acids in heavy water: studies of polyaza and polyoxa-polyaza macrocycles and general correlation. *Anal. Chim. Acta* **245**, 271.
- Diederich, F., Dick, K. [1984]. A new water-soluble macrocyclic host of the cyclophane type: host-guest complexation with aromatic guests in aqueous solution and acceleration of the transport of arenes through an aqueous phase. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8024-8036.
- Diederich, F., Griebel, D. [1984].  $^1\text{H}$  NMR investigations of host-guest complexation between a macrocyclic host of the cyclophane type and aromatic guests in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8037-8046.
- Diederich, F., Dick, K., Griebel, D. [1986]. Complexation of arenes by macrocyclic hosts in aqueous and organic solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2273-2286.
- Diederich, F. [1988]. Complexation of neutral molecules by cyclophane hosts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 362-386.

- Dietrich, J. M., Lehn, J.-M., Sauvage, J.-P. [1969]. Diaza-polyoxa-macrocycles et macrobicycles. *Tetrahedron Lett.* 2885-2888.
- Dietrich, J. M., Lehn, J.-M., Sauvage, J.-P., Blanzat, J. [1973a]. Cryptates X. Synthèses et propriétés physiques de systèmes diaza-polyoxa-macrobicycliques. *Tetrahedron* **29**, 1629-1645.
- Dietrich, J. M., Lehn, J.-M., Sauvage, J.-P. [1973b]. Cryptates XI. Complexes macrobicycliques formation, structure and properties. *Tetrahedron* **29**, 1647-1658.
- Dietrich, B., Hosseini, M. W., Lehn, J.-M., Sessions, R. B. [1981]. Anion receptor molecules. Synthesis and anion-binding properties of polyammonium macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1282-1283.
- Dietrich, B., Guilhen, J., Lehn, J.-M., Pascard, C., Sonueaux, E. [1984]. 11. Molecular recognition in anion coordination chemistry. Structure, binding constants and receptors-substrate complementarity of a series of anion cryptates of a macrobicyclic receptor molecule. *Helv. Chim. Acta* **67**, 91-104.
- Dill, K. A. [1990]. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Dougherty, D. A., Stauffer, D. A. [1990]. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science* **250**, 1558-1560.
- Dougherty, D. A. [1996]. Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr and Trp. *Science* **271**, 163-168.
- Dutcher, J. D. [1946]. Curare alkaloids from *Chondodendron tomentosum* Ruiz and Pavon. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 419-424.
- Echevarren, A., Galán, A., Lehn, J.-M. De Mendoza, J. [1989]. Chiral recognition of aromatic carboxylate anions by an optically active abiotic receptor containing a rigid guanidinium binding subunit. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4994-4995.
- Eftink, M. R., Andy, M. L., Bystrom, K., Perlmutter, H. D., Kristol, D. S. [1989]. Cyclodextrin inclusion complexes: studies of the variation in the size of alicyclic guests. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6765-6772.
- Egan, R. S., Stanaszek, R. S., Williamson, D. E. [1973]. Solution conformation of (+)-tubocurarine chloride. *J. Chem. Soc. Perkin II* 716-717.
- Everett, A. J., Lowe, L. A., Wilkinson, S. [1970]. Revision of the structure of (+)-tubocurarine chloride and (+)-chondrocurine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1020-1021.
- Fabrizzi, L., Poggi, A. [1995]. Sensors and switches from supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **24**, 197-202.
- Fabrizzi, L., Licchelli, M., Pallavicini, P., Parodi, L., Poggi, A., Taglietti A. [1996]. En *Physical Supramolecular Chemistry*. L. Echegoyen y A. E. Kaifer (Eds.), Kluwer Publ.
- Fanali, S. [1996]. Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. *J. Chromat.* **735**, 77-21.
- Ferguson, S. B., Seward, E. M., Sanford, E. M., Hester, M., Uyeki, M., Diederich, F. [1989]. Molecular recognition by cyclophane hosts. *Pure & Appl. Chem.* **61**, 1523-1528.

- Ferguson, S. B., Sanford, E. M., Seward, E. M., Diederich, F. [1991]. Cyclophane-arene inclusion complexation in protic solvents: solvent effects versus electron donador-acceptor interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5410-5419.
- Fernández-Prine, R. [1968]. Slightly associated electrolytes. Prediction of thermodynamic properties from conductance data. *Trans. Farad. Soc.* **64**, 2146-2152.
- Fernández-Prine, R., Justice, J. C. [1984]. Evaluation of the solubility of electrolytes from conductivity measurements. *Pure & Appl. Chem.* **56**, 541-547.
- Fersht, A. R. [1985]. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd Ed., Freeman, New York.
- Finkel, J. M., Pittillo, R. F., Mellett, L. B. [1971]. Fluorometric and microbiological assays for rifampicin and the determination of serum levels in the dog. *Chemotherapy* **16**, 380-388.
- Fuoss, R. M. [1958]. Ion association. III The Equilibrium between ion pairs and free ions. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5059-5061.
- Fuoss, R. M., Hsia, K.-L. [1967]. Association of 1-1 salts in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1550-1557.
- Fraenkel, Y., Gershoni, J. M., Navon, G. [1994]. NMR analysis reveals a positively charged hydrophobic domain as a common motif to bound acetylcholine and d-tubocurarine. *Biochemistry* **33**, 644-650.
- Frank, H. S., Evans, M. W. [1945]. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J. Chem. Phys.* **13**, 507-532.
- Frank, J., Merz, F., Lorensky, H. W., Müller, W. M., Werner, W., Vógtle, F. [1985]. *J. Incl. Phenom.* **3**, 471.
- Frankewich, R. A., Thimmaiah, K. N., Hinze, W. L. [1991]. Evaluation of the relative effectiveness of different water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin media to function as fluorescence enhancement agents. *Anal. Chem.* **63**, 2924-2933.
- Frontali, L., Tecce, G. [1967]. Rifamycins. *Antibiotics* **1**, 415-426.
- Gadret, P. M., Goursolle, M., Leger, J. M., Colleter, J. C. [1975]. Structure cristalline de la rifampicine  $C_{43}N_4O_{12}H_{58} \cdot 5H_2O$ . *Acta Cryst.* **B31**, 1454-1462.
- Galal, S. M., Blain, S. M., Abdel-Hamid, M. E. [1992]. Comparative spectrophotometric analysis of rifampicin by chelate formation. *Anal. Lett.* **25**, 725-743.
- Galán, A., Andreu, D., Echavarren, A. M., Prados, P., De Mendoza, J. [1992]. A receptor for the enantioselective recognition of phenylalanine and tryptophan under neutral conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1511-1512 (y referencias citadas allí).
- Gallo, G. G., Chiesa, L., Sensi, P. [1962]. Rifamycin. XXIV (1) Amperometric titrations of rifamycin B, rifamycin O, rifamycin S and rifamycin SV. *Farmaco (Pavia) Ed. Sci.* **17**, 668-678.
- Gallo, G. G., Radaelli, O. [1976]. Rifampin. *Analyts Profiles of Drug Substances* **5**, 467-513.
- Galster, H. [1991]. *pH Measurement Fundamentals, Methods, Application, Instrumentation*, VCH, Weinheim (Rep. Fed. de Alemania), p. 261.

- Gelb, R. I., Schwartz, L. M. [1989]. Complexation of carboxylic acids and anions by alpha and beta cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. and Mol. Reconig. Chem.* **7**, 465-476.
- Graf, E., Lehn, J.-M. [1976]. Anion cryptates: highly stable and selective macrocyclic anion inclusion complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 6403-6405.
- Grove, J. F. [1993]. Macrocyclic trichothecenes. *Natural Prod. Reports* **10**, 429-448.
- Gibson, E. P., Tumbull, J. H. [1979]. Luminescent characteristics of tubocurarine chloride. *Analyst (London)* **104**(1239), 582-583.
- Giunchi, G. [1963]. The rifamycins. *Antibiot. Chemotherapy* **11**, 61-83.
- Godoy-Alcántar, C., Eliseev, A. V., Yatsimirsky, A. K. [1995]. Binding of organic anions to a macrocyclic alkaloid d-tubocurarine. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **5**, 2993-2998.
- Godoy-Alcántar, C., Eliseev, A. V., Yatsimirsky, A. K. [1996]. Molecular recognition by natural macrocycles. I. d-Tubocurarine as a host molecule for organic anions. *J. Mol. Reconig.* **9**, 54-64.
- Gutsche, C. D., Alam, I. [1988]. Calixarenes. 23. The complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes. *Tetrahedron* **44**, 4689-4694.
- Gutsche, C. D. [1989]. *Calixarenes*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Hamilton, A. D., Pant, N., Muehldorf, A. [1988]. Artificial receptors for biologically active molecules. *Pure & Appl. Chem.* **60**, 533-538.
- Hamilton, A. D. [1990]. Molecular recognition. Design and synthesis of artificial receptors employing directed hydrogen bonding interactios. *J. Chem. Educ.* **67**, 821-828.
- Harris, D. A., Bashford C, L. (Eds.) [1987]. *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry a Practical Approach*. IRL Press, England, p. 16.
- Harrison, J. C., Eftink, M. R. [1982]. Cyclodextrin-adamantane carboxylate inclusion complexes: a model system for hydrophobic effect. *Biopolymers* **21**, 1153-1166.
- Hawthorne, M. F., Yang, X., Zheng, Z. [1994]. Host-guest chemistry of anion-complexation by macrocyclic multidentate Lewis acids. *Pure & Appl. Chem.* **66**, 245-254.
- Hilgenfeld, R., Saenger, W. [1982]. Stetters complexes are no intramolecular inclusion compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21**, 787-788.
- Hosseini, M. W., Lehn, J.-M. [1982]. Anion receptor molecules. Chain length dependent selective binding of organic and biological dicarboxylate anions by ditopic polyammonium macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 3525-3527.
- Hosseini, M. W., Lehn, J.-M., Mertes, M. P. [1983]. Efficient molecular catalysis of ATP-hydrolysis by protonated macrocyclic polyamines. *Helv. Chim. Acta.* **66**, 2454-2466.
- Huggins, C. M., Pimentel, G. C., Shoolery J. N. [1955]. Proton magnetic resonance studies of chloroform in solution: evidence for hydrogen bonding. *J. Chem. Phys.* **23**, 1244-1247.
- Hunter, Ch. A., Sanders, J. K. M. [1990]. The nature of  $\pi$ - $\pi$  interactios. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5525-5534.

- Israelachvili, J. N. [1985]. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, Great Britain.
- Izatt, R. M., Pawlak, K., Bradshaw, J. S. [1991]. Thermodynamic and kinetic data for macrocycle interaction with cations and anions. *Chem. Rev.* **91**, 1721-2085.
- Jarvi, E. T., Whitlock, H. W. Jr. [1980]. Synthesis and characterization of 1,8,15,22-tetraoxa[8.8]-paracyclophane-3,5,17,19-tetrayne-10,25-dicarboxylic acid, a novel water soluble and donut-shaped molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 657-662.
- Jarvi, E. T., Whitlock, H. W. [1982]. 1,8,17,24 tetraoxa[8.8] (2,6)-naphthalenophane-3,5,19,21-tetrayne-10,30-dicarboxylic acid derivatives, novel complexors of aromatic guests. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7196-7204.
- Jazwinski, J., Lehn, J.-M., Lilienbaum, D., Ziessel, R., Guilhem, J., Pascard, C. [1987]. Polyaza macrobicyclic cryptands: synthesis, crystal structures of a cyclophane type macrobicyclic cryptand and of its dinuclear Cu(I) cryptate, and anion binding features. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1691-1694.
- Jencks, W. P. [1989]. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw Hill, New York.
- Jones, J. E. [1924]. The determination of molecular fields (I) from the variation of the viscosity of a gas with temperature. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* **106A**, 441-462.
- Kanaoka, Y. [1977]. Organic fluorescence reagents in the study of enzymes and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16**, 137-147.
- Karlström, G., Linse, P., Wallqvist, A., Jonsson, B. [1983]. Intermolecular potentials for the H<sub>2</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> and the C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> systems calculated in an ab initio SCF CI approximation. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3777-3782.
- Kauzmann, W. [1959]. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
- Kawakami, H., Yoshino, O., Odashima, K., Koga, K. [1985]. Design, synthesis, and properties of novel water-soluble cyclophanes having naphthylphenylmethane units as hosts for aliphatic and aromatic guests. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5610-5613.
- Keserü, G. M., Nógrádi, M. [1995]. The chemistry of macrocyclic bis(bibenzyls). *Natural Prod. Reports* **12**, 69-75.
- Kim, K. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Ha, T. K., Kim, D. H. [1994]. On binding forces between aromatic ring and quaternary ammonium compound. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7399-7400.
- Kimura, E., Watanabe, A., Kodama, M. [1983]. A catechol receptor model by macrocyclic polyamines. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2063-2066.
- King, H. [1935]. 330. Curare alkaloids. Part I. Tubocurarine. *J. Chem. Soc.* 1381-1389.
- King, H. [1936]. 273. Curare alkaloids. Part II. Tubocurarine and bebeerine. *J. Chem. Soc.* 1276-1279.
- Kono, K. T. [1989]. JP0193, 590.
- Kumar, K. P., Chatterji, D. [1990]. Resonance energy transfer study on the proximity relationship between the GTP binding site and the rifampicin binding site of *Escherichia coli* RNA Polymerase. *Biochemistry* **29**, 317-322.

- Kumar, K. P., Reddy, P. S., Chatterji, D. [1992]. Proximity relationship between the active site of *Escherichia coli* RNA polymerase and rifampicin binding domain: a resonance energy-transfer study. *Biochemistry* **31**, 7519-7526.
- Lai, C. F., Odashima K., Koga, K. [1985]. Synthesis and properties of water-soluble bis-para cyclophanes. *Tetrahedron Lett.* **26**, 5179-5182.
- Lachau, S., Rochas, M. A., Tufenkji, A. E., Martin, N., Levillain, P., Houin, G. [1992]. First-derivative spectroscopic determination of binding characteristics of rifampicin to human albumin and serum. *J. Pharm. Sci.* **81**, 287-289.
- Lehn J.-M. [1973]. Design to organic complexing agents. Strategies towards properties. *Struct. Binding (Berlin)* **16**, 1-69.
- Lehn J.-M., Simon, J., Wagner, J. [1973]. Mesomolecules. Polyaza-polyoxa macropolycyclic systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **12**, 578-579.
- Lehn J.-M. [1978]. Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules. *Pure & Appl. Chem.* **50**, 871-892.
- Lehn J.-M. [1983]. *Biomimetic Chemistry*. Eds. Z. I. Yoshida, N. Ise. Elsevier, New York, pp. 163-187.
- Lehn J.-M. [1985]. Supramolecular chemistry: receptors, catalysts, and carriers. *Science* **227**, 849-856.
- Lehn J.-M. [1990]. Perspectives in supramolecular chemistry -from molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 1304-1319.
- Lehn, J.-M., Méric, R., Vigneron, J. P., Bkouche-Waksman, I. Pascard, C. [1991]. Molecular recognition of anionic substrates binding carboxylates by a macrobicyclic coreceptor and crystal structure of its supramolecular cryptate with the terephthalate dianion. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 62-64.
- Lehn, J.-M. [1995]. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*. VCH, Weinheim (y referencias citadas allí).
- Leibfritz, D. [1974]. Nachweis spezifischer calcium- und natriumkomplexierung durch das antibiotikum rifamycin S mit hilfe der C-13 NMR-spektroskopie. *Tetrahedron Letters* 4125-4128.
- Leitich, J., Oppolzer, W., Prelog, V. [1964]. Über die konfiguration des rifamycins B und verwandter rifamycine. *Experientia* **20**, 343-344.
- Leo, A., Hanch, C., Elkins, D. [1971]. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71**, 525-616.
- Lewis, J. R. [1994]. Muscarine, oxazole, imidazole, thiazole, and peptide alkaloids, and other miscellaneous alkaloids. *Natural Prod. Reports* **11**, 395-418.
- Lienhard, G. E. [1973]. Enzymatic catalysis and transition state theory. *Science* **180**, 149-154.
- Lindoy, L. F. [1989]. *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*. Cambridge University Press, Great Britain, p. 1, 164-167.
- Linert, W. [1994]. Mechanistic and structural investigations based on the isokinetic relationship. *Chem. Soc. Rev.*, 429-438.
- London, F. [1937]. The general theory of molecular forces. *Trans. Faraday Soc.* **33**, 8-26.

- Lowe, M. J., Schellman, J. A. [1972]. Solvent effects on dinucleotide conformation. *J. Mol. Biol.* **65**, 91-109.
- Lurie, J. [1975]. *Handbook of Analytical Chemistry*. Mir Publishers, Union of Soviet Socialist Republics, p. 259.
- Maggi, N., Arioli, V., Sensi, P. [1965a]. Rifamycins. XLI. A new class of active semisynthetic rifamycins N-substituted aminomethyl derivatives of rifamycin SV. *J. Med. Chem.* **8**, 790-793.
- Maggi, N., Pallanza, R., Sensi, R. [1965b]. New derivatives of rifamycin SV. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 765-769.
- Maggi, N., Pasqualucci, C. R., Ballota, R., Sensi, P. [1966]. Rifaldazine: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy* **11**, 285-292.
- Maggi, N., Gallo, G. G., Sensi, P. [1967]. Synthesis of 3-formilrifamycin SV. *Farmaco (Pavia) Ed. Sci.* **22**, 316-325.
- Maggi, N., Vigevani, A., Pallanza, R. [1968a]. Desacetyl-rifamycins: preparation and antibacterial properties. *Experientia* **24**, 209-312.
- Maggi, N., Vigevani, A., Gallo, G. G., Pasqualucci, C. R. [1968b]. Acetyl migration in rifampicin. *J. Med. Chem.* **11**, 936-939.
- Marcus, Y. [1988]. Ionic radii in aqueous solutions. *Chem. Rev.* **88**, 1475-1498.
- Martinelli, E., White, R. J., Gallo, G. G., Beynon, P. J. [1973]. Carbon-13 NMR spectra of rifamycins. *Tetrahedron* **29**, 3441-3448.
- Mascal, M. [1994]. Noncovalent design principles and the new synthesis. *Contemporary Organic Synthesis* **1**, 31-46.
- McLachlan, A. D. [1963a]. Retarded dispersion forces between molecules. *Proc. Roy. Soc. London, Ser A* **271**, 387-401; Retarded dispersion forces between dielectrics at finite temperatures. **274**, 80-90.
- McLachlan, A. D. [1963b]. Three-body dispersion forces. *Mol. Phys.* **6**, 423-427.
- Meyer, U. [1976]. *Coord. Chem. Rev.* **21**, 159.
- MicroCal Software, Inc [1993]. Origin 3.0: Reference Manual (p. 114 y 115) and Supplement (p. 33-86). Technical Graphics and Data Analysis in Windows.
- Mikkelsen, K., Nielsen, S. O. [1960]. Acidity measurements with the glass electrode in H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O mixtures. *J. Phys. Chem.* **64**, 632-637.
- Miller, S. P., Whitlock, H. W. Jr. [1984]. Novel cyclophane-based hosts with functionally neutral cavities. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 1492-1494.
- Muller, N. [1990]. Search for a realistic view of hydrophobic effects. *Acc. Chem. Res.* **23**, 23-28
- Murakami, Y., Sunamoto, J., Kano, K. [1974]. A macrocyclic enzyme model system. Acyl-transfer from p-nitrophenyl carboxylates to paracyclophane oxime. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **47**, 1238-1244.
- Murakami, Y. [1983]. Functionalized cyclophanes as catalysts and enzyme models. *Top. Curr. Chem.* **115**, 107-155.
- Murakami, Y. [1984]. Host-guest interactions with hydrophobic cyclophanes in aqueous media. *J. Inclusion Phenom.* **2**, 35-47.
- Murakami, Y., Kikuchi J., Hirayama, T. [1987]. Cubic azaparacyclophane. *Chem. Lett.* 161-164.

- Murakami, Y., Kikuchi, J., Ohno, T., Hayashida, O., Kojima, M. [1990]. Synthesis of macrocyclic enzyme models. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7672-7681.
- Nelder, J. A., Mead R. [1965]. A simplex method for function minimization. *Computer Journal* **7**, 308.
- Odashima, K., Itai, A., Iitaka, Y., Koga, K. [1980a]. Hosts guest complex formation between a water-soluble polyparacyclophane and hydrophobic guest molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 2504-2505.
- Odashima, K., Itai, A., Iitaka, Y., Arata, Y., Koga, K. [1980b]. Inclusion complex formation in a particular geometry by a water soluble paracyclophane in aqueous solution NMR studies. *Tetrahedron Lett.* **21**, 4347-4350.
- Odashima, K., Soga, T., Koga, K. [1981]. Substrate selective inclusion by a series of water-soluble paracyclophanes. Host-guest recognition of steric structure and charge. *Tetrahedron Lett.* **22**, 5311-5314.
- Odashima, K., Koga, K. [1981]. Design and syntheses of paracyclophanes having charged side chains that are soluble in neutral aqueous solution. *Heterocycles* **15**, 1151-1154.
- Odashima, K., Koga, K. [1983]. En *Cyclophanes*, Vol. II, 629-639. Eds. P. M. Keehn, S. M. Rosenfeld, Acad. Press, New York.
- Odashima, K., Itai, A., Iitaka, Y., Koga K. [1985]. Biomimetic studies using artificial systems. 3. Design, synthesis, and inclusion complex forming ability of a novel water soluble paracyclophane possessing diphenylmethane skeletons. *J. Org. Chem.* **50**, 4478-4484.
- Oppolzer, W. [1963]. Promotionsarbeit No. 3462, ETH, Zurich.
- Oppolzer, W., Prelog, V., Sensi, P. [1964]. Konstitution des rifamycins B und verwandter rifamycine. *Experientia* **20**, 336-339.
- Oppolzer, W., Prelog, V. [1973]. Über die konstitution und die konfiguration der rifamycine B, O, S und SV. *Helv. Chim. Acta* **56**, 2287-2314.
- Park, C. H., Simmons, H. E. [1968]. Macrobicyclic amines. III. Encapsulation of halide by in,in-1, (k+2)diazabicyclo[k.1.m]alkane-ammonium ions. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2431-2432.
- Parker, D., Rosser, M. [1995]. Towards structurally responsive synthetic macrocyclic receptors for acetyl-choline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** 85-89.
- Pascard, C., Riche, C., Cesario, M., Kotzyba-Hibert, F., Lehn, J.-M. [1982]. Coreceptor substrate binding crystal structures of a macrotricyclic ligand and of its molecular cryptate with cadaverine dication. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 557-560.
- Pasternack, R. F., Gibbs, E. J., Gaudener, A., Antebi, A., Bassner, S., De Poy, L., Turner, D. H., Williams, A., Laplace, F., Lansard, M. H., Merienne, C., Perrée-Fauvet, M. [1985]. Molecular complexes of nucleosides and nucleotides with monomeric cationic porphyrin and some of its metal derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 8179-8186.
- Pasqualucci, C. R., Vigevani, A., Radaelli, P. [1969]. Analisi spettrofotometrica della rifampicina. *Farmaco (Pavia) Ed. Prat.* **24**, 46-52.
- Pasqualucci, C. R., Vigevani, A., Radaelli, P., Gallo, G. G. [1970]. Improved differential spectrophotometric determination of rifamycins. *J. Pharm. Sci.* **59**, 685-687.

- Pedersen, C. J. [1967a]. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2495-2496.
- Pedersen, C. J. [1967b]. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 7017-7036.
- Pedersen, C. J. [1988]. The discovery of crown ethers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 1021-1027.
- Pelletier, S. W. (Ed.) [1983]. *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*. Vol 1. John Wiley & Sons, USA, capitulo 1.
- Petti, M. A., Shepodd, T. J., Barrans, R. E. Jr., Dougherty, D. A. [1988]. "Hydrophobic" binding of water soluble guests by high-symmetry, chiral hosts. An electron-rich receptor site with a general affinity for quaternary ammonium compounds and electron-deficient  $\pi$  systems. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6825-6840.
- Prelog, V. [1963]. Constitution of rifamicins. *Pure & Appl. Chem.* **7**, 551-564.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T. [1988]. *Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, New York.
- Privalov, P. L., Gill, S. J. [1988]. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* **39**, 191-234.
- Ragunathan, K. G., Schneider, H.-J. [1996]. Nucleotide complexes with azoniacyclophanes containing phenyl-, biphenyl- or bipyridyl- units. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2597-2600.
- Ramamurthy, V. (Ed.) [1991]. *Photochemistry in Organized and Constrained Media*, p. 39, VCH Publishers, New York.
- Rebek, J. Jr. [1984]. Binding forces, equilibria, and rates: new models for enzymic catalysis. *Acc. Chem. Res.* **17**, 258-264.
- Rebek, J. Jr., Nemeth, D. [1985]. Molecular recognition: three point binding leads to a selective receptor for aromatic amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6738-6739.
- Rebek, J. Jr. [1987]. Model studies in molecular recognition. *Science* **235**, 1478-1484.
- Rebek, J. Jr., Askew, B., Ballester, P., Buhr, C., Jones, S., Nemeth, D., Williams, K. [1987]. Molecular recognition: hydrogen bonding, and stacking interactions stabilize a model for nucleic acid structure. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5033-5035.
- Rebek, J. Jr. [1988]. Recent progress in molecular recognition. *Top. Curr. Chem.* **149**, 189-210.
- Rebek, J. Jr. [1989a]. New molecular shapes for recognition and catalysis. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **7**, 7-17.
- Rebek, J. [1989b]. Model studies in recognition using new molecular shapes. *Pure & Appl. Chem.* **61**, 1517-1522.
- Rebek, J. Jr. [1990a]. Model studies in molecular recognition. *J. Heterocycl. Chem.* **27**, 111-117.
- Rebek, J. Jr. [1990b]. Heterocycles and molecular recognition. *Heterocycles* **30**, 707-717.
- Rebek, J. Jr. [1990c]. Molecular recognition with model systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 245-255.

- Rebek, J. Jr. [1990d]. Molecular recognition and biophysical organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **23**, 399-404.
- Reynolds, D. R., Palmer, R. A. [1976]. The crystal structure, absolute configuration and stereochemistry of (+)-tubocurarine dibromide methanol solvate: a potent neuromuscular blocking agent. *Acta Cryst.* **B32**, 1431-1439.
- Rigby, M., Smith, E. B., Wakeham, W. A., Maitland, G. C. [1986]. *The Forces between Molecules*. Clarendon, Oxford.
- Robinson, R. A., Stokes, R. H. [1968]. *Electrolyte Solutions*. Butterworths, Great Britain.
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D. [1987]. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491-497.
- Salvadori, P., Rosini, C., Bertucci, C. [1984]. Near-infrared f-f transition cotton effects of ytterbium (III) ion: experimental evidences for interaction between rifamycin antibiotics and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2439-2440.
- Schardinger, F. [1904]. *Wein. Klin. Wochemschr.* **17**, 207.
- Schmidtchen, F. P. [1981]. Macrocyclic quarternary ammonium salts. II. Formation of inclusion complexes with anions in solution. *Chem. Ber.* **114**, 597-607.
- Schneider, H.-J., Pohmann, J. [1987]. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, protonation, deprotonation, and host-guest-induced shifts of some fluorescent dyes. *Bioorg. Chem.* **15**, 183-193.
- Schneider, H.-J., Kramer, R., Simova, S., Schneider, U. [1988]. Solvent and salt effects on binding constants of organic substrates in macrocyclic hosts compounds. A general equation measuring hydrophobic binding contributions. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6442-6448 (y referencias citadas allí).
- Schneider, H.-J., Blatter, T. [1988]. Modification of hydrophobic and polar interactions by charged groups in synthetic host-guest complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 1163-1164.
- Schneider, H.-J., Theis, I. [1989]. Additivities of electrostatic and hydrophobic interactions in host-guest complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 753-754.
- Schneider, H.-J., Juneja, R. J., Simova, S. [1989a]. Solvent and structural effects on hydrogen bonds in some amides and barbiturates. An additive scheme for the stability of corresponding host-guest complexes. *Chem. Ber.* **122**, 1211-1213.
- Schneider, H.-J., Blatter, T., Simova, S., Theis, T. [1989b]. Large binding constant differences between aromatic and aliphatic substrates in positively charged cavities indicative of higher order electric effects. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 580-581.
- Schneider, H.-J. [1991]. Mechanisms of molecular recognition: investigations of organic host-guest complexes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1417-1436.
- Schneider, H.-J., Blatter, T., Simova, S. [1991]. NMR and fluorescence studies of cyclodextrin complexes with guest molecules containing both phenyl and naphthyl units. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1996-2000.
- Schneider, H.-J., Dürr M. (Eds.) [1991]. *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*. Verlag, Weinheim.
- Schneider, H.-J., Theis, I. [1992]. Salt effects on supramolecular complexation and catalysis. *J. Org. Chem.* **57**, 3066-3070.

- Schneider, H.-J., Schiestel, T., Zimmermann, P. [1992a]. The incremental approach to noncovalent interactions: Coulomb and van der Waals effects in organic ion pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7698-7703.
- Schneider, H.-J., Battler, T., Palm, B., Pfingstag, U., Rüdiger, V., Theis, I. [1992b]. Complexation of nucleosides, nucleotides, and analogs in an azoniacyclophane. van der Waals and electrostatic binding increments and NMR shielding effects. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7704-7708.
- Schneider, H.-J. [1994]. Linear free energy relationships and pairwise interactions in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **23**, 227-234.
- Scrutton, M. C., Wu, C. W., Goldthwait, D. A. [1971]. Presence and possible role of zinc in RNA polymerase obtained from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2497-2501.
- Sensi, P., Margalith, P., Timbal, M. T. [1959]. Rifamycin, a new antibiotic-preliminary report. *Farmaco (Pavia) Ed. Sci.* **14**, 146-147.
- Sensi, P., Greco, A. M., Ballotta, R. [1959-1960]. Rifamicin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. *Antibiot. Ann.* 262-270.
- Sensi, P. [1973]. Inhibitors of the transcribing enzymes. *Pure & Appl. Chem.* **35**, 383-410.
- Serrano, L., Neira, J.-L., Sancho, J., Fersht, A. R. [1992]. Effect of alanine versus glycine in  $\alpha$ -helices on protein stability. *Nature (London)* **356**, 453-455.
- Shemayakin, M. M., Aldanova, N. A., Vinogradova, E. I., Feigina, M. Y. [1963]. The structure and total synthesis of valinomycin. *Tetrahedron Lett.* 1921-1925.
- Shinkai, S. [1993]. Calixarenes-the third generation of supramolecules. *Tetrahedron* **49**, 8933-8968.
- Shrager, R.I. [1972]. Quadratic Programming for Nonlinear Regression. *Communications of the ACM* **15**, 41-45.
- Sinanoglu, O. [1968]. *Molecular Associations in Biology*. B. Pullman (Ed.), Academic Press, New York, pp. 427-445.
- Smithrud, D. B., Diederich, F. [1990]. Strength of molecular complexation of apolar solutes in water and in organic solvents is predictable by linear free energy relationships: a general model for solution effects on apolar binding. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 339-343.
- Smithrud, D. B., Wyman, T. B., Diederich, F. [1991]. Enthalpically driven cyclophane-arene inclusion complexation: solvent-dependent calorimetric studies. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5420-5426.
- Soga, T., Odashima, K., Koga, K. [1980]. Modifications of hydrophobic cavity and their effects on the complex formation with a hydrophobic substrate. *Tetrahedron Lett.* **21**, 4351-4354.
- Stauffer, D. A., Dougherty, D. A. [1988]. Ion dipole effect as a force for molecular recognition in organic media. *Tetrahedron Lett.* **29**, 6039-6042.
- Stauffer, D. A., Barrans, R. E., Dougherty, D. A. [1990]. Concerning the thermodynamics of molecular recognition in aqueous and organic media. Evidence for significant heat capacity effects. *J. Org. Chem.* **55**, 2762-2767.

- Stetter, H., Roos, E. E. [1955]. Zur Kenntnis der makrocyclischen Ring-Systeme. II. Mitteil: über die bis-[N, N'-alkylenbenzidine]. *Chem. Ber.* **88**, 1390-1395.
- Stryer, L. [1965]. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non polar binding sites. *J. Mol. Biol.* **13**, 482-495.
- Szejtli, J. (Ed.) [1982]. *Cyclodextrins*. Reidel Dordrecht, The Netherlands.
- Szejtli, J. (Ed.) [1988]. *Cyclodextrin Technology*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Dordrecht, capitulos 1 y 2.
- Tabushi, I., Yamada, H., Matsushita, K., Yoshida, Z., Kuroda H., Oda, R. [1972]. Preparations and properties of tetrakis[2.2.2.2]paracyclophane derivatives. *Tetrahedron* **28**, 3381-3388.
- Tabushi, I., Kuroda, Y., Kimura, Y. [1976]. Strong hydrophobic binding by water soluble macrocyclic heterocyclophane. *Tetrahedron Lett.* 3327-3330.
- Tabushi, I., Kiyosuke, Y., Sugimoto, T., Yamamura, K. [1978]. Approach to the aspects of driving force of inclusion by  $\alpha$ -cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 916-919.
- Tabushi, I., Yamamura K. [1983]. *Top. Curr. Chem.* **113**, 145.
- Tabushi, I., Kuroda, Y. [1983]. *Adv. Catal.* **32**, 417.
- Tabushi, I., Yamamura, K., Nonoguchi, H., Hirotsu, K., Higuchi, T. [1984]. Generation of plane chirality via specific host-guest interaction by a macrocyclic heterocyclophane in the crystal phase. *J. Incl. Phenom.* **2**, 85-89.
- Tam, S.-C.; Williams, R. J. P. [1984]. Electrostatic interactions between organic ions. *J. Chem. Soc. Farad. Trans. 1* **80**, 2255-2267.
- Tam, S. C., Williams, R. J. P. [1985]. *Struct. Bonding* (Berlin) **63**, 103.
- Taylor, R., Kennard, O. [1984]. Hydrogen-bond geometry in organic crystals. *Acc. Chem. Res.* **17**, 320-326.
- Travis, J. [1993]. Biotech gets a grip on cell adhesion. *Science* **260**, 906-908.
- U.S., [1970]. 3, 542, 762, Noviembre 24.
- Villiers, A. [1891]. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris* **112**, 536.
- Vincens, J., Böhmer, V. (Eds.) [1991]. *Calixarenes. A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*. Kluwer, Dordrecht.
- Wehrli, W., Staehelin, M. [1971]. Actions of the rifamycins. *Bacteriol. Rev.* **35**, 290-309.
- Whitlock, B. J., Jarvi, E. T., Whitlock, H. W. [1981]. Preparation and characterization of 1,8,19,26-tetraoxa[8.8] (2,6) naphthalenophane-3,5,21,23-tetrayne and related donut shaped cyclophanes. *J. Org. Chem.* **46**, 1832.
- Worm, K., Schmidtchen, F. P. [1995]. Molecular recognition of anions by zwitterionic host molecules in water, *Angew. Chem. Ed. Engl.* **34**, 65-66.
- Wu, C. W., Goldthwait, D. A. [1969]. Studies of nucleotide binding to the ribonucleic acid polymerase by equilibrium dialysis. *Biochemistry* **8**, 4458-4464.
- Yatsimirsky, A. K., Eliseev, A. V., [1991]. Contributions of electrostatic and hydrophobic interactions to the host-guest complexation of pyrocatecholate anions with cationic cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1769-1772.