

4
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ASOCIACION DE POLIAMINAS CON
COPROPORFIRINA I EN MEDIO ACUOSO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
ALEJANDRO ULISES FLORES VILLALOBOS



SECRETARÍA PROFESIONAL U.F.
FAC. DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2660:20



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens.

VOCAL: Dr. Plinio Jesús Sosa Fernández.

SECRETARIO: Dr. Anatoli Iatsimirski.

PRIMER SUPLENTE: Dra. Silvia Elena Castillo Blum.

SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Martha Elena Sosa Torres.

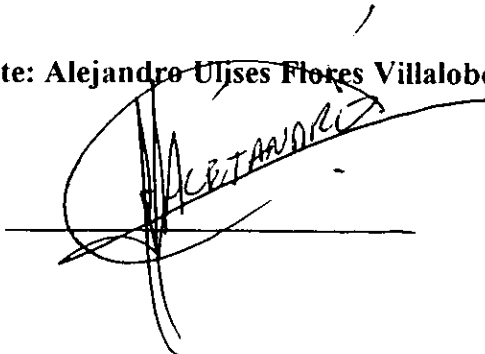
LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química.
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear
Universidad Nacional Autónoma de México.**

Asesor: Dr. Anatoli Iatsimirski.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Yes', written over a horizontal line.

Sustentante: Alejandro Ulises Flores Villalobos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'ALEJANDRO', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS:

A mis patrocinadores de toda la vida:

Don Vi y Doña Gra (Chelis):

Por estos 23 años de paciencia y cariño (y desveladotas). Gracias de todo corazón.

A mis hermanos:

Enrique (Maestrín), Roberto (Carlos), Liliana (La Tesis Grande) y Brenda (Güera):

Por aguantar tantos años de neurastenia en la casa y por ser mis hermanos.

A mis viejitas:

Doña Coco

y

Doña Juanita

Por todos los cafecitos, almuerzos, pláticas y cariño. No tengo otra palabra que no sea GRACIAS!!

A mis sobrina Angélica (La Tesis Chica):

Por todas las sonrisas que desde ahora regala a todo el mundo.

Quiero agradecer de manera muy especial a mis tíos Javier (Javis), Cecilia (Hueso), Gabriela (Gaviota), Luz (Luchita), Yolanda (Yolis), por apoyarme entodas y cada una de las canalladas que se me ocurrieron.

Con estas palabras quiero darle las gracias a la persona que ha sido mi asesor, y el mejor maestro que cualquier estudiante pudiera conocer: El DOCTOR Anatoli Iatsimirski.

Por todas las horas de paciencia y enseñanzas (especialmente PACIENCIA). Existe una frase para describir lo que una persona tan ejemplar como él es: " EL HOMBRE QUE HA NACIDO CON ESPIRITU DE MAESTRO TOMA LAS COSAS EN SERIO PARA BENEFICIO SUYO Y DE SUS DISCIPULOS " (F. Nietzsche, "Jenseits von Gut und Bose")

Gracias Doctor Anatoli por apoyarme en todo, siempre, y bajo cualquier circunstancia. Por ser ejemplo de dedicación y amor al trabajo para todas las personas que se encuentran a su alrededor.

Para Gina Miralrío G. (Gina Child):

Por ser la persona que cambio mi vida el día que me invitó a una fiesta. Gracias por todas las horas tan especiales, por todos los instantes de mi vida contigo. Por todas las ideas que juntos tenemos. **POR TODO LO QUE REPRESENTAS EN MI VIDA.** Por ser una persona capaz de regalarme su corazón con una sonrisa, y hacerme pensar que la Navidad sirve para algo...(Algún día, muchos días...)

A mis amigo Juan Carlos Cázares Cambrón (también sin la eme) por todos estos años de cotorreo, y "reuniones juveniles", (tu frase de "Si el hombre quiere una vez..." será famosa algún día)

A Mauro Bautista, amigo y compañero en muchas horas de clase, desm... y laboratorio, por ayudarme a tener lo que más quiero en la vida...

A las tres "emes", Marina Vega, Mariana Fraga y Michele Riveroll. Por ser los mejores ejemplos de niñas que conozco, especialmente a Marina por todos estos añitos de tener dos hombros...

A las tres "bes", Vicky, Bere, y Bety. Siempre con sonrisas y mucha ternura.

A todos mis sobrinos, Julio especialmente, a mis tíos Bernardino, Clemente, Reyna, y mis tías Mary, Hilda y mi tío Marcelo.

A las personas con quienes he compartido la carrera (mas bien el maratón), Greys (gracias por el pastel), Gab y (Güera) y Horacio (Mombo), Diana Morena Güera), Susana (Wammy), Lupita de Fraje, Luis de Osorio, Nade, Lucy y toda la banda del pasillo de Inorgánica, y a Sergio (amigo y compañero) del Laboratorio de Orgánica, y a los finados Chicos Chippen

Al M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, y a la Dra. Érika Martín por todas las horas ayuda, y a los chavos del I'HH LABORATORIO 201 de Orgánica

A mis primos Mayra (Maura), Leo, Lalo (Tadón), Karla y al resto de los Flores (Rosas, Rojas, y Camacho) y de los Villalobos.

A los habitantes del tres veces hace Laboratorio 213: Dr. David, Fina, Jesús, Caro Escobar, mi suegro Jaime (cuidame a mi periquita), Baldo (amigo y compañero de muchas horas de chamba y salidas a las quinientas), Guacalupe y con mucho, pero mucho afecto Yami (la otra dálmata), por las toneladas de buena onda y los megatones de apoyo en el cubículo, y escapados de Claudia Patiño. Al "colega" Andrés, a Reyna (gracias por los aventones). A todos ustedes, pórtense muy bien. (Ahí les encargo mis posters).

A Lulú, la mejor secretaria de la U. N. A. M.

A la familia Alvarado García: Luz Raquel, Aeth (la Güera), Don Aurelio y Doña Luisa (Y tambien a Jazmín y su galán).

A mis sinodales por sus amables y oportunas correcciones (más todos los kilos de paciencia para no dormirse durante las revisiones)

Finalmente, al Proyecto DGAPA-PAPPIT 106495 por patrocinar el proyecto de investigación del cual surgió esta obra. (Y por pagarme mi beca siempre a tiempo)

INDICE.

	Pág.
1.- INTRODUCCIÓN.	1
2.- ANTECEDENTES.	
2.1 Asociación no covalentes de porfirinas.	3
2.2 Autoasociación de porfirinas.	4
2.3 Asociación no covalente entre porfirinas e iones o moléculas orgánicas.	7
2.4 Reconocimiento molecular de aminas alifáticas.	10
2.5 Reconocimiento molecular de aminas aromáticas.	16
2.6 Porphirinas como agentes de reconocimiento molecular.	19
2.7 Coproporfirina I (CP-I).	21
2.8 Poliaminas.	22
3.- OBJETIVOS Y METAS.	24
4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	25
4.1 Reactivos.	25
4.2 Instrumental.	25
4.2.1 Estudios por técnicas de espectroscopía de absorción en la región UV-visible.	25
4.2.2 Estudios por espectroscopía de emisión electrónica.	26
4.2.3 Medición del pH.	26
4.3 Preparación de las disoluciones.	26
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	27
5.1 Efecto de fuerza iónica sobre el grado de agregación de CP-I	27
5.2 Interacción de CP-I con monoaminas.	28

5.2.1 Metilamina (Me-NH ₂).	29
5.2.2 <i>n</i> -propilamina (<i>n</i> -PrNH ₂)	30
5.3 Reconocimiento molecular de diaminas	32
5.3.1 Absorbancia e intensidad de fluorescencia como función de la concentración de huésped	32
5.3.2 Equilibrios en el sistema CP-I + diaminas.	33
5.3.3 Etilendiamina (En).	34
5.3.4 1,3-diaminopropano (DAP).	36
5.3.5 1,4-diaminobutano (DAB).	38
5.3.6 1,8-diaminooctano (DAO).	41
5.3.7 Espermina (SP).	43
5.4 Efecto de la concentración de CP-I en la K del sistema CP-I + diaminas.	48
5.5 Dependencia de K con respecto al valor de pH.	50
5.6 Dependencia de K con respecto a la carga del huésped.	54
5.7 Efecto de fuerza iónica sobre la constante de asociación	58
5.8 Efecto de disolvente	65
5.9 Reversibilidad del sistema CP-I + huésped	66
6.- CONCLUSIONES.	69
7.- BIBLIOGRAFÍA.	71
APENDICE 1.	73

1.- INTRODUCCION.

Durante un largo periodo, la asociación no covalente se trató como un tipo de interacción débil y no específico. Se consideraba como un componente de procesos tales como solvatación y adsorción a interfases. Un descubrimiento de importancia primordial fue que la asociación no covalente es responsable de la alta eficiencia y especificidad de procesos como biocatálisis, regulación a través de interacciones receptor-efector, funcionamiento del sistema inmunológico por medio de interacciones anticuerpo - antígeno y replicación de ADN.

Ello provocó un gran interés en el estudio del fenómeno de asociación no covalente en sistemas artificiales con el propósito de crear una base teórica para las interacciones biológicas y desarrollar nuevos sistemas químicos (catalizadores, sensores, amplificadores de señales, etc.) más eficientes. Esta área del conocimiento actualmente se trata como "*Química Supramolecular*".

Dado que las interacciones no covalentes son débiles, la asociación fuerte y específica ("reconocimiento molecular") entre una especie de interés ("ligante" o "huésped") y una molécula más grande diseñada para reconocerla ("receptor" o "anfitrión") solo puede lograrse a través de una multitud de interacciones simultáneas entre varios sitios de ambas especies. A pesar de que la idea general de alta eficiencia de las interacciones multisitiales pudiera parecer casi trivial, su realización práctica es muy difícil porque un receptor capaz de complejarse selectivamente con un huésped en esta manera debe presentar una serie de características, a saber:

Un arreglo de sitios de interacción predispuestos en el espacio para ser geoméricamente complementarios a los sitios de interacción del huésped. El receptor debe tener un cierto balance entre flexibilidad y rigidez (los receptores demasiado flexibles presentan una gran pérdida entrópica durante la complejación, mientras que aquellas especies demasiado rígidas interactúan lentamente); debe tener una mínima tendencia a la autoasociación, y generar durante la complejación un señal fácilmente detectable para su aplicación práctica, etcétera.

El propósito de este trabajo es probar como receptor para poliaminas alifáticas (una familia de importantes reguladores biológicos) el tetraanión de Coproporfirina I (**CP-I**). La razón de ello es que dadas las características químicas y estructurales de esta molécula, se espera que los grupos carboxilato de **CP-I** formaran hasta cuatro puentes salinos con los grupos amonio de los huéspedes, y que la superficie hidrofóbica de la porfirina pueda participar en una interacción adicional hidrofóbica con grupos metileno de los huéspedes.

Finalmente, dada la conocida sensibilidad de las bandas de absorción de la porfirina a su microambiente es probable que se genere una señal inducida por la complejación fácilmente detectable. Además, este potencial receptor es una sustancia natural cuya preparación no precisa por lo general de una laboriosa síntesis orgánica.

2.- ANTECEDENTES.

2.1 Asociación no covalente de porfirinas.

Las porfirinas son componentes de varias estructuras biológicas importantes tales como hemoproteínas y clorofila. En todos estos casos, la porfirina participa como ligante tetracoordinado planar para iones metálicos tales como $\text{Fe}^{2+/3+}$ o Mg^{2+} , los cuales son los sitios activos en estas biomoléculas, mismas que coordinan axialmente los sustratos correspondientes, como peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular, CO, etcétera. Sin embargo, se conoce que *el resto del macrociclo puede participar en interacciones de tipo no covalente con varias moléculas orgánicas.*

Las porfirinas dentro de sus procesos de asociación no covalente, presentan de manera general, dos tipos de comportamiento, a saber:

- Autoasociación, entendido como el proceso mediante el cual las moléculas de soluto interactúan consigo mismas para formar agregados diméricos, triméricos y polímeros de orden superior.
- Heteroasociación, entendido para los fines de este trabajo como el proceso a través del cual las moléculas de soluto interactúan con otras especies químicas diferentes a ellas que se encuentren presentes en el medio.

A continuación se describen brevemente las principales contribuciones no covalentes que presentan las porfirinas en sus procesos de asociación:

- **Interacción electrostática.** Término que se utiliza para referirse a distintas contribuciones debidas a cargas permanentes, dipolos o multipolos en una molécula.
- **Interacciones de van der Waals.** Se consideran como la suma de la energía de atracción y repulsión debida a dipolos transitorios en una molécula.
- **Energía de inducción.** Considerada como la interacción entre distribuciones estáticas de carga de una molécula y el cambio inducido en la distribución de carga de otra.

- **Contribución hidrofóbica.** Se genera a partir de las propiedades que exhibe un hidrocarburo o fragmento molecular no polar al pasar del líquido puro (o un ambiente no acuoso) hacia el medio acuoso. (ΔH pequeño y negativo, ΔS grande y negativo, y ΔC_p grande y positivo). Se explica este comportamiento como muestra de la mayor afinidad de las moléculas de agua para interactuar de manera más favorable consigo mismas que con las moléculas de soluto.

2.2 Autoasociación de porfirinas.

Los estudios sobre el proceso de autoasociación de porfirinas tienen un largo historial. Ya desde 1937, Alexander estudió capas monomoleculares de una variedad de porfirinas en la superficie del agua¹. Del área calculada atribuida a una molécula de Protoporfirina, y de la estabilidad general de la monocapa, concluyó que las moléculas de Protoporfirina IX (**Figura 1**) estaban acomodadas cara a cara y orientadas verticalmente. De esta manera, los grupos carboxílicos polares estarían en contacto con el agua, mientras que los grupos vinilo permanecerían alejados del medio.

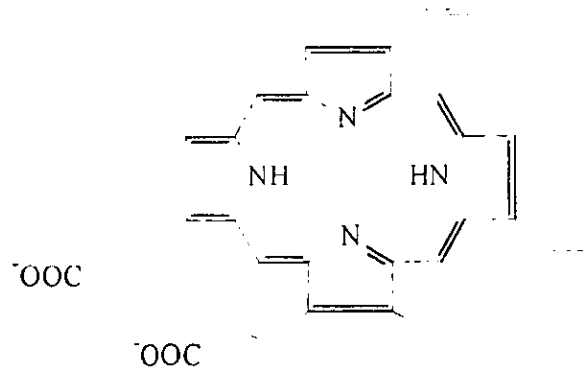


Figura 1 Protoporfirina IX

De forma más reciente, han surgido estudios acerca del comportamiento de porfirinas sintéticas *meso* sustituidas solubles y sus metaloderivados (**Figura 2**). La introducción de grupos ionogénicos posibilita su solubilidad en agua.

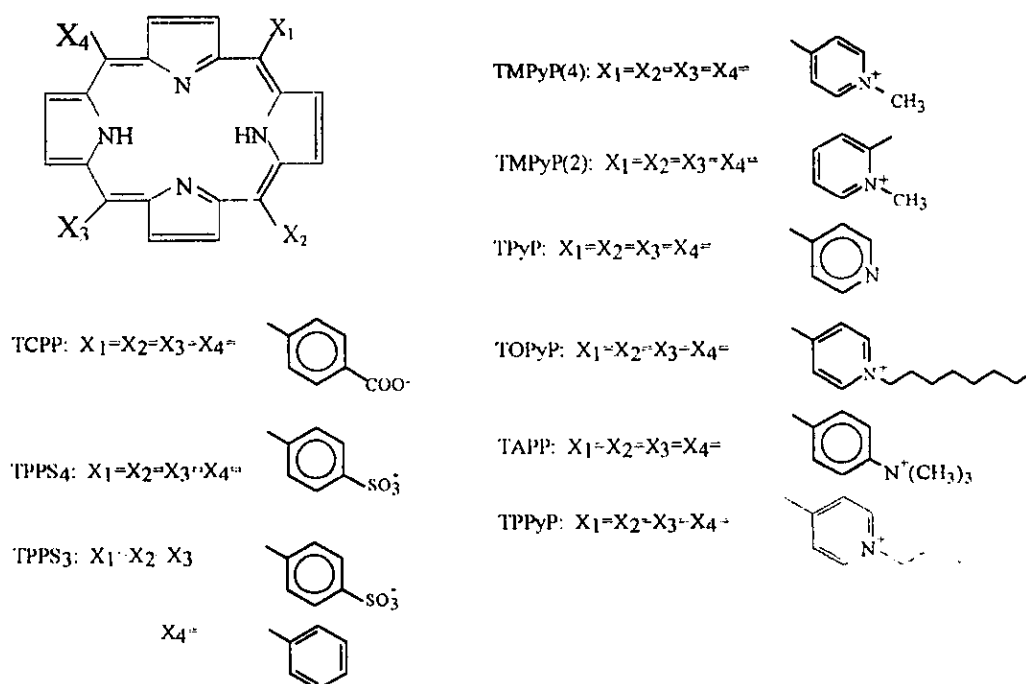


Figura 2. Diferentes tipos de porfirinas *meso* sustituidas solubles en agua.

Diversos trabajos respecto al proceso de autoasociación nos permiten conocer algunos tópicos de suma importancia para el entendimiento de éste fenómeno:

- En disolución acuosa a pH 7.5, la TCPP y TPPS₃ presentan dimerización que se muestra, en particular, en una desviación de la ley de Beer en la absorción de luz de sus disoluciones. El grado de agregación de las porfirinas se incrementa a mayor concentración y mayor fuerza iónica. Bajo las mismas condiciones experimentales la TMPyP permanece monomérica.²
- En general, la TCPP (una porfirina aniónica) y sus derivados metálicos muestran una mayor tendencia a agregarse con respecto a la TMPyP (una porfirina catiónica) y sus metaloderivados. La adición de electrolitos (1:1) favorece este proceso³.
- Los espectros de absorción de las disoluciones de porfirinas a diferentes concentraciones presentan un punto isobéptico. Dentro de los intervalos de concentración usuales para el estudio de porfirinas *meso* sustituidas (1-10 μM) se comprueba que solo el agregado dimérico se forma^{3,4}.
- La asociación en medio acuoso es un proceso entálpicamente favorable, lo que sugiere que las interacciones de van der Waals y electrostáticas son la principal fuerza directriz del proceso de autoasociación^{4,5}.

- La autoasociación de porfirinas solubles en agua se ve incrementada por la presencia de sales inorgánicas en el medio⁵⁻⁹, y está estrictamente suprimido en disolventes orgánicos⁹.

Los procesos de asociación de porfirinas pueden ser monitoreados por varias técnicas, tales como RMN, espectroscopia UV-visible, o espectroscopia de fluorescencia.

La técnica de RMN proporciona la mayor información sobre el proceso de asociación (además de las constantes de equilibrio, también la geometría del asociado), pero presenta el gran inconveniente de ser un método poco sensible, y por razones instrumentales solo funciona en la medición de constantes de asociación aproximadamente del orden de 10^2 - 10^3 M^{-1} . Los cambios en los desplazamientos químicos se deben al efecto de apantallamiento del sistema de electrones de tipo π sobre los protones del macrociclo.

Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-visible) es una técnica más sensible y permite medir constantes del orden de 10^4 - 10^6 M^{-1} (en el caso de porfirinas), mientras que espectroscopia de fluorescencia funciona para constantes hasta del orden de 10^6 - 10^8 M^{-1} . Los cambios en los espectros electrónicos surgen como consecuencia de las interacciones llamadas π - π , las cuales también producen un efecto de apagamiento de la fluorescencia.

Con base en las propiedades espectroscópicas de los macrociclos, se esperaría que la interacción entre una porfirina y un ligante aromático pueda provocar un apagamiento de la fluorescencia de la porfirina y afectar la posición de las bandas de absorción en los espectros electrónicos de estos macrociclos. Los cambios espectrales con ligantes alifáticos deben ser comparativamente más pequeños, y parecidos a los que se observan como consecuencia del efecto del medio²⁻⁹.

Las porfirinas tienen dos grupos de bandas espectrales; una banda muy intensa entre 370-390 nm (conocida como banda de Soret) y bandas más débiles entre 500 y 700 nm (bandas Q). Se sabe que las variaciones en la banda de Soret son muy sensibles a todos los factores (metalación, disolvente, interacciones π - π , etc.) y la mayoría de los trabajos publicados utilizan los cambios en esta banda como herramienta para el estudio de las propiedades de las porfirinas.

2.3 Asociación no covalente entre porfirinas e iones o moléculas orgánicas.

Previamente se ha mencionado que existen interacciones entre el macrociclo de porfirina con varias moléculas orgánicas, es decir, procesos de heteroasociación de porfirinas.

Kano y su grupo de colaboradores⁵⁻⁸ han proporcionando una herramienta útil para la caracterización del sistema *porfirina + ligante*, ya que validan en repetidas ocasiones el empleo de las técnicas de espectroscopia de fluorescencia para estudiar la formación de complejos *porfirina + ligante* en medio acuoso. Sus trabajos proveen datos importantes sobre la formación y estabilidad de estos agregados moleculares:

- Con el empleo de TPPS₃, TMPyP, TAPP y TOPyP como receptores de las especies 10-antraquinona-2,6-disulfonato de sodio (AQDS²⁻), metilviológeno (MV²⁺) [diclorhidrato de 1,1'-dimetil-4,4'-dipiridinio], PNF (*p*-nitrofenol), y PFI (proflavina) se estudió la formación de complejos con estas especies⁵⁻⁸.

Se informan los valores de la constante de asociación (**K**) y parámetros termodinámicos observados (Tabla 1). Los estudios se realizan en medio acuoso, a 25 °C.

Tabla 1: Valores de **K** y parámetros termodinámicos para el sistema
Huésped + Receptor = Agregado

RECEPTOR	HUESPED	*K (M ⁻¹)	**K (M ⁻¹)	-ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
TPPS ₃	MV ²⁺	4300	4600	22.3	-19.3
TPPS ₃	AQDS ²⁻	810	740	38.2	-58.7
TMPyP	PNF	ND	550	46.1 ± 3.8	-99.9 ± 11.7
TMPyP	PFI	2161	ND	29.3	-34.9
TAPP	BQ	85	ND	ND	ND
TAPP	PFI	800	ND	ND	ND
TOPyP	PFI	2100	ND	ND	ND

* Determinada por espectroscopia de fluorescencia; ** Determinada por espectroscopia UV-visible. ND: No determinada.

Con el empleo de sistemas tipo *R*TPP-BQ (BQ = *p*-benzoquinona), TMPyP-BQ y TAPP-BQ se ha estudiado la formación de complejos entre dichas especies⁵.

La *K* para el primer agregado (donde *R* = -OH, -CH₃, -OCH₃, -NHCOCH₃, -Cl, -Br, -NO₂, -COOCH₃, -CN) es de 3.02 M⁻¹ en promedio. El segundo agregado tiene una *K* = 70 M⁻¹ mientras que al último le corresponde una *K* = 85 M⁻¹.

Los resultados de estos estudios, *realizados en medio acuoso, a 25 °C*, generan una serie de parámetros fisicoquímicos inherentes al proceso de asociación. En la **Tabla 2** se presentan dichos valores para los sistemas *receptor + huésped* estudiados⁵⁻⁸.

Tabla 2: Valores de ΔH y ΔS para el sistema Receptor + Huésped - - Agregado

RECEPTOR	HUESPED	$-\Delta H$ (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
TPPS ₃	AQ α S	10.5	19.1
TPPS ₃	AQ β S	17.7	11.1
TPPS ₃	AQDS	34.9	-53.1
TPPS ₃	PyS	18.9	-0.2
TPPS ₃	AnS	12.7	13
TPPS ₃	MV	22.3	-19.3
TMPyP	PNP	46.1	-99.9
TMPyP	PFI	29.3	-34.9

AQ α S. 9,10-antraquinona-1-sulfonato de sodio. AQ β S. 9,10-antraquinona-2-sulfonato de sodio; PyS: 1-pirensulfonato de sodio; AnS: 2-antracensulfonato de sodio.

Resumiendo. Se comprueba con evidencia experimental que *el proceso de heteroasociación entre porfirinas meso sustituidas y ligantes aromáticos está entálpicamente favorecido en todos los casos estudiados*. Las porfirinas (aniónicas y catiónicas) forman complejos estables en medio acuoso con huéspedes que presenten carga iónica de signo opuesto al propio del receptor. *La estequiometría de dichos agregados es generalmente 1:1*.

Pasternack y su grupo de colaboradores¹⁰⁻¹² también han abordado el estudio de la asociación de porfirinas con nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos. Sus resultados muestran que:

- Las constantes de asociación determinadas para los agregados formados TMPyP(4) (ver **Figura 2**) y el derivado Cu(II)-TMPyP(4) con polímeros sintéticos de DNA (poli[dG - dC])¹⁰ tienen un valor de 7.7×10^5 y $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. En experimentos sobre la formación de complejos entre TMPyP(4) con homopolímeros de DNA [poli(dG-dC) y poli(dA-dT)]^{10,11} se observa que la formación de agregados estables ocurre únicamente en regiones donde predominan los pares dG-dC, y solo si la porfirina no presenta ligantes axiales. Proponen que la constante de asociación para el sistema *TMPyP(4) + poli(dA-dT)* es aproximadamente dos veces mayor¹⁰, por lo que sus cálculos arrojan un valor de $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.
- En experimentos sobre la formación de agregados (medio acuoso, pH 6.9, 25 °C, y $I = 0.2$) entre TMPyP(4) y sus metaloderivados de Cu(II), Zn(II), y Ni(II) con nucleósidos y nucleótidos¹², (dG, dC, dA, dT, dGMP, dCMP, dAMP y dTMP) se encuentra que las constantes de asociación son mayores para ligantes con bases púricas que para aquellos conteniendo bases pirimídicas (2400 M^{-1} contra 186 M^{-1} en promedio).

En opinión de los autores, el valor de **K** para estos agregados tiene poca dependencia con la estructura de los huéspedes, y la interacción electrostática no es de vital importancia para la formación del complejos moleculares. Se atribuye la estabilidad del agregado a la contribución denominada “apilamiento π ”, dada la presunta interacción favorable entre los planos aromáticos de la porfirina y las bases nitrogenadas.

Schneider y colaboradores^{4,13} realizan por primera vez un estudio sistemático en cuanto a las variaciones de los componentes *huésped + receptor* se refiere. Sus resultados permiten identificar y cuantificar experimentalmente la contribución electrostática de las asociaciones huésped-receptor en agua ($\Delta\Delta G_{\text{asoc.}}$), con un incremento constante de **5 ± 1 kJ/mol** de puentes salinos entre receptor y huésped y lo que es notable: *el incremento en la energía de asociación con que contribuye la parte lipofílica*, que corresponde a 1.4 ± 0.2 kJ/mol de electrones π interactuantes en los ligantes aromáticos probados.

Los datos recogidos para las valoraciones espectrofotométricas de sus sistemas *huésped + receptor*, teniendo como receptores una serie de porfirinas *meso* sustituidas solubles en agua muestran un buen ajuste y valores con poca variación para las constantes de equilibrio evaluadas a diferentes longitudes de onda. Los espectros de absorción de los sistemas estudiados exhiben un punto isobéptico, *lo que asegura que bajo las condiciones experimentales coexisten en disolución únicamente dos formas de porfirina: libre y complejada, y además es despreciable la autoasociación de porfirina*¹³.

2.4 Reconocimiento molecular de aminas alifáticas.

Hasta el momento, la gran mayoría de los anfitriones probados para poliaminas son derivados de éteres 18-corona-6 (**Figura 3**). Dentro de estos receptores se cuentan éteres corona unidos a fragmentos polipeptídicos¹⁴, macrociclos [18]-N₂O₄ modificados^{15,16}, además de macrociclos tipo [18]-N₂O₄ unidos a naftaleno y metaloporfirinas¹⁷, y los derivados carboxílicos de éteres 18-corona-6, mismos que tienen semejanza con sitios biológicamente activos; son solubles en agua y utilizan para su enlazamiento residuos carboxílicos^{18,19}.

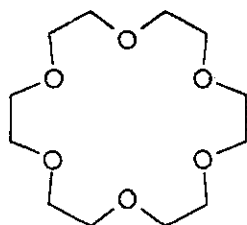


Figura 3. Éter 18-corona-6.

Para estos y otros anfitriones aniónicos se observa una afinidad hacia diaminas considerable, aún en medio acuoso. Sin embargo la especificidad es baja y en particular, solo hay una moderada diferencia entre afinidad al respecto de diaminas y monoaminas, lo cual probablemente sea resultado de que la parte principal de la energía de asociación se debe a la inclusión del catión amonio en el macrociclo, lo que ocurre con la misma energía en el caso de mono o diaminas. *Además, los sistemas estudiados no producen una señal fácilmente detectable, que es una condición indispensable para el desarrollo de un sensor de diaminas.*

La importancia de las poliaminas en los procesos biológicos ha generado una serie de estudios con el fin de diseñar receptores capaces de interactuar de manera selectiva con los grupos amonio presentes en estos policationes. Dentro de la literatura encontramos reportes acerca del empleo de derivados de éteres corona para el reconocimiento selectivo de poliaminas:

Behr y colaboradores¹⁹ abordan las propiedades de un éter 18-corona-6, unido covalentemente a 4 triptofanos, exhibiendo cuatro residuos carboxílicos libres (**1a**) (**Figura 4**). De este estudio podemos conocer los valores para las constantes de asociación con una serie de diaminas, como se ilustra en la **Tabla 3** (Se empleó *buffer* de $(\text{Me}_4\text{N})_3\text{PO}_4$ 0.1 M, en medio acuoso a pH 6.9 y 25 °C).

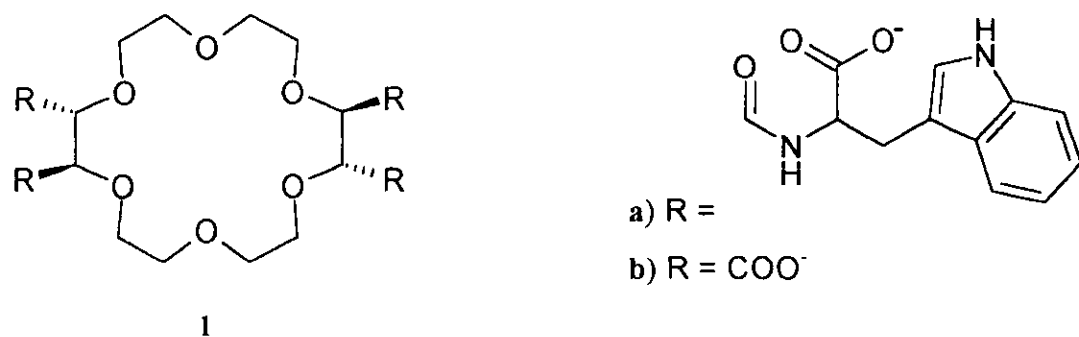
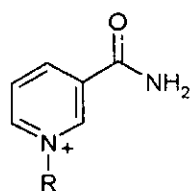


Figura 4. Éter 18-corona-6 unido a fragmentos de triptofano (**1a**) y grupos carboxilato (**1b**).



2

a) $R = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+$ b) $R = (\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ Figura 5. Los huéspedes **2a**, **b**.Tabla 3: Valores de $\log K$ (M^{-1}) para el sistema **1a** + Amina + Agregado

AMINA	$\log K$
NH_4^+	2.53
CH_3NH_3^+	1.98
$\text{PhCH}_2\text{NH}_3^+$	2.16
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	2.0
$^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	3.48
$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$	2.9
$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$	2.76
2a*	3.36
2b*	2.6

* Ver Figura 5.

Behr, Lehn y Vierling¹⁹ investigaron las propiedades del receptor **1b** (Figura 4), e informan las constantes de asociación para ésta especie con una serie de diaminas (Tabla 4). Se empleó un *buffer* de $(\text{Me}_4\text{N})_3\text{PO}_4$ 0.1 M, en medio acuoso a pH 6.9 y 25 °C.

Tabla 4: Valores de $\log K$ (M^{-1}) para el sistema **1b** + Amina + Agregado

AMINA	$\log K$	AMINA	$\log K$
NH_4^+	3.53	$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_3^+$	3.07
CH_3NH_3^+	2.87	$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_3^+$	2.95
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	2.43	ADRENALINA ⁺	1.79
$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+$	4.6	EFEDRINA	1.30
$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$	3.77	NORADRENALINA	2.74
$^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$	3.23	NOREFEDRINA ⁺	2.00

De la comparación entre la estructura y propiedades químicas tanto del éter como de los ligantes, proponen que la fuerza de enlace está dominada por efectos electrostáticos. Además, existen factores que determinan sus propiedades de complejación con poliaminas:

a) Discriminación central, resultante de la cavidad del macrociclo, que favorece la inclusión de aminas primarias con respecto a aquellas con un mayor número de sustituyentes.

b) Discriminación lateral, debida a interacciones entre el ligante y las cadenas unidas al macrociclo.

Proponen que la mayor contribución para la asociación entre éteres corona y aminas se debe a efectos electrostáticos e hidrofóbicos.

Lehn y Vierling¹⁸ han probado como receptores de aminas a una serie de éteres *aza-18-corona-6* (Figura 6). Informan las constantes de asociación para los complejos estudiados en medio acuoso (Se empleó como medio reaccional una mezcla metanol/agua en proporción 9/1, y como electrolito soporte (Me₄N)Br 0.1 M, a 25 °C)

Tabla 5: Valores de logK (M⁻¹) para el sistema Receptor + Amina - - Agregado.

RECEPTOR	CH ₃ NH ₃ ⁺	CH ₃ CH ₂ NH ₃ ⁺	PhCH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺
3	3.32	3.2	3.17
4	3.34	3.17	3.30
5	4.81	4.49	4.70

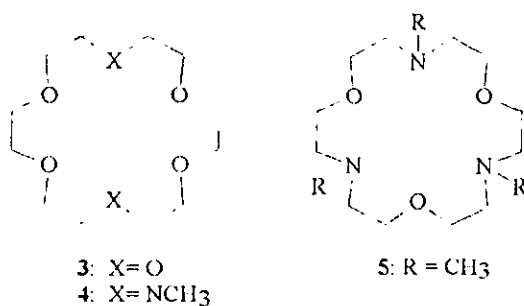


Figura 6. Estructura de los receptores macrocíclicos

Podemos observar en la tabla previa, que existe una elevada afinidad y considerable selectividad del macrociclo **5** con respecto a los macrociclos **3** y **4** en su interacción con los cationes orgánicos. Se propone que este comportamiento surge como consecuencia de la presencia en el receptor de tres nitrógenos simétricamente localizados. Las especies $R-NH_3^+$ se incluyen en la cavidad del macrociclo por medio de tres puentes de hidrógeno ($N-H\cdots N$), reforzadas por interacciones electrostáticas entre los átomos de oxígeno y los grupos amonio del macrociclo.

El grupo de trabajo de Voyer emplea como receptor de diaminas un derivado de éter 18-corona-6 unido covalentemente a una cadena pentapeptídica¹⁴ (**Figura 7**). La afinidad de estos sistemas por diaminas queda ilustrada en una serie de datos experimentales, determinados en $CDCl_3$, a 25 °C:

Tabla 6: Constantes de formación para el sistema Receptor + Sustrato \rightleftharpoons Agregado

Sustrato	$K \times 10^{-8} (M^{-1})$			
	6	7	8	9
$^+H_3N(CH_2)_nNH_3^+$				
n=2	0.32	2.56	21.8	6.75
n=3	0.32	4.42	9.00	4.79
n=4	0.23	2.88	9.22	9.58
n=5	0.34	4.44	11.5	6.42
n=6	0.08	10.3	41.6	11.6
n=7	0.20	28.5	82.1	31.8
n=8	0.25	55.7	113.0	52.5
n=9	0.64	63.8	205.0	133.0

Receptor	ESTRUCTURA
6	Ver Figura 7
7	N-tert-Boc-Ala-Ala-Ala-EC-Ala-EC-Ala-CONH-n-Pr
8	N-tert-Boc-Ala-Ala-EC-Ala-Ala-EC-Ala-CONH-n-Pr
9	N-tert-Boc-Ala-EC-Ala-Ala-Ala-EC-Ala-CONH-n-Pr

*EC = 3,4-(18-corona-6)-L-fenilalanina

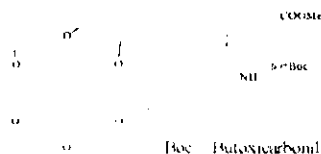


Figura 7. Receptor **6**.

Los valores contenidos en la tabla anterior nos muestran, como en todos los casos revisados, una sorprendentemente alta afinidad de estos receptores hacia las diaminas probadas. Las diferencias pueden ser producto de las variadas conformaciones que puede la cadena polipeptídica. Cabe destacar que la elevada afinidad de estas moléculas también es resultado de la acción cooperativa entre los dos éteres corona con que cuenta el polipéptido. Evidencia experimental complementaria sobre la inclusión del catión amonio en un macrociclo de tipo [18]-N₂O₄ (**Figura 8**) es aportada por el trabajo de Pascard, Riche, Cesario y colaboradores¹⁵. Informan la estructura en estado sólido del criptato formado por el macrociclo [18]-N₂O₄ modificado y el dicatión de cadaverina (1,5-diaminopentano).

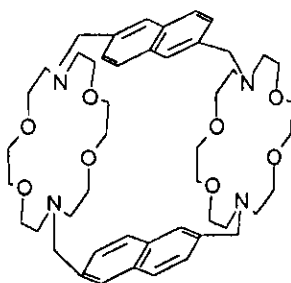


Figura 8: Macrociclo tipo [18]-N₂O₄ unido a naftalenos.

Con base en la evidencia presentada, podemos plantear una serie de consideraciones al respecto de las propiedades de reconocimiento molecular exhibido por los sistemas estudiados:

- Partiendo del hecho que en complejos formados con éteres 18-corona-6 los cationes (orgánicos e inorgánicos) interactúan con los átomos de oxígeno del macrociclo y se acomodan en el interior de la cavidad, podemos esperar que la introducción de sustituyentes en el macrociclo provoque cambios estructurales en la molécula del receptor, y variación en sus propiedades de interacción los ligantes y moléculas de disolvente.
- Existe discriminación central, la cual se origina por la presencia de una cavidad de tamaño dado en el centro del poliéter. Los grupos amino tienen el tamaño justo para anclarse en la cavidad del éter. La sustitución de los protones sobre el átomo de nitrógeno provoca un menor número de interacciones N-O en el complejo, con la consiguiente merma en la estabilidad. Luego, la estabilidad por este efecto tiene la siguiente secuencia:



- La estabilidad de los complejos está fuertemente dominada por contribuciones de tipo no covalente ya mencionadas. La fuerza de enlace esta notablemente influenciada por atracciones electrostáticas.

Todos los ejemplos de receptores para diaminas mencionados anteriormente presentan la limitante de que ninguno de los trabajos mencionados hace alusión a los efectos de la fuerza iónica, concentración de EC o del disolvente sobre la interacción huésped-receptor y se encuentran limitados en cuanto a su aplicación como sensores para diaminas, por las razones instrumentales mencionadas previamente.

2.5 Reconocimiento molecular de aminas aromáticas.

Dentro del extenso campo del reconocimiento de poliaminas, es necesario incluir algunos tópicos acerca de poliaminas aromáticas, con el fin de ampliar el panorama de nuestras expectativas en cuanto a reconocimiento de poliaminas se refiere.

Rebeck y colaboradores²⁰ han estudiado la formación de agregados entre diaminas aromáticas (Figura 9) y un derivado de acridina (Figura 10) en CDCl_3 a 25 °C empleando técnicas de RMN. En su trabajo informan la siguientes constantes de asociación:

Tabla 7: Valores de **K** para el sistema Base + 10 \rightleftharpoons Agregado

Base	$K \times 10^{-3} (\text{M}^{-1})$	Base	$K \times 10^{-3} (\text{M}^{-1})$
DABCO	160	Quinazolina	1.6
Pirazina	1.4	Imidazol	1000
Quinoxalina	23	Benzimidazol	15
Fenazina	2.2	Purina	8
Pirimidina	0.7	Piridina	0.12

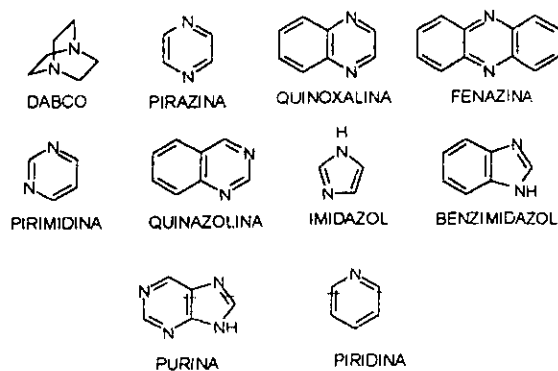
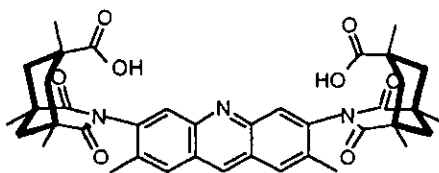


Figura 9. Diaminas (Bases) empleadas como huéspedes.



10

Figura 10. Receptor derivado de acridina.

Los resultados se han interpretado en término de una elevada estabilidad de los complejos debida a contribuciones como “apilamiento π ” y geometría de las moléculas huésped. Sin embargo, estos valores para las constantes de asociación no tienen una correlación con la cantidad de electrones π en el receptor o la contribución por los puentes de hidrógeno formados.

El reconocimiento de poliaminas biológicas tiene como una de sus metas la búsqueda de sistemas supramoleculares capaces de interactuar selectivamente con estas especies químicas. Con ésta idea en mente, Zimmerman y Wu²¹ emplean para tal fin un receptor denominado “tweezer” (**Figura 11**), el cual funciona como agente de reconocimiento para adenina. El valor para la constante de asociación de este agregado lo informan como $25000 \pm 6000 \text{ M}^{-1}$.

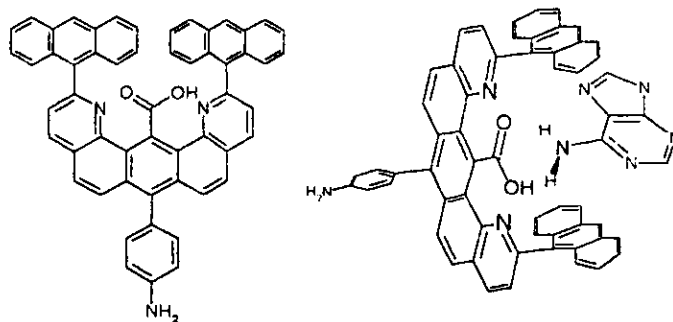


Figura 11. Estructura del tweezers y conformación esperada para su interacción con adenina.

Los estudios de reconocimiento se realizaron en $CDCl_3$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$. La gran estabilidad de este sistema, reflejada en el elevado valor de K se cree es producto de la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amino terminal de la adenina y el carboxilo que se encuentra en el centro del receptor, y del “apilamiento π ” debido a la interacción entre las superficies aromáticas del receptor y el huésped.

Continuando con esta línea de investigación, Adrian y Wilcox²² diseñaron un huésped sintético para el reconocimiento de biotina, adenina y algunos de sus derivados (**Figura 12**). Se informan los valores de K para el receptor y los correspondientes huéspedes (**Tabla 8**). Para este trabajo, las constantes de asociación se determinaron por medio de RMN, empleando como disolvente $CDCl_3$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

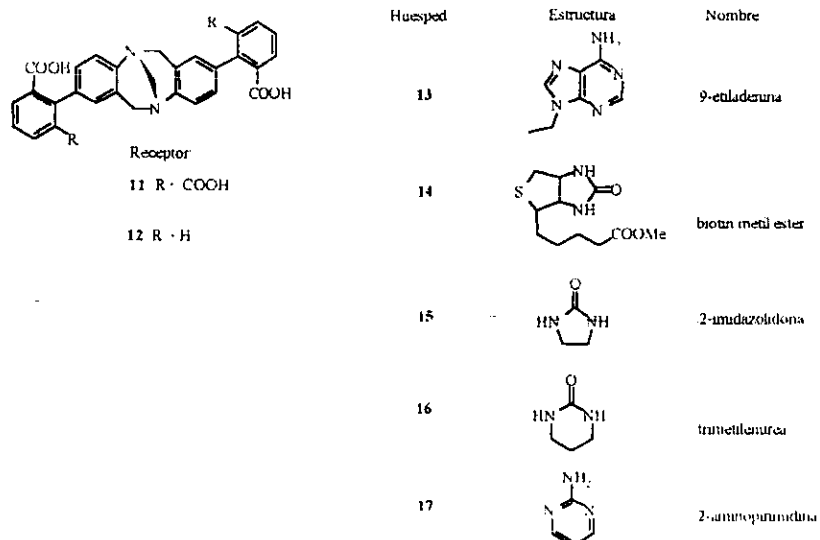


Figura 12. Receptores 11 y 12, y estructuras de los huéspedes empleados.

Tabla 8: Valores de **K** para el sistema Receptor + Huésped \rightleftharpoons Agregado

RECEPTOR	HUESPED	$K \times 10^{-4} (M^{-1})$
11	13	0.014
12	13	4.5 ± 1.7
12	14	1.7 ± 0.3
12	15	2.1 ± 0.4
12	16	3.3 ± 1.6
12	17	0.26 ± 0.05

Se observa a partir de los valores de **K** que los receptores **11** y **12** no son selectivos en cuanto a su interacción con los huéspedes empleados.

2.6 Porphirinas como agentes de reconocimiento molecular.

El empleo de *meso* porfirinas en terapias y estudios por RMN en sistemas donde existe metástasis parte del hecho que en medios peptídicos, las porfirinas interactúan selectivamente con los tejidos tumorales, discriminándolos de otros tejidos²³. Con base en esta información, se ha monitoreado la interacción entre TPPS₄ con un pentapéptido que exhibe propiedades tensoactivas²³. La secuencia del ligante es [(2HCOO⁻), Lys-Ala-Ala-Lys(z)-Tyr-OCH₃]. Para este complejo porfirina-ligante, la constante de asociación que se informa es de $3000 M^{-1}$. El medio empleado es agua, y la temperatura de trabajo es 25 °C.

Morales ha encontrado evidencia experimental de la interacción en medio acuoso entre Coproporfirina I y la molécula de etilendiamina, *en ausencia de un ión metálico coordinado a la porfirina*. Propone que la constante de asociación porfirina-etilendiamina es función de la concentración de la especie protonada de diamina⁹. Es el primer reporte de la asociación entre Coproporfirina I con diaminas alifáticas.

Voyer y Maltois²⁴ han sintetizado una serie de moléculas (**Figura 13**) que incluyen en su estructura metaloporfirinas de zinc (II), en específico TPP. Este receptor se prueba con diaminas H₂N(CH₂)_nNH₂ (n = 2-8) y *n*-propilamina. Existe evidencia espectroscópica de la formación de complejos 1:1 entre la diamina y el receptor.

- [Zn₂·1] : Boc-Ala-X-Ala₂-X-Ala-OMe
 [Zn₂·2] : Boc-Ala-X-Ala₃-X-Ala-OMe
 [Zn₂·3] : Boc-Ala-X-Ala₆-X-Ala-OMe
 [4] : Boc-X-Ala-X-OMe
 [5] : Boc-X-Ala-X-OH

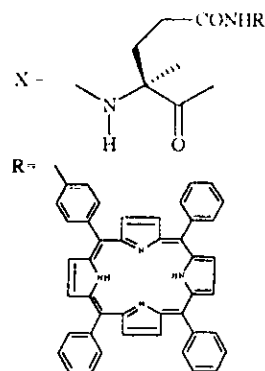


Figura 13. Estructura de receptores empleados por Voyer y Maltois.

De este trabajo se desprenden una serie de valores para las constantes de asociación. El mayor valor de **K** se tiene para el agregado formado por las especies [Zn₂·2] y 1,5-diaminopentano, siendo del orden de 10^9 M^{-1} , y para las demás diaminas, este valor oscila entre 5×10^5 y $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Los estudios de asociación se realizaron en CHCl_3 , a 25°C . Se observa por tanto la formación de complejos sumamente estables. El elevado valor de **K** puede interpretarse en términos de una gran acción cooperativa de las porfirinas de zinc en el polipéptido y de los cambios conformacionales que sufre la cadena de aminoácidos.

Los resultados de este trabajo confirman que los receptores pueden enlazarse selectivamente a los sustratos si la ganancia en estabilidad de los agregados formados sobrepasa la pérdida entrópica asociada con los procesos de reconocimiento ($|\Delta H_{\text{asoc}}| > |T\Delta S_{\text{asoc}}|$). Dicho comportamiento se observa de manera frecuente en receptores naturales, y se conoce como mecanismo de ajuste inducido²⁵. La caracterización de este sistema es particularmente sencilla, debida al hecho de que es posible llevarla a cabo por medio de técnicas de UV-visible.

Es claro que muchos de los anfitriones mencionados previamente se coordinan a las poliaminas, por lo cual no continuaremos con el estudio de sus propiedades como receptores de dichas especies.

La razón de incluir los sistemas de reconocimiento para aminas alifáticas anteriormente mencionados solo tuvo el propósito de examinar algunos de los anfitriones que pudieran ser funcionalmente análogos a CP-I.

2.7 Coproporfirina I (CP-I).

La evidencia recabada indica que los estudios de reconocimiento de poliaminas se facilitan con el empleo de un receptor aniónico, pero que carezca de un sitio que de origen a la inclusión del catión amonio y con propiedades espectrales fácilmente caracterizables. Estos requisitos confluyen en la **CP-I**. Presenta cuatro grupos ionogénicos (carboxilatos), por lo que es soluble en agua (**Figura 14**).

La **CP-I** es un tetraanión a valores de pH mayor que 7 (**Figura 15**). Su **pKa** es 6 aproximadamente⁹. Tiene además un coeficiente de extinción molar muy grande ($\epsilon \approx 5 \times 10^5$) en la banda de Soret, que se ubica alrededor de 400 nm, así como una elevada intensidad de fluorescencia.

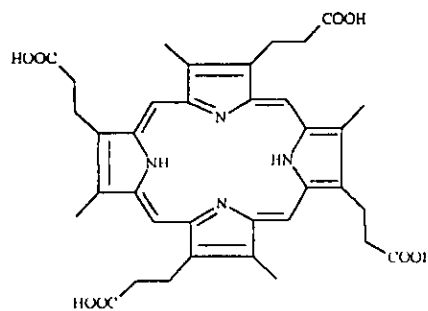


Figura 14: Coproporfirina I

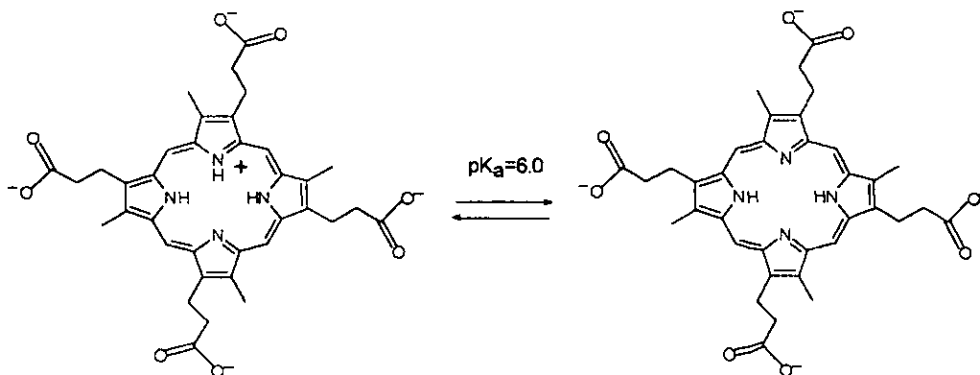
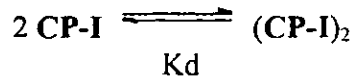


Figura 15. Equilibrio de protonación de Coproporfirina I (*buffer* fosfatos/boratos, $I = 0.1$, 25 °C)

Además, se conoce que la Coproporfirina presenta dimerización:



El valor reportado⁹ para la K_d es 1.2×10^{-5} M ([NaCl] 0.1 M, 25°C), de manera que bajo estas condiciones, se puede esperar que al manejar concentraciones del orden de 10^{-6} M, se encuentre en solución un porcentaje no mayor al 10% de **CP-I** en su forma dimérica.

2.8 Poliaminas.

La razón de probar como huéspedes a diversas poliaminas (**Figura 16**) se debe al hecho de que estas moléculas son componentes importantes de los sistemas vivos; y se encuentran ampliamente distribuidas en células procariotes y eucariotes; tienden a influir procesos tales como crecimiento, diferenciación, replicación de DNA, síntesis y traslación de RNA, transporte y actividad de membranas, e interacciones específicas con varias enzimas²⁶.

A nivel molecular, sus funciones se realizan esencialmente a través de interacciones específicas entre las poliaminas en su forma protonada con las especies receptoras mediante la atracción electrostática del catión al sitio aniónico de la molécula biológica.

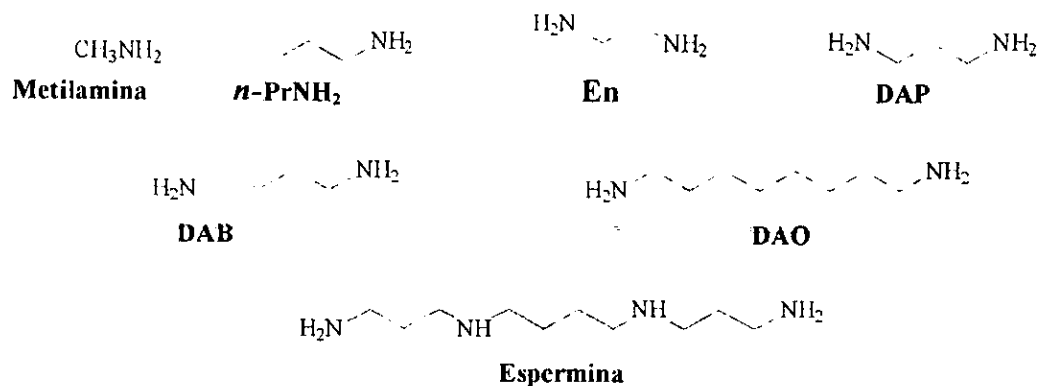


Figura 16. Estructura de aminas empleadas para estudios de reconocimiento.

La acción multifuncional de las poliaminas se origina de sus características estructurales. Las cargas positivas localizadas sobre los grupos amino están distribuidas a longitudes fijas sobre una cadena hidrocarbonada lineal, y de conformación flexible. Es precisamente esta cadena la que les confiere la posibilidad de presentar interacciones hidrofóbicas, mismas que contribuyen de manera notable en los procesos de reconocimiento molecular.

La importancia de estos cationes orgánicos y sus interacciones no covalentes ha generado una serie de estudios sobre reconocimiento molecular con los propósitos de entender mejor su comportamiento en los sistemas biológicos, desarrollar mecanismos biomiméticos capaces de funcionar como sensores para poliaminas y diseñar modelos sintéticos de sistemas complejos tales como enzimas, con el fin de conocer los mecanismos que rigen sus interacciones intermoleculares, mismas que dan origen a sus propiedades conformacionales y de enlazamiento con otras especies.

Durante las últimas dos décadas, el interés por el estudio de poliaminas tales como **espermina**, espermidina, cadaverina (1,5-diaminopentano), y putresceína (**1,4-diaminobutano**) se ha incrementado notablemente debido a que estas aminas son especies de vital importancia clínica, ya que *su concentración es sorprendentemente elevada en organismos que sufren carcinogénesis*²⁶.

3.- OBJETIVOS Y METAS.

El propósito del presente trabajo es el estudio de las interacciones no covalentes (de tipo electrostático e hidrofóbico) entre una porfirina soluble que presenta un arreglo de 4 cargas negativas en agua y algunos ligantes que poseen un balance de los sitios iónicos e hidrofóbicos en una geometría variable.

En particular se pretende

- Probar la complejación no covalente entre varias poliaminas con diferentes cargas totales y la molécula de **CP-I**, para evaluar la contribución de interacciones carga - carga.
- Analizar la influencia de variables en el proceso de asociación tales como:
 - 1) Variación en la carga del huésped mediante su protonación a diferentes valores de pH, para calcular la **K** de asociación con las formas protonadas individuales de cada amina y saber el efecto de la carga total en la magnitud de **K**.
 - 2) Variación de la fuerza iónica (**I**), para obtener el valor de la constante de asociación termodinámica.
 - 3) Realizar una comparación de huéspedes con diferentes estructuras y distancias carga - carga en su proceso de asociación con **CP-I**, así como la evaluación de la capacidad de reconocimiento de la Coproporfirina I por mono-, di- y poliaminas.

4.- METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

4.1 Reactivos:

La Coproporfirina I (21H, 23H-porfina-2,7,12,17-tetraácido propiónico-3,8,13,18-tetrametil [531-14-6]) se obtuvo comercialmente de *Aldrich* en forma de clorhidrato. y se uso sin purificación posterior. La etilendiamina, espermina, y 1,4-diaminobutano se obtuvieron comercialmente de *Aldrich* en forma de clorhidrato y se emplean sin purificación adicional. La metilamina, *n*-propilamina, 1,3-diaminopropano, y 1,8-diaminooctano se obtuvieron comercialmente de *Aldrich*, y se usan, también, sin purificación posterior. El $K_4[Fe(CN)_6]$ se obtuvo comercialmente de *Químicos Monterrey* y se utiliza sin purificación adicional.

Los disolventes empleados fueron agua deionizada, obtenida de equipos *Milli-Q Water Reagent System* y *NANO pure ultrapure water-system*, además de etanol absoluto (*Baker*), el cual se purificó de acuerdo con los métodos descritos en la literatura²⁷.

4.2 Instrumental.

4.2.1 Estudios por técnicas de espectroscopía de absorción en la región UV-visible:

Fue usado un espectrofotómetro *Hewlett - Packard HP8453* de arreglo de diodos (ventana espectral de 190-1100 nm y resolución de 1 nm). El equipo estaba acoplado a un controlador de temperatura Peltier *HP8990* ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones de **CP-I** entre 0.55 y 1.1 μM , preparadas a partir de una disolución *stock* 0.35 μM mediante las diluciones pertinentes. Dicho *stock* se preparó pesando la cantidad requerida de clorhidrato de **CP-I**, añadiéndole posteriormente agua deionizada, y alícuotas de una disolución de NaOH 0.1 M (*Aldrich*) hasta la disolución de la **CP-I**. Posteriormente, se añade agua deionizada hasta el volumen requerido. El *stock* permanece estable por varias semanas si se mantiene en refrigeración y protegida de la luz.

4.2.2 Estudios por espectroscopía de emisión electrónica.

Fue usado un espectrofluorómetro *Fluoromax - Spex* (ventana espectral de 200 a 800 nm) acoplado a un baño de temperatura controlada (± 0.1 °C) y celdas de cuarzo de 1 cm. Se emplearon disoluciones de **CP-I** con un intervalo de concentración entre 0.1 y 0.5 μM , las cuales se prepararon a partir de una disolución *stock* de **CP-I** 0.35 mM mediante las diluciones pertinentes. Los espectros de emisión para cada experimento se adquirieron con una longitud de onda de excitación en 392 nm (λ_{max} del espectro UV-visible) y una apertura (slit) de 0.5 mm.

4.2.3 Medición del pH

El pH de las disoluciones fue determinado con un potenciómetro *ORION* modelo 710-A, con una precisión de ± 0.005 unidades de pH y electrodos de vidrio combinado de la marca *ROSS*. La elaboración de estas disoluciones se hizo con base en las técnicas descritas en la literatura²⁸ utilizando reactivos de calidad R. A. y agua deionizada.

4.3 Preparación de las disoluciones.

Todas las disoluciones empleadas en las titulaciones espectrofotométricas y fluorométricas fueron preparadas en *buffer* de fosfatos/boratos 5 mM, con un valor de pH deseado, y conteniendo EDTA 0.5 mM. Esto último se debe al hecho que la presencia de iones metálicos en el agua empleada para la preparación de las disoluciones de **CP-I** modifica los espectros de absorción y fluorescencia⁹ de **CP-I**, por lo que el efecto de dichos iones debe ser enmascarado con un quelatante fuerte.

La fuerza iónica de las disoluciones se ajustó añadiendo NaCl (*Mallinckodt*). *Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.*

5.- RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 Efecto de fuerza iónica sobre el grado de agregación de CP-I.

Debido al hecho de que los huéspedes elegidos son especies iónicas, la titulación de **CP-I** con ellos debe realizarse a una fuerza iónica constante. Para determinar el valor máximo de la fuerza iónica en cual el grado de agregación de la **CP-I** permanece sin cambio, se estudiaron los espectros de absorción de la porfirina, a fuerza iónica variable.

En nuestro experimento, a una disolución de **CP-I** 1.1 μM (en *buffer* fosfatos/boratos) se le adicionan alícuotas de una disolución 1M de NaCl, y se registra el espectro de absorción correspondiente. El pH de trabajo es 8 y la temperatura es de 25 °C.

Con base en los valores para el cociente de las absorbancias evaluadas a 372 y 392 nm (**Figura 17**) es posible calcular la relación monómero dímero por medio de la ecuación empírica propuesta por Morales⁹:

$$\frac{A_{392nm}}{A_{372nm}} = \frac{\alpha X + \beta}{\gamma + X}$$

donde $A_{392nm}/A_{372nm} = 1.917 \pm 0.003$

$$\alpha = 1.926$$

$$\beta = 1.984$$

$$\gamma = 3.382$$

$$X = [\text{Monómero}]/[\text{Dímero}]$$

Con base en el ajustes para la absorbancia de los espectros de **CP-I** en las condiciones probadas, encontramos que el valor del parámetro X, en el intervalo de concentraciones de NaCl empleado tiene un valor de 40; es decir *la relación [Monómero]/[Dímero] nos indica que del total de CP-I en disolución, una cantidad $\geq 95\%$ permanece como monómero* (ver **Apéndice I**).

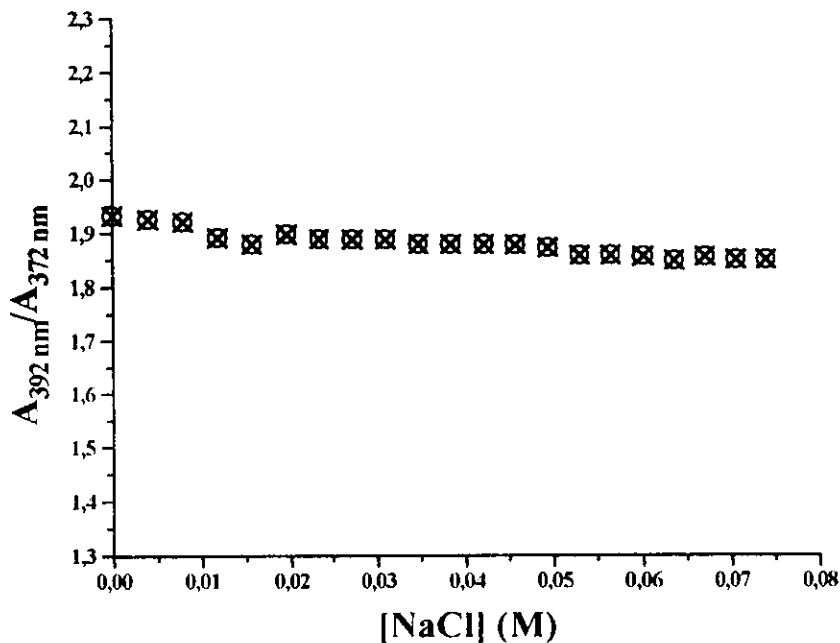


Figura 17. Dependencia del cociente de absorbancias a 392 y 372 nm de CP-I 1.1 μM como función de la concentración de NaCl.

5.2 Interacción de CP-I con monoaminas.

Hemos visto que los anfitriones para poliaminas basados en éteres corona presentan solo una moderada selectividad entre mono y diaminas. Con ello en mente, se pretende conocer el grado de reconocimiento de CP-I por metilamina (Me-NH_2) y *n*-propilamina (*n*-PrNH₂) ambas en forma protonada, por medio de técnicas de espectroscopía de fluorescencia y de UV-visible.

5.2.1 Metilamina (Me-NH₂).

Podemos esperar que la interacción CP-I-Amina provoque un apagamiento de la intensidad de fluorescencia⁵⁻⁹ o que se presente una dependencia entre la absorbancia del analito y la concentración del titulante⁴. Con el fin de probar los planteamientos anteriores, se valoró una disolución de CP-I con Me-NH₂, manteniendo fijos el pH, la fuerza iónica y la temperatura (Figuras 18 y 19). Dado que el pKa reportado²⁹ de Me-NH₂ es 10.66, al trabajar a pH = 8, aseguramos que se encuentra protonada.

Los datos presentados muestran que no existe una tendencia clara en cuanto a los valores de absorbancia (Figura 18) o intensidad de fluorescencia (Figura 19) como función de la concentración de metilamina, lo que es un indicativo de la nula complejación entre estas dos especies. El valor absoluto de la diferencia entre absorbancia inicial y final para este sistema es de 0.0042 unidades. Esta diferencia impide que los ajustes realizados proporcionen valores confiables para el cálculo de la constante de asociación. Cabe destacar que la diferencia de absorbancias es similar a la que se presenta como resultado del aumento en la fuerza iónica del medio.

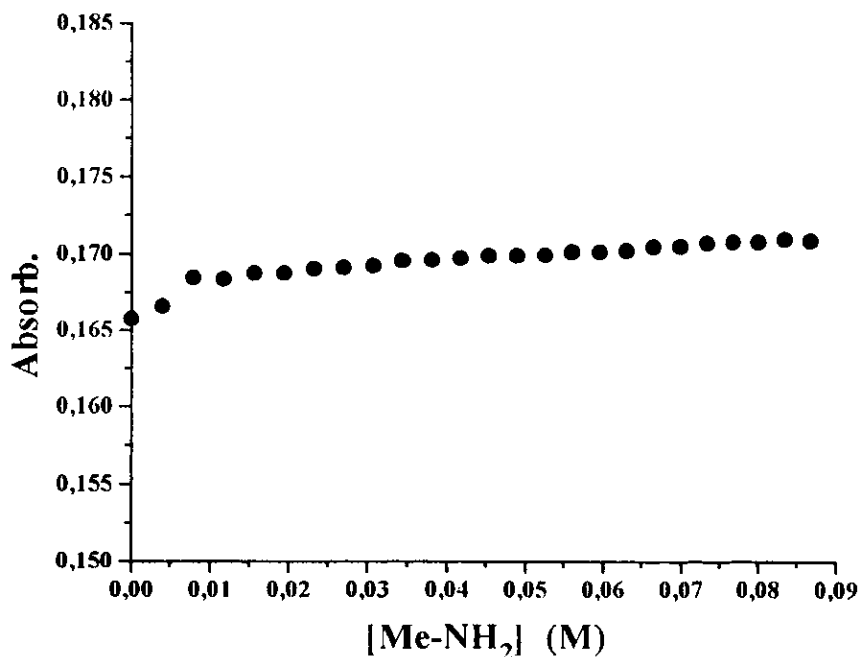


Figura 18. Datos experimentales de la valoración espectrofotométrica de CP-I con Me-NH₂ ($\lambda = 392$ nm).

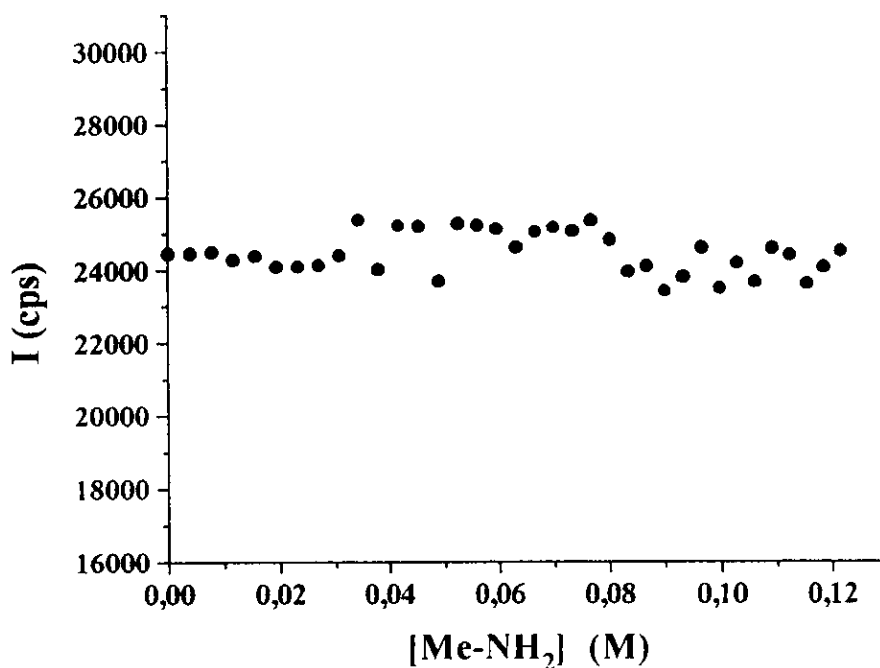


Figura 19. Datos experimentales de la valoración fluorométrica de **CP-I** con **Me-NH₂**.
($\lambda_{\text{max}} = 609 \text{ nm}$).

5.2.2 *n*-propilamina (*n*-PrNH₂).

La *n*-PrNH₂ presenta un valor de **pKa** reportado²⁹ igual a **10.74**, por lo que siempre se encuentra protonada en nuestro experimento a pH 8. Se realizaron únicamente titulaciones por técnicas UV - visible. En la **Figura 20** se anexa un ejemplo de los datos experimentales para la valoración de **CP-I** con *n*-PrNH₂.

Encontramos que el valor absoluto de la diferencia entre la absorbancia inicial y final es de 0.0036 unidades, el cual es inferior al valor correspondiente a la valoración con Me-NH₂. Con base en los argumentos que se presentaron anteriormente, podemos esperar por tanto que la Coproporfirina I no forme complejos estables en medio acuoso con las formas protonadas de la Me-NH₂ y *n*-PrNH₂ en las condiciones probadas.

Es interesante notar que la hidrofobicidad de la $n\text{-PrNH}_3^+$ derivada de la presencia de tres grupos metileno no aporta una contribución detectable para la asociación con CP-I; comparemos por ejemplo la asociación de alcoholes alifáticos con ciclodextrinas³⁰; al pasar de un medio como metanol, a n -propanol, la K con α -ciclodextrina sube desde un valor difícil de detectar (2.3 M^{-1}) hasta un notable valor de 20.4 M^{-1} para el complejo α -ciclodextrina + $n\text{-PrOH}$.

Más aún, si volvemos a comparar las constantes de asociación para Me-NH_2 con éteres corona sustituidos^{14,16-19}, estas oscilan entre 100 y 65000 M^{-1} ; luego, los resultados de nuestros experimentos muestran que la CP-I presenta poca o ninguna tendencia a asociarse con monoaminas protonadas.

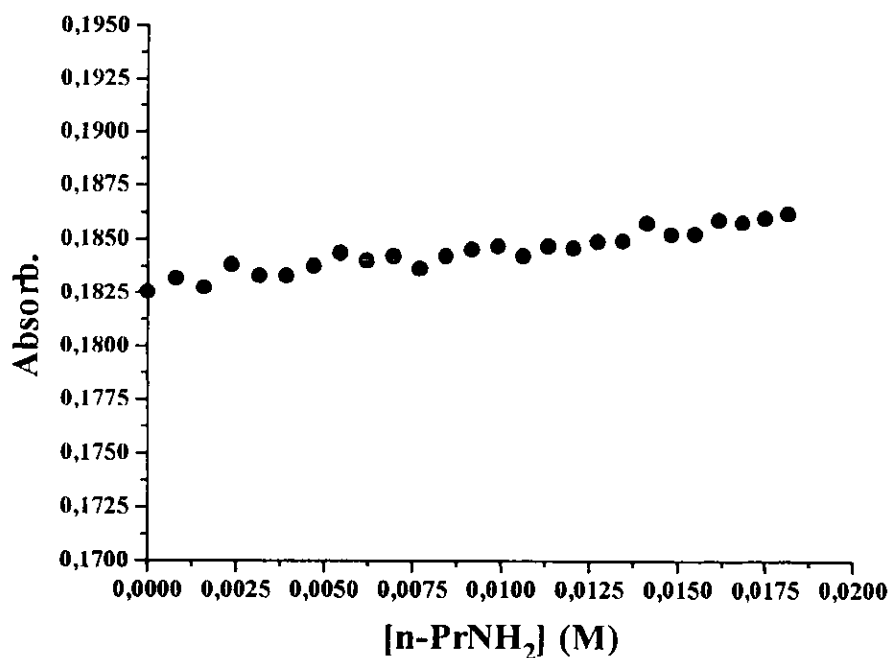


Figura 20. Datos experimentales de la valoración espectrofotométrica de CP-I con $n\text{-PrNH}_2$.
($\lambda = 392 \text{ nm}$).

5.3 Reconocimiento molecular de diaminas

5.3.1 Absorbancia e intensidad de fluorescencia como función de la concentración de huésped.

En el caso de la formación de un complejo entre **CP-I** y algún huésped, la dependencia entre la absorbancia a una longitud de onda fija, corregida por efecto de dilución, y la concentración de huésped añadido puede representarse por medio de la **Ecuación 1** (ver **Apéndice 1**):

$$\text{Absorb.} = (\text{Absorb}_0 + \text{Absorb}_\infty K[\text{huésped}]) / (1 + K[\text{huésped}]) \quad (1)$$

En condiciones de $[\text{huésped}] \gg [\text{CP-I}]$, donde A_0 y A_∞ son las absorbancias de **CP-I** en ausencia de huésped y a saturación respectivamente³¹.

De manera análoga, la dependencia entre la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija, corregida por efecto de dilución, y la concentración del huésped añadido puede representarse con la **Ecuación 2** (ver **Apéndice 1**):

$$I = (I_0 + I_\infty K[\text{huésped}]) / (1 + K[\text{huésped}]) \quad (2)$$

donde I_0 e I_∞ son las intensidades de fluorescencia de **CP-I** en ausencia de huésped y a saturación respectivamente.

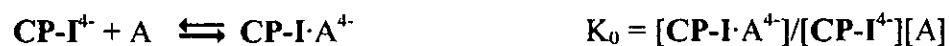
Los parámetros de las **Ecuaciones (1)** y **(2)** fueron calculados mediante un ajuste de los datos experimentales en coordenadas Absorb. vs. $[\text{huésped}]$ o I vs. $[\text{huésped}]$ empleando un programa de regresión no lineal (**Origin 3.5**).

5.3.2 Equilibrios en el sistema CP-I + diaminas.

Protonación de diamina:



Asociación:



Donde:

A = Diamina

CP-I⁴⁻ = Coproporfirina en forma tetraaniónica.

AH⁺ = Diamina monoprotonada

AH₂²⁺ = Diamina diprotonada

5.3.3 Etilendiamina (En).

En el estudio del reconocimiento de etilendiamina, se emplearon técnicas de UV-visible y fluorescencia. La razón es comparar los valores de **K**, obtenidos a partir de los datos generados por estas dos espectroscopías, y poder hacer uso de ellas en cualquier circunstancia, con la certeza de que los resultados obtenidos serán reproducibles por ambas técnicas.

Inicialmente, pretendemos conocer cuales son los valores de la **K** para el complejo *CP-I + En*, con diferentes grados de protonación para la **En**. Los valores de las constantes de disociación para la 1ª y 2ª desprotonación de esta diamina son 8.32×10^{-8} y 1.412×10^{-10} respectivamente²⁹.

Para las constantes de asociación obtenidas por espectroscopia UV-visible se informa el promedio de los valores calculados a 6 longitudes de onda en un intervalo de 365-402 nm. Las **K** obtenidas por espectroscopia de fluorescencia se calcularon tomando la λ_{\max} de emisión, que corresponde a 609 nm (**Tabla 9**). Se muestran ejemplos de ajustes para los datos colectados por técnicas de espectroscopia de fluorescencia y UV-visible. (**Figuras 21 y 22**)

Se observa que existe una dependencia entre la concentración de titulante y la absorbancia o intensidad de fluorescencia, dependiendo la técnica empleada. Es posible ajustar esta dependencia por medio de las **Ecuaciones 1 y 2**. Se prueba entonces que la **CP-I** y la **En** forman agregados relativamente estables, y el valor de la **K** depende del pH del medio. De acuerdo con los valores de **pKa** para **En** dentro del intervalo de pH estudiado, esa especie se encuentra mono- o dicatión. El incremento observado en **K** al trabajar en valores de pH bajos refleja una interacción más fuerte de la **CP-I** con la forma dicatiónica. Las **K** de las formas individuales fueron calculadas mediante un ajuste de la dependencia de **K** vs pH (ver sección 5.5).

Tabla 9. Valores de **K** para el sistema **CP-I + En** \rightleftharpoons **CP-I•En** ($I = 0.1$ M):

pH	*K (M ⁻¹)	**K (M ⁻¹)
7	105 ± 15	85 ± 5
8	33 ± 3	35 ± 10
8.5	16 ± 1	ND
9	9 ± 1	16 ± 8

* Determinada por espectroscopia UV-visible; ** Determinada por espectroscopia de fluorescencia. ND: No determinada

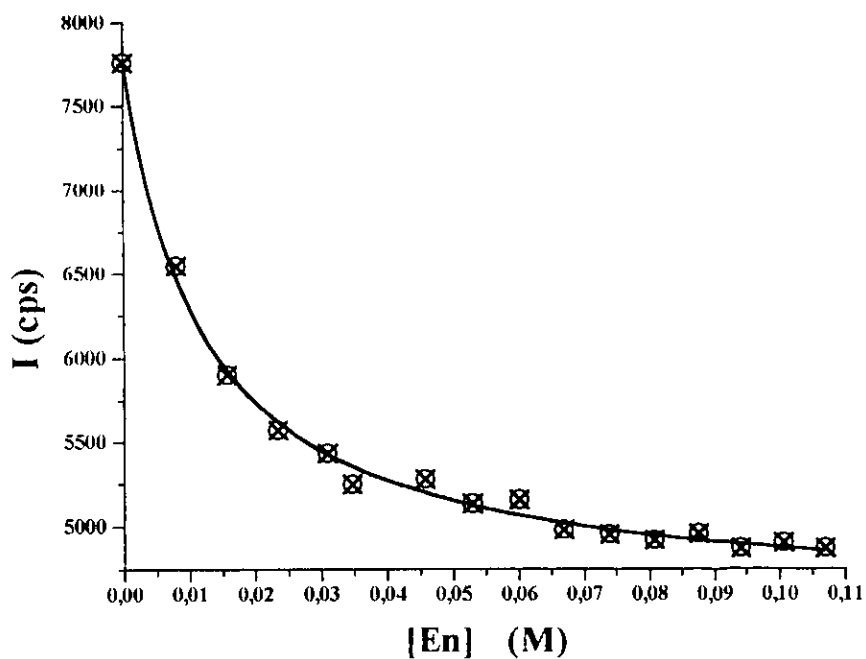


Figura 21. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para valoración fluorométrica de **CP-I** con **En** (pH 7, $I = 0.1$, $\lambda_{\text{max}} = 609$ nm).

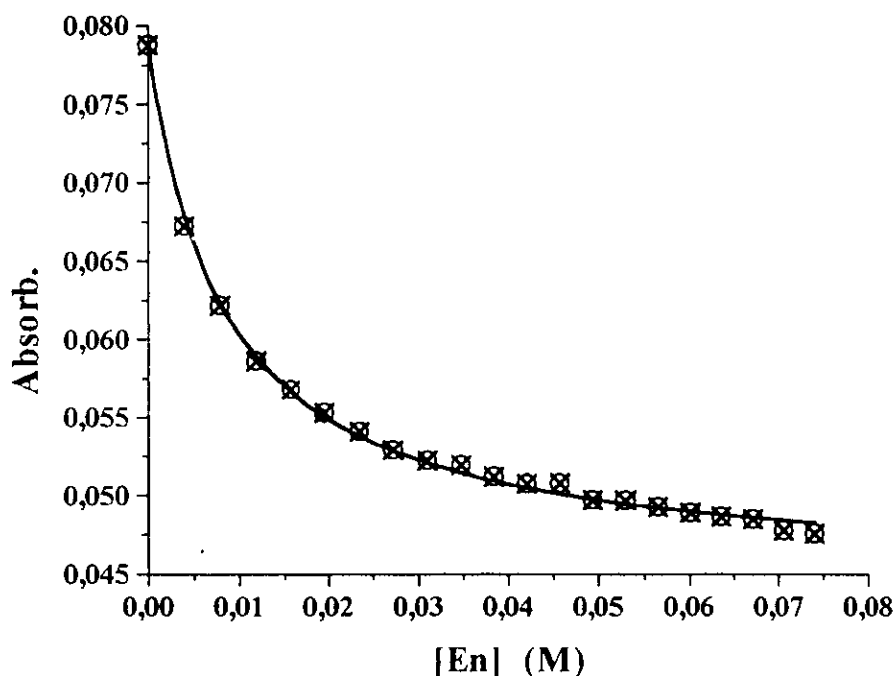


Figura 22. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración espectrofotométrica de CP-I con etilendiamina. (pH 7, $I = 0.1$, $\lambda = 392$ nm)

5.3.4 1,3-diaminopropano (DAP).

Hemos visto que los valores de las K determinadas por técnicas de espectroscopia de fluorescencia y UV-visible no presentan grandes discrepancias *en cuanto al orden de magnitud*, y que los valores de dicho parámetro, determinado por una u otra técnica pueden ser empleados con la seguridad que serán reproducibles y confiables. Con éste huésped únicamente se hicieron valoraciones por espectroscopia UV-visible.

Se informan los valores para la K para el complejo CP-I-DAP con diferentes grados de protonación para DAP. Los valores de las constantes de disociación para la primera y segunda desprotonación de esta diamina son 1.82×10^{-9} y 3.02×10^{-11} respectivamente²⁹. La magnitud de K se obtuvo como el promedio de los valores calculados a 6 longitudes de onda en un intervalo de 365-402 nm. (Tabla 10)

Se observa que los espectros de absorción para una de las titulaciones de **CP-I** con **DAP** (**Figura 23**), muestran un comportamiento típico para la mayoría de los sistemas estudiados (disminución de la absorbancia en 392 nm y dos puntos isobésticos alrededor de 375 nm y 415 nm, los cuales indican la presencia de sólo dos forma de porfirina: libre y complejada)

Tabla 10. Valores de **K** para el sistema **CP-I + DAP** \rightleftharpoons **CP-I·DAP** ($I = 0.1$ M):

pH	$K(M^{-1})$
7	140 ± 30
8	75 ± 5
9	50 ± 3
10	30 ± 4
11	0.7 ± 0.5

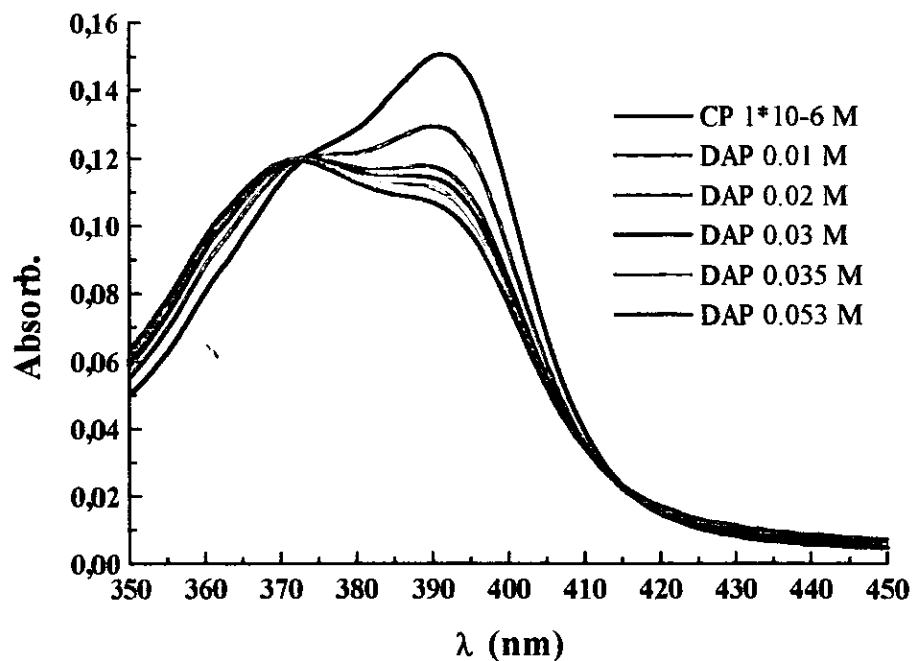


Figura 23. Espectros de absorción para la titulación de **CP-I** con **DAP**.
(pH 7, $I = 0.1$)

5.3.5 1,4-diaminobutano (DAB).

Continuando con la serie de diaminas alifáticas, emplearemos la sustancia conocida como putresceína (DAB). Los valores de las constantes de disociación para la primera y segunda desprotonación de esta diamina son 3.631×10^{-10} y 1.905×10^{-11} respectivamente²⁹.

Para las constantes obtenidas por espectroscopía UV-visible se informa el promedio de los valores calculados a 6 longitudes de onda en un intervalo de 365-402 nm. Las **K** calculadas por espectroscopía de fluorescencia se calcularon tomando la λ_{\max} de emisión, que corresponde a 609 nm (Tabla 11).

Se muestran ejemplos de ajustes para los datos colectados por espectroscopía UV-visible y de fluorescencia (Figuras 24 - 26) y espectros de emisión para la valoración fluorométrica de CP-I con DAB (Figura 27).

El comportamiento de la CP-I de la absorbancia como función de la concentración de DAB es notoriamente diferente de los casos previos: *únicamente en presencia de bajas concentraciones de diamina se observan cambios en la absorbancia similares a los presentados en la Figura 22; después, la absorbancia de la CP-I se incrementa como resultado del aumento en la concentración del titulante (Figuras 25 y 26)*. Este segundo cambio en la absorbancia es más grande y está acompañado por una notable ampliación de las bandas espectrales.

Formalmente, dicho cambio puede ajustarse a un modelo de asociación entre CP-I con un segundo ión de DAB, pero no es claro por qué se incrementa la absorbancia. Como ya mencionamos, es posible que concentraciones elevadas de DAB promuevan una nueva agregación de CP-I para formar algunos agregados neutros del tipo $(\text{CP-I})_n(\text{DAB})_{2n}$. Los valores de **K** se calcularon únicamente en regiones iniciales donde los cambios espectrales están de acuerdo con un modelo de interacción 1:1.

Tabla 11. Valores de **K** para el sistema **CP-I + DAB** \rightleftharpoons **CP-I·DAB** ($I = 0.1 \text{ M}$):

pH	*K (M^{-1})	**K (M^{-1})
7	93 ± 1	ND
8	76 ± 1	ND
9	60 ± 2	57 ± 1
10	31 ± 1	27 ± 1.1
11	4 ± 1	8 ± 1

* Determinada por espectroscopia UV-visible: ** Determinada por espectroscopia de fluorescencia. ND: No determinada

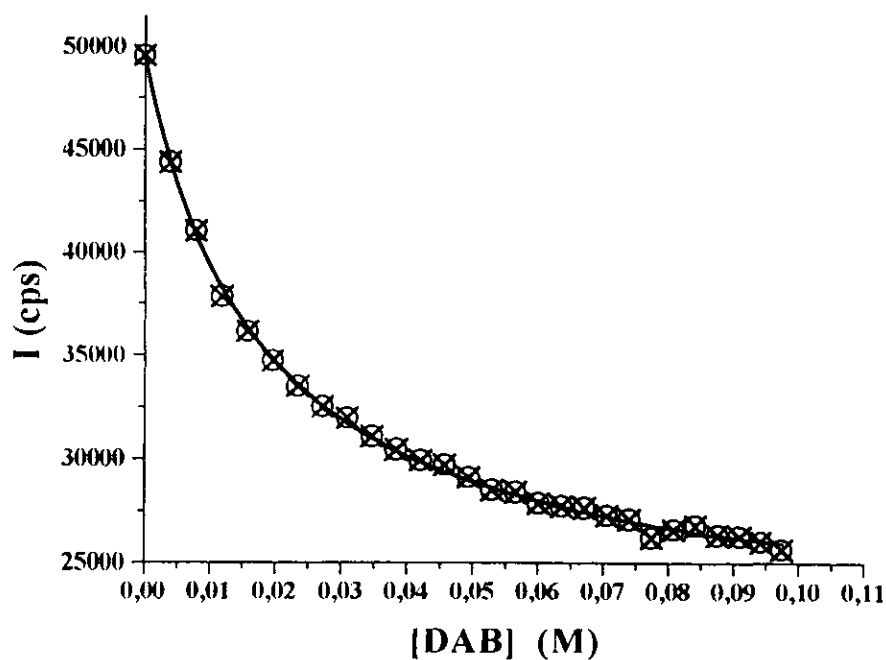


Figura 24. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración fluorométrica de **CP-I** con **DAB** (pH 9, $I = 0.1$, $\lambda_{\text{max}} = 609 \text{ nm}$).

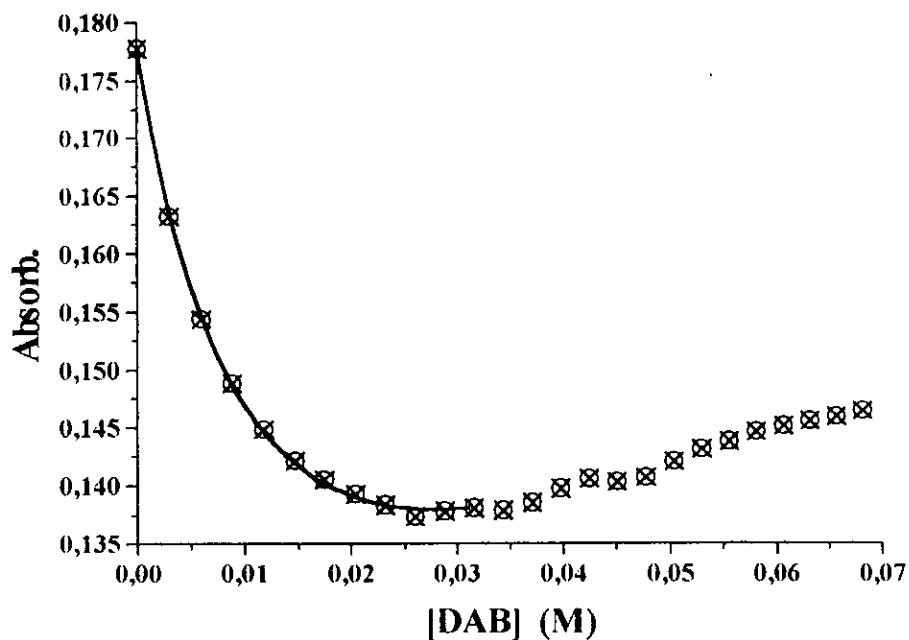


Figura 25. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración espectrofotométrica de CP-I con DAB (pH 8, $l = 0.1$, $\lambda = 392$ nm).

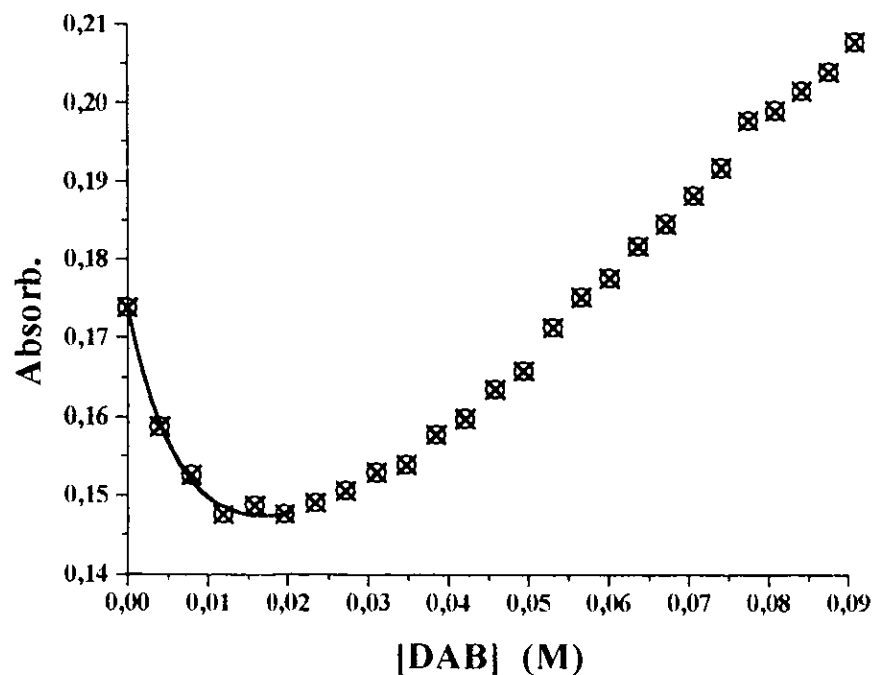


Figura 26. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración espectrofotométrica de CP-I con DAB (pH 9, $l = 0.1$, $\lambda = 392$ nm).

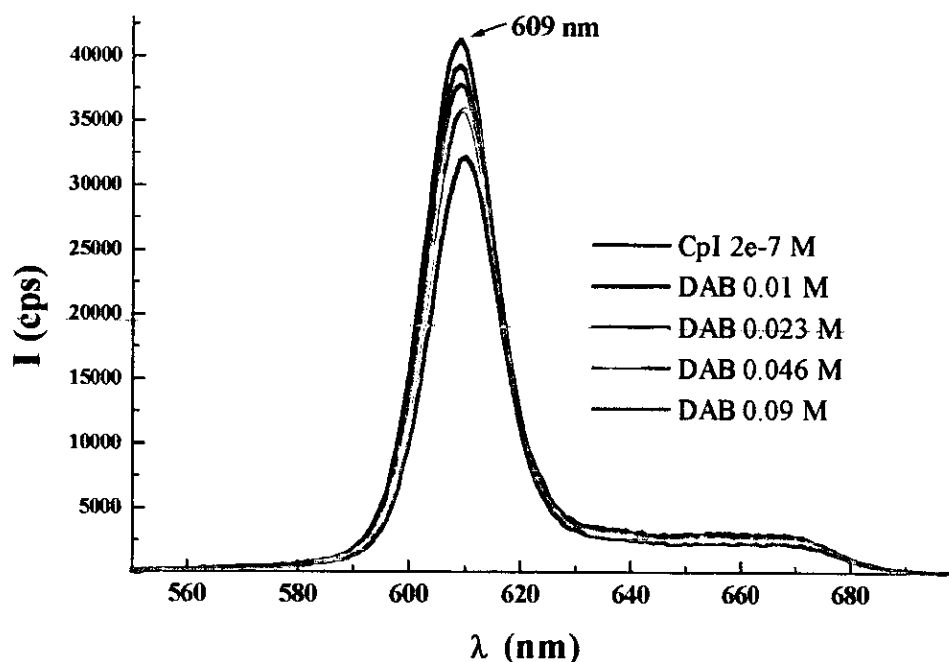


Figura 27. Espectros de emisión para la titulación de CP-I con DAB.

(pH 11, $I = 0.1$, $\lambda_{\max} = 609$ nm)

5.3.6 1,8-diaminooctano (DAO).

Para finalizar con la serie de diaminas alifáticas, se empleó la diamina conocida como 1,8-diaminooctano. Para esta especie orgánica estamos interesados sólo en conocer cual es la constante de asociación entre CP-I con la forma diprotonada del DAO. Se informa la K a pH 8 (Tabla 12). Los valores de las constantes de disociación para la primera y segunda desprotonación de esta diamina son 4.677×10^{-11} y 1.096×10^{-11} respectivamente³². Se informa el promedio de los valores calculados a 6 longitudes de onda en un intervalo de 365-402 nm. Se muestra un ejemplo de ajuste para los datos colectados (Figura 28) y los espectros de absorción para la valoración de CP-I con DAO (Figura 29).

Para esta diamina observamos que la concentración a la cual comienza a incrementarse la absorbancia es menor que para DAB; el aumento en la absorbancia comienza a concentraciones de aproximadamente 10 mM de DAO. El valor para la constante de asociación se calculó únicamente en aquellas regiones donde la concentración de titulante alcanza para aumentar el valor de la absorbancia.

El cambio en la absorbancia, como ya mencionamos puede ser resultado de una estequiometría mas compleja o de la inducción de procesos de autoasociación en la **CP-I**. El valor de la constante de asociación nos muestra que la **CP-I** y la **DAO** forman complejos muy estables en medio acuoso y bajo las condiciones que hemos probado.

De la comparación entre los valores informados en las **Tablas 9-12**, se observa que los complejos entre **CP-I** y **DAO** son mas estables que aquellos que involucran diaminas con cadenas más cortas. La razón de esta aserción se basa en que la **K** para el agregado **CP-I·DAO** presenta el valor más grande de todos los determinados durante los experimentos. Esto nos indica que en efecto, la **CP-I** es capaz de interactuar más selectivamente con **DAO** que con las diaminas de menor longitud.

Tabla 12. Valores de **K** para el sistema **CP-I + DAO** \rightleftharpoons **CP-I·DAO** ($I = 0.1$ M)

pH	$K(M^{-1})$
8	350 ± 50

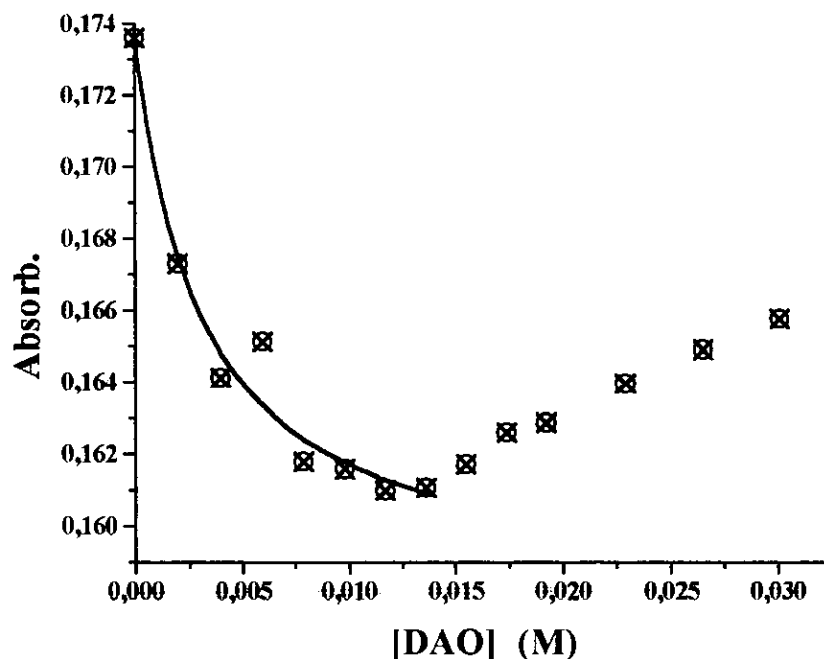


Figura 28. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración espectrofotométrica de **CP-I** con **DAO** (pH 8, $I = 0.1$, $\lambda = 391$ nm).

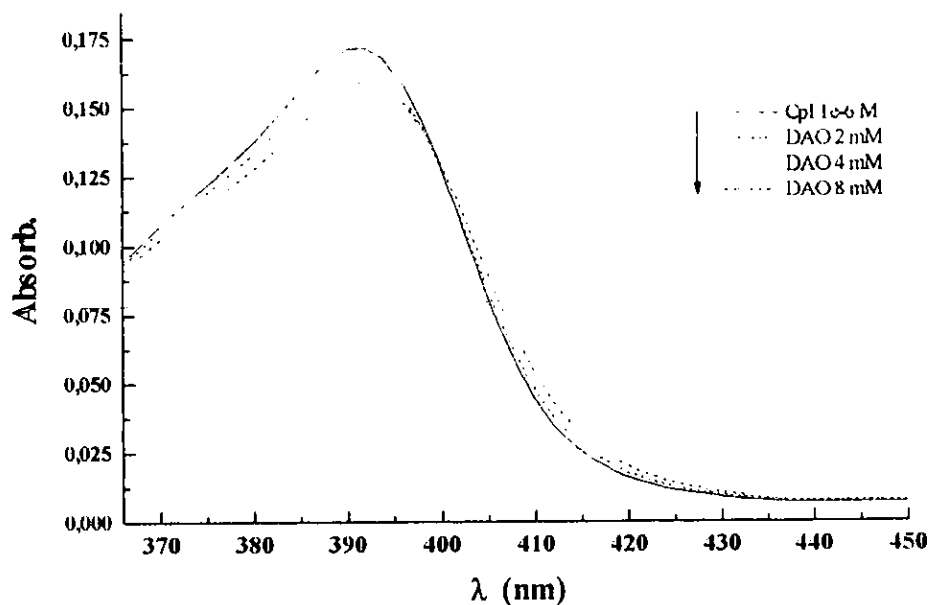


Figura 29. Espectros de absorción para la titulación de **CP-I** con **DAO**.
(pH 8, $I = 0.1$)

5.3.7 Espermina (SP).

La espermina (*N,N'*-Bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano) es una poliamina que cuenta con cuatro grupos amino. Bajo las condiciones de nuestros experimentos, emplearemos esta tetraamina con diferentes grados de protonación. Los valores de pK_a^{33} para esta especie son los siguientes:

Equilibrio:	pKa
$(HL^+ / H^+ + L)$	10.88
$(H_2L^{2+} / H^+ + HL^+)$	10.2
$(H_3L^{3+} / H^+ + H_2L^{2+})$	9.04
$(H_4L^{4+} / H^+ + H_3L^{3+})$	8.49

Para las constantes obtenidas por espectroscopía UV-visible se informa el promedio de los valores calculados a 6 longitudes de onda en un intervalo de 365-402 nm (**Tabla 13**). Se muestran ejemplos de ajustes para los datos colectados por espectroscopía UV-visible. (**Figuras 30 y 31**).

Tabla 13. Valores de K para el sistema $\text{CP-I} + \text{SP} \rightleftharpoons \text{CP-I-SP}$ ($I = 0.1 \text{ M}$):

pH	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$
7.5	1860 ± 30
8	2360 ± 40
8.5	1090 ± 40
9	1210 ± 180
9.5	395 ± 15
10	175 ± 15
10.5	50 ± 7

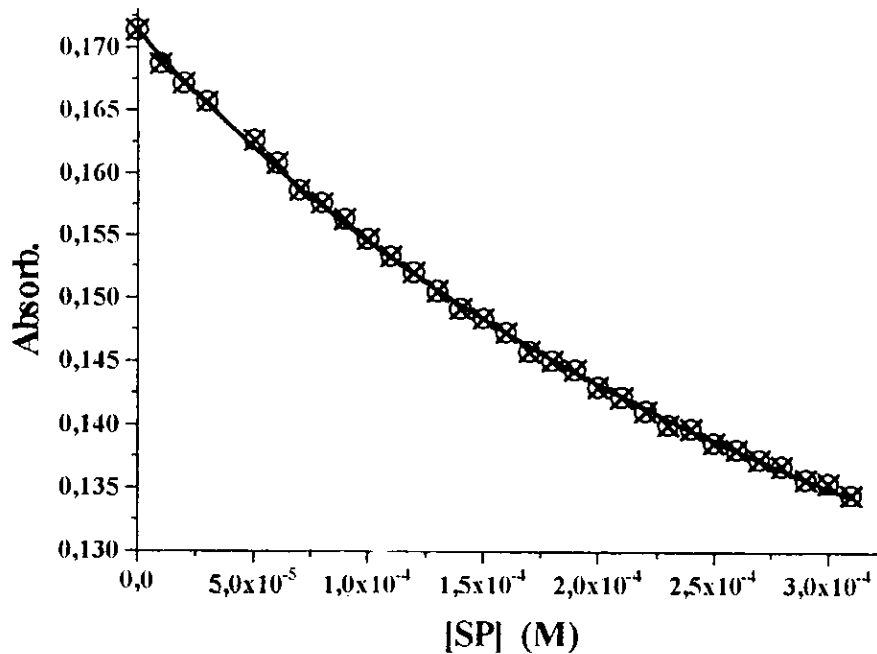


Figura 30. Ejemplo de ajuste para los datos experimentales de la valoración espectrofotométrica de CP-I con SP (pH 8, $I = 0.1$, $\lambda = 392 \text{ nm}$).

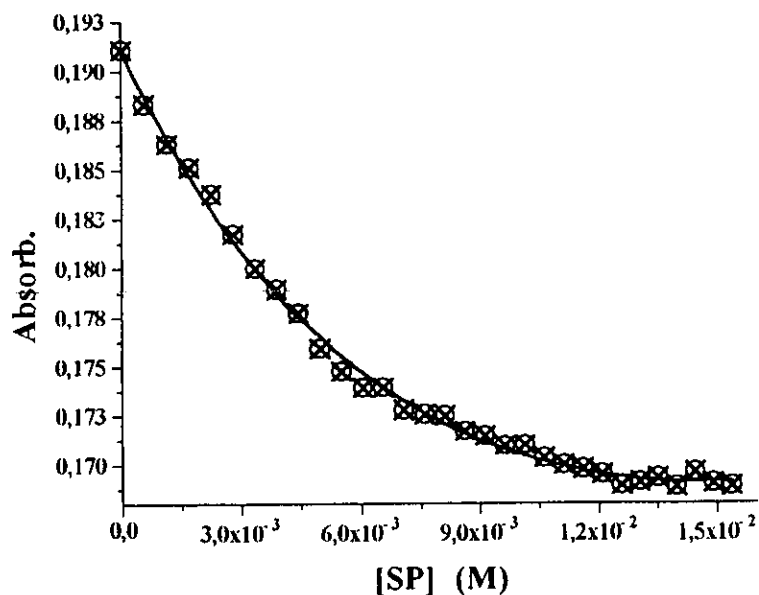


Figura 31. Ejemplo de ajuste para los datos experimentales de la valoración espectrofotométrica de CP-I con SP (pH 10, $I = 0.1$, $\lambda = 392$ nm).

Encontramos que para esta poliamina, la dependencia de la absorbancia como función de la concentración de espermina para el intervalo empleado, que es entre 100 y 10 veces menor que el utilizado para las diaminas, es posible ajustarla por medio de la **Ecuación 1**, pero el efecto del aumento en la absorbancia se presenta a concentraciones de titulante sumamente bajas (**Figura 32**).

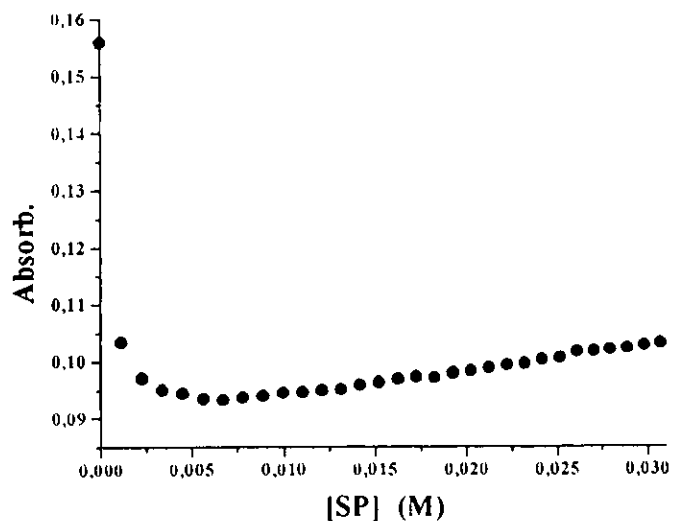


Figura 33. Datos experimentales de la valoración espectrofotométrica de CP-I con SP. (pH 7, $I = 0.1$, $\lambda = 392$ nm)

Los valores para la constante de asociación nos muestran una sorprendentemente elevada afinidad de la CP-I por esta poliamina. Es claro que los complejos formados por estas especies, a cualquier valor de pH son por mucho los más estables; luego, hemos encontrado que *la CP-I en efecto es capaz de discriminar entre la serie de aminas empleadas*. Esta aserción puede hacerse si comparamos los efectos de la absorbancia relativa entre las diferentes aminas empleadas para un valor de pH en cual todas las especies probadas se encuentren protonadas (**Figuras 33 - 35**).

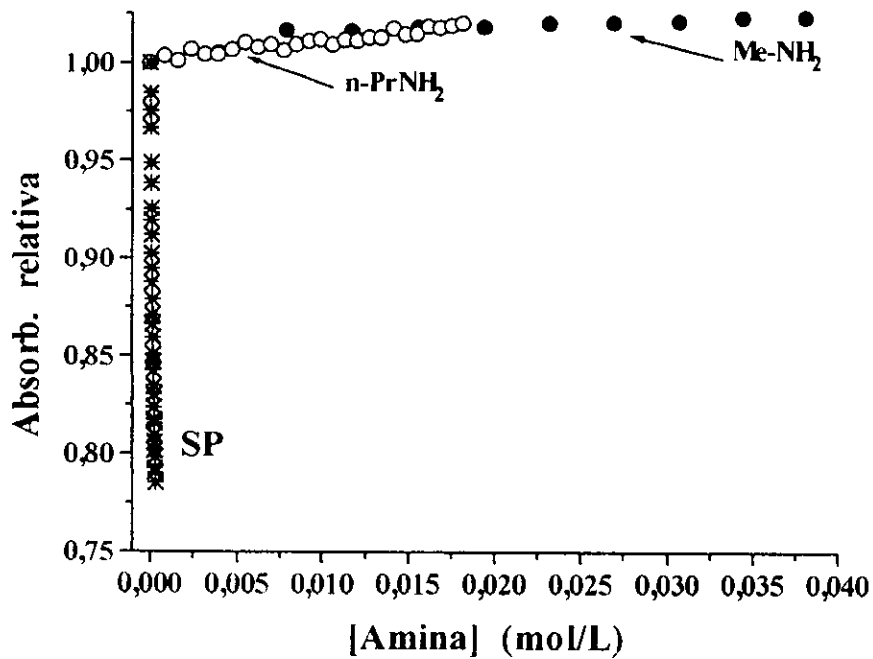


Figura 33. Comparación de los efectos de Me-NH₂, n-PrNH₂ y SP sobre la absorbancia de CP-I a 392 nm y pH 8

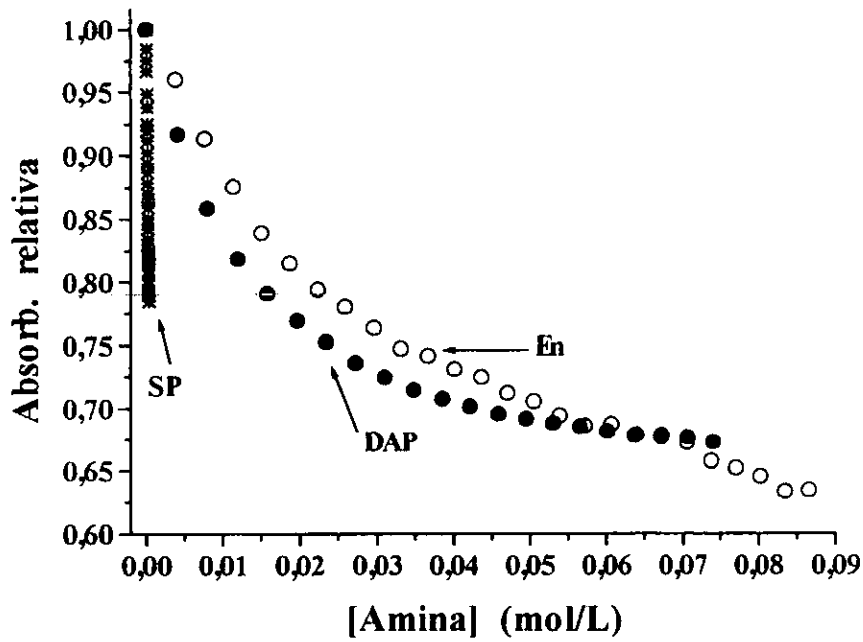


Figura 34. Comparación de los efectos de En, DAP y SP sobre la absorbancia de CP-I a 392 nm y pH

8

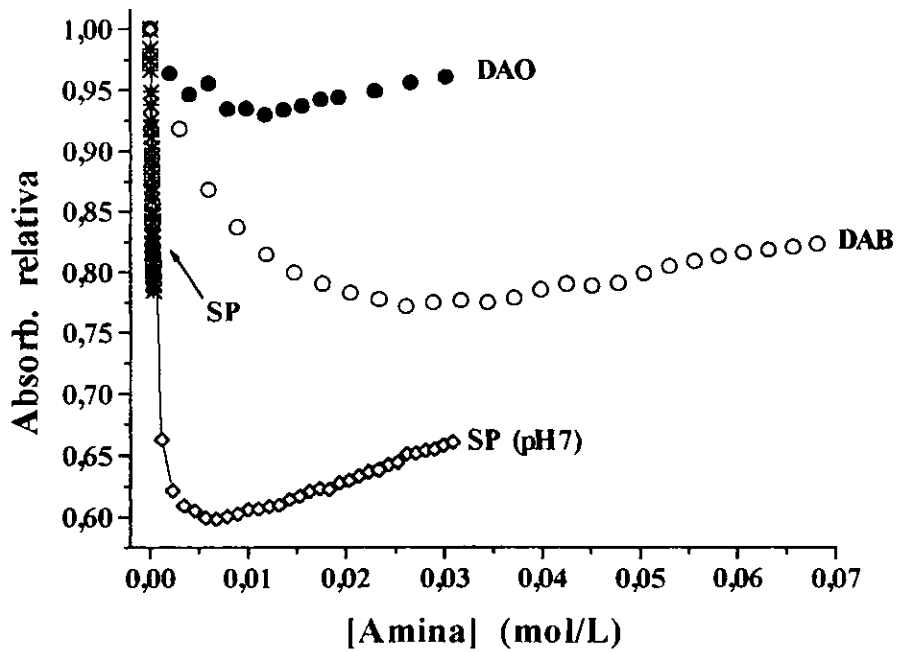


Figura 35. Comparación de los efectos de DAB, DAO y SP sobre la absorbancia de CP-I a 392 nm y pH 8

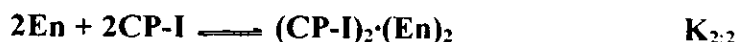
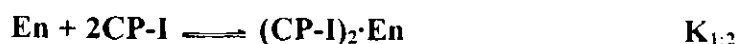
La gráficas anteriores son muy ilustrativas en cuanto a que nos proporciona evidencia sobre las condiciones de concentración de aminas en las cuales la absorbancia de la **CP-I**, evaluada en el máximo de absorción (392 nm), comienza a incrementarse. Es notorio que las monoaminas prácticamente no provocan cambios apreciables en la absorbancia (ver **Figura 33**), mientras que para **En** y **DAP**, en el intervalo de concentraciones empleadas el incremento en la absorbancia no se presenta, lo que no excluye la posibilidad de que este comportamiento pudiera ocurrir. A pesar de que la **CP-I** forma complejos estables con la **En** y **DAP**, no presenta reconocimiento selectivo entre ambas especies de diaminas (ver **Figura 34**).

Para el caso de **DAB** y **DAO** el efecto del aumento en la absorbancia es evidente, siendo mayor para **DAO**, mientras que para **SP**, éste comportamiento es por demás notorio. Podemos observar que el incremento en la absorbancia de **CP-I** ocurre a concentraciones de diaminooctano relativamente bajas (ver **Figura 35**)

En efecto, si nuestro interés es construir un sensor para aminas, y en este caso, aminas biogénicas (**DAB** y **SP**), hemos encontrado una manera sencilla de caracterizar la interacción **CP-I**-poliamina, ya que a concentraciones sumamente pequeñas de aminas, observamos que las diferencias en los cambios espectrales inducidos por la complejación son comparativamente gigantescos.

5.4 Efecto de la concentración de **CP-I** en la **K** del sistema **CP-I** + diaminas.

Es relevante la observación que los cambios espectrales pueden tener su origen no solo en la asociación de **CP-I** con poliaminas en una relación estequiométrica 1:1, sino que además existe la posibilidad de dimerización inducida por diaminas. Como alternativas, se proponen equilibrios complementarios:



Con objeto de discriminar cual de los equilibrios se ajusta mejor a nuestros datos experimentales, se determinaron las constantes de asociación entre **CP-I** y **En** con la siguiente lógica:

Si la dimerización de CP-I es importante para el proceso de asociación, la constante $K_{1:1}$ debe ser función de la concentración de CP-I; luego, la constante aparente debe incrementarse al aumentar la concentración de CP-I.

Se realizaron una serie de valoraciones de **CP-I** con **En**, manteniendo fijos el pH, la fuerza iónica y la temperatura (**Tabla 14**). Las condiciones de los experimentos son: [**CP-I**]: 0.2-4 μM ; *buffer*: fosfatos/boratos 5 mM ($I = 0.1$ M, EDTA 0.1 mM); pH 8, 25 °C.

Tabla 14. Valores de **K** observadas para el sistema **CP-I + En** \rightleftharpoons **CP-I·En**

[CP-I] (μM)	$K_{1:1}$ (M^{-1})	$K_{1:2} \times 10^{-7}$ (M^{-2})	$K_{2:2} \times 10^{-8}$ (M^{-3})
0.2	35	17	61
0.55	36	6.5	23
1.1	32	2.9	9.3
2	55	2.8	15
4	51	1.3	6.5

La tabla anterior muestra que aunque modesto, el cambio en los valores de las constantes de asociación para $K_{1:1}$ es el que presenta la tendencia que se amolda mejor a nuestros valores experimentales. De esta observación podemos por tanto considerar que el equilibrio para $K_{1:1}$ es el que siguen las poliaminas para su interacción con la **CP-I** en este estudio; es decir, *la estequiometría de los complejos formados entre la CP-I con los huéspedes tiene una relación 1:1.*

5.5 Dependencia de K con respecto al valor de pH.

Consideramos de importancia para este estudio la dependencia entre el pH y la constante de asociación experimental. Para evaluar este efecto se dedujo una ecuación para el ajuste los valores de las constantes experimentales (**Ecuación 3**).

Se muestra a continuación las gráficas de **K** vs. pH, y su respectivo ajuste para cada una de las poliaminas alifáticas empleadas (**Figuras 36 a 39**). La ecuación para el ajuste de los valores de la **K** es:

$$K_{\text{exp}} = \frac{K_0 + K_1 K_{H1} [H^+] + K_2 K_{H1} K_{H2} [H^+]^2}{1 + K_{H1} [H^+] + K_{H1} K_{H2} [H^+]^2} \quad (3)$$

Donde:

$K_{\text{exp}} = K$ (determinada experimentalmente)

$K_0 = [\text{CP-I} \cdot \text{A}^{4-}] / [\text{CP-I}^{4-}][\text{A}]$

$K_1 = [\text{CP-I} \cdot \text{AH}^{3+}] / [\text{CP-I}^{4-}][\text{AH}^+]$

$K_2 = [\text{CP-I} \cdot \text{AH}_2^{2+}] / [\text{CP-I}^{4-}][\text{AH}_2^{2+}]$

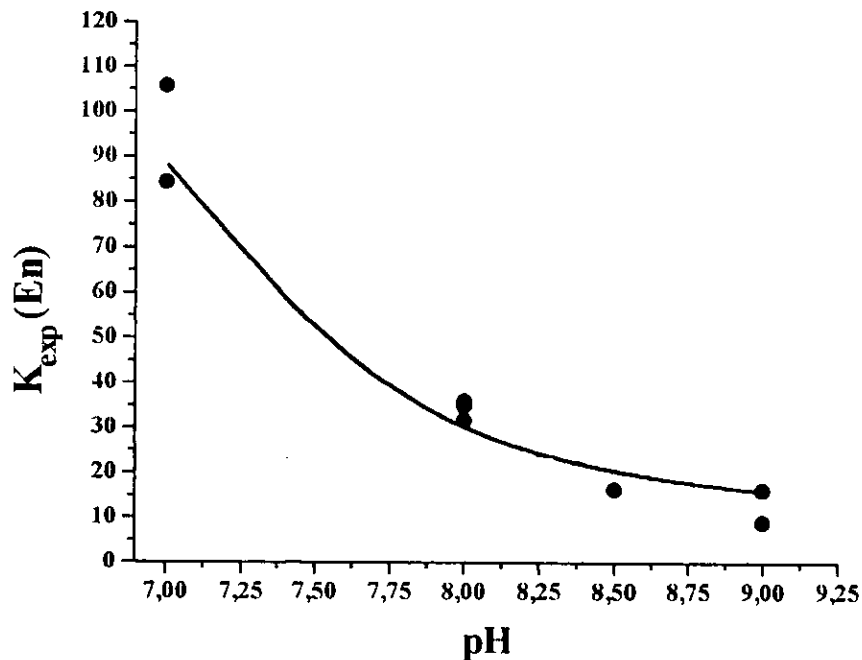


Figura 36. Dependencia de **K** con respecto a pH y ajuste a los datos experimentales por medio de la **Ecuación 3** para las valoraciones de **CP-I** con **En**

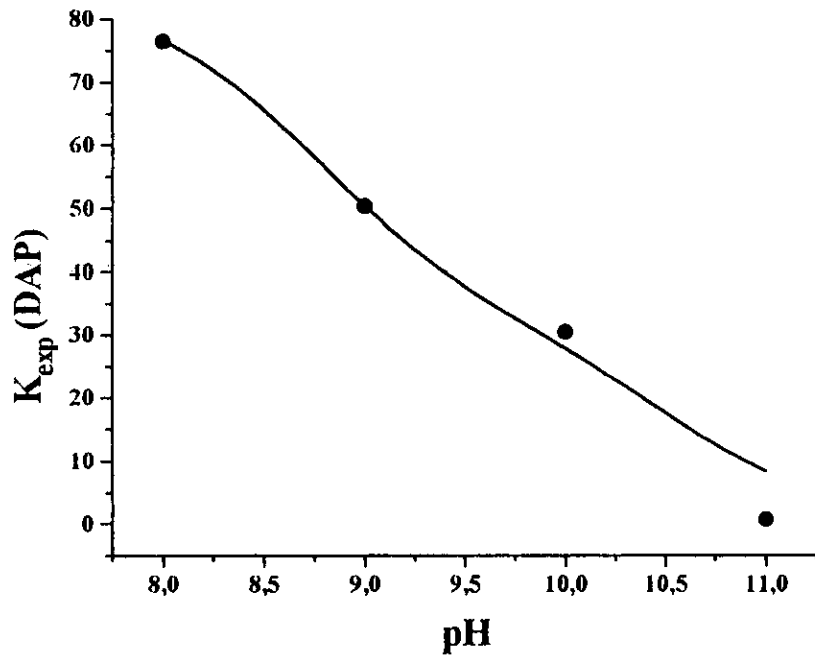


Figura 37. Dependencia de K con respecto a pH y ajuste a los datos experimentales por medio de la Ecuación 3 para las valoraciones de CP-I con DAP.

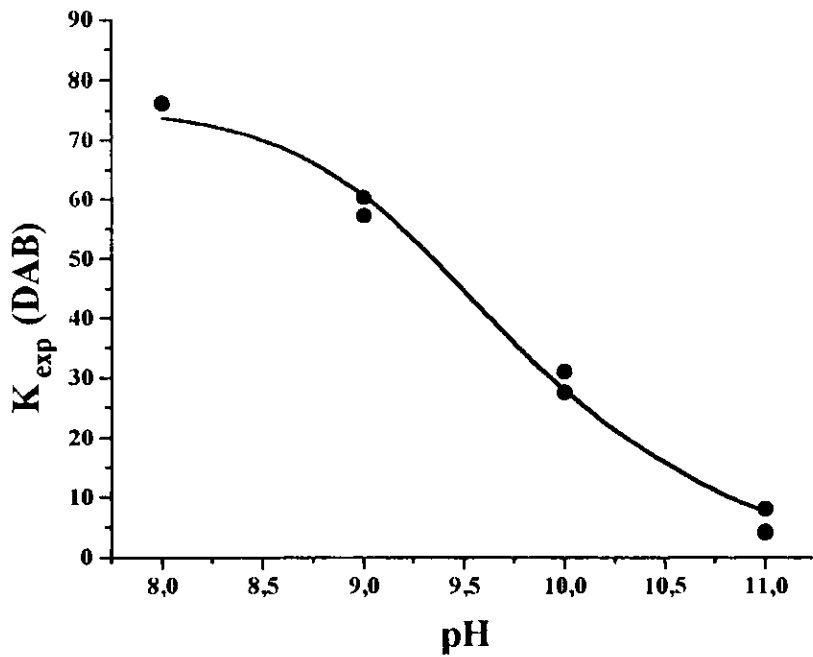


Figura 38. Dependencia de K con respecto a pH y ajuste a los datos experimentales por medio de la Ecuación 3 para las valoraciones de CP-I con DAB.

Los ajustes realizados a los datos generados de la dependencia de **K** con respecto al pH nos permiten conocer el valor de las constantes de asociación entre **CP-I** y las formas individuales protonadas de las aminas estudiadas (**Tabla 15**).

Tabla 15. Valores de las constantes de asociación de las formas individuales protonadas de poliaminas con el tetraanión de **CP-I**.

AMINA	K (M ⁻¹)	AMINA	K (M ⁻¹)
(En)H ⁺	16 ± 4	(SP)H ⁺	80 ± 50
(En)H ₂ ²⁺	150 ± 10	(SP)H ₂ ²⁺	450 ± 100
(DAP)H ⁺	33 ± 6	(SP)H ₃ ³⁺	1800 ± 700
(DAP)H ₂ ²⁺	85 ± 7	(SP)H ₄ ⁴⁺	2200 ± 700
(DAB)H ⁺	20 ± 3	(DAO)H ₂ ²⁺	350 ± 50
(DAB)H ₂ ²⁺	76 ± 2		

Para el tratamiento de los datos generados por el sistema **CP-I + SP**, se empleó una modificación de la **Ecuación 3**, en la cual se consideran las contribuciones de las formas tri- y tetraprotonadas, asumiendo que se comportan de manera análoga a la forma diprotonada de espermina. El procedimiento es el siguiente:

Dado que los valores de **pKa** son muy cercanos (ver sección 5.3.7), se considera que hasta pH 10, podemos considerar que existen en disolución únicamente las formas mono- y di-protonadas; los datos generados se ajustan como en el caso de diaminas. Posteriormente, en la misma ecuación se considera que ahora **K₀** tiene la magnitud de la constante de asociación de la forma monoprotonada de **SP** con **CP-I**, y los valores de **K₁** y **K₂** representan las constantes de asociación entre **CP-I** y las formas tri- y tetraprotonadas de **SP**. Las consideraciones anteriores nos permiten un buen ajuste de los datos experimentales, que se ilustra en la **Figura 39**.

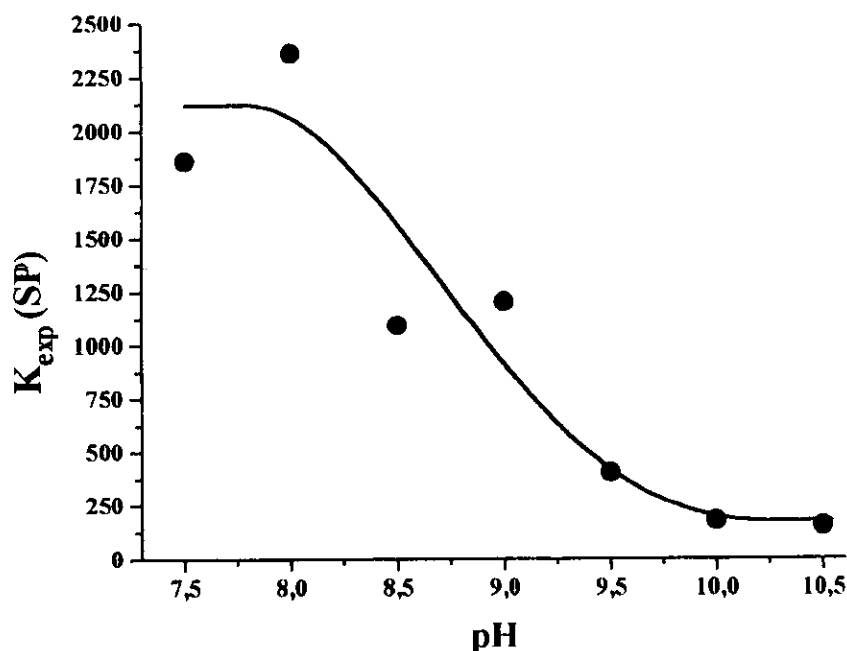


Figura 39 Dependencia de K con respecto a pH y ajuste a los datos experimentales para las valoraciones de **CP-I** con **SP**.

Con base en los ajustes realizados, se encuentra que K_0 tiene un valor de cero, es decir, no existe una interacción entre la diamina en su forma neutra con el tetraanión de **CP-I**.

Es claro que las formas monoprotonadas forman complejos débiles y además es interesante notar que para las diaminas no se presenta un cambio sistemático en la constante de asociación con **CP-I** que dependa de la distancia entre grupos catiónicos del huésped. Con la forma diprotonada de las diaminas, el orden de magnitud de K aumenta en uno para las constantes calculadas, y se observa que las diaminas con una cadena hidrocarbonada más corta forman complejos con mayor estabilidad.

Sin embargo, el comportamiento exhibido por **SP** y **DAO** es notoriamente distinto. Es probable que su elevada hidrofobicidad contribuya de manera determinante en sus propiedades de complejación con la **CP-I**. Para estos dos casos, tenemos la contribución hidrofóbica aportada por la presencia de 10, y 8 grupos metileno en **SP** y **DAO** respectivamente.

5.6 Dependencia de K con respecto a la carga del huésped.

Para el caso de la espermina en su forma monocatiónica, el orden de la constante de asociación calculada es similar al de las diaminas diprotonadas (ver **Tabla 15**). Las protonaciones subsecuentes aumentan como es de esperarse éste valor. La elevada afinidad mostrada puede ser consecuencia de la mayor hidrofobicidad de la cadena alifática de la espermina. Una manera simple de visualizar ésta tendencia es graficar el $\log K$ vs. carga del huésped (n^+) (**Figura 40**).

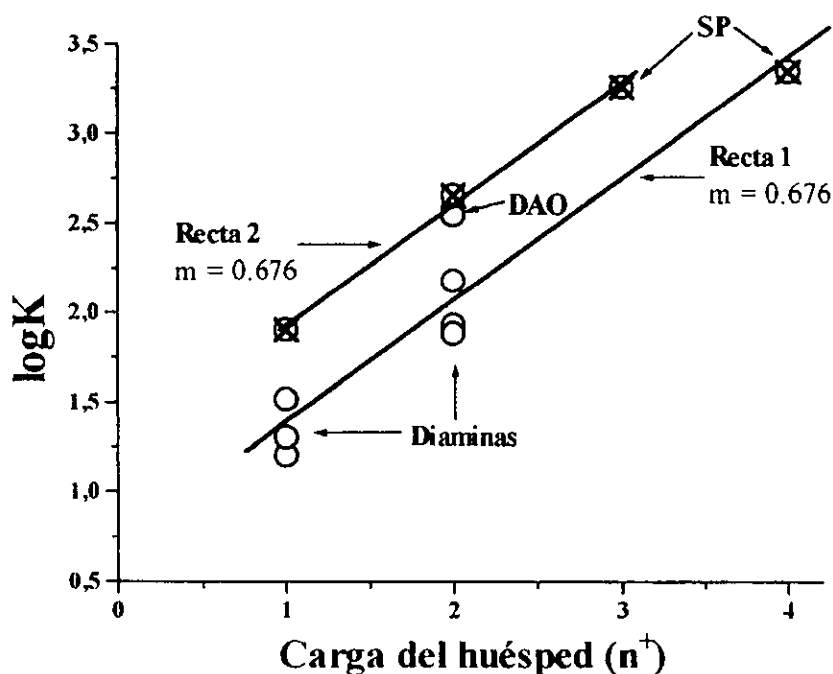


Figura 40. Dependencia de $\log K$ con respecto a la carga del huésped (n^+), a $I = 0.1$

Entre las posibles interpretaciones que podemos hacer de esta gráfica, podemos postular que el incremento en los valores iniciales de $\log K$ para SP y DAO tiene su origen en la mayor hidrofobicidad de estas especies, que es consecuencia de la presencia de un elevado número de unidades hidrocarbonadas en su estructura.

Para el caso de la forma tetracatiónica de **SP**, las coordenadas ($\log K$ vs. n^+) correspondientes a la forma tetracatiónica caen dentro de la tendencia típica para diaminas (**Recta 1**), lo que refleja la pérdida del carácter hidrofóbico, es decir, la molécula de espermina adquiere propiedades electrostáticas tales que la contribución hidrofóbica es menos significativa que cuando la **SP** presenta mayores grados de protonación.

Observemos el caso de **DAO**: las coordenadas para la forma dicatiónica de ésta especie son tales que se asemejan a la propias de **SP** con el mismo grado de protonación.

Ahora bien, *¿de qué manera podemos relacionar los valores de la dependencia de la carga del huésped con respecto a la constante de asociación?*, o dicho de otra forma, *¿cual es la contribución de los pares iónicos formados entre CP-I y los huéspedes en la constante de asociación?*.

Como mencionamos previamente, Schneider y colaboradores^{4,13} han abordado esta cuestión, y de sus estudios encontramos que el valor de la pendiente en las gráficas de la dependencia de $\log K$ con respecto a la carga del huésped, a $I = 0.1$ (que para el presente caso tienen un valor de **0.676** para la **Recta 1** y **2** ilustradas en la **Figura 40**) nos proporciona la contribución por par iónico formado ($\Delta\Delta G_{\text{asoc}}$), por medio de la siguiente expresión:

$$\Delta\Delta G_{\text{asoc}} = \frac{\Delta \log K}{\Delta n} = \frac{\Delta}{\Delta n} \times \frac{\Delta G}{RT} \times \log e$$

Donde

$$\frac{\Delta \log K}{\Delta n} = m = 0.676$$

$$R = 0.0831 \text{ kJ/molK}$$

$$T = 298.15 \text{ K}$$

$$e = 2.7183$$

Con base en los cálculos pertinentes, encontramos que para nuestros sistemas estudiados, la magnitud para $\Delta\Delta G_{\text{asoc}}$, es de **3.9 kJ/mol**, el cual está de acuerdo con el valor informado por Schneider y colaboradores^{4,13}, y que es igual a $5 \pm 1 \text{ kJ/mol}$ (ver sección 2.3). Cabe destacar que dicho parámetro informado fue calculado como el promedio de una serie de datos calculados a diferentes fuerzas iónicas, y con sistemas que mantenían estáticas las posiciones de las cargas en el receptor.

La diferencia en el valor de $\Delta\Delta G_{\text{asoc}}$ para nuestro sistema de estudio, en comparación con el informado^{4,13} parte de las siguientes consideraciones:

- La fuerza iónica se mantuvo siempre constante en un valor de 0.1 M.
- La CP-I es un receptor que presenta un arreglo de cargas simétrico, pero no estático, ya que los carboxilatos se encuentran al final de un cadena compuesta por dos grupos metileno; es claro por tanto que debe existir un arreglo en los sustituyentes que compense la repulsión entre las cuatro cargas negativas de la molécula (**Figuras 41 y 42****).

Los sustituyentes en la CP-I deben sufrir necesariamente un cambio energético al modificar las posiciones en el espacio, ya que al adquirir una conformación donde interactuen las cargas del huésped y receptor (**Figura 43****) se produce un gasto energético al reorganizarse los propionatos de la CP-I, de manera que se “levanten” sobre el plano de la porfirina. Dicho gasto se ve reflejado en un valor de $\Delta\Delta G_{\text{asoc}}$ menor al informado.

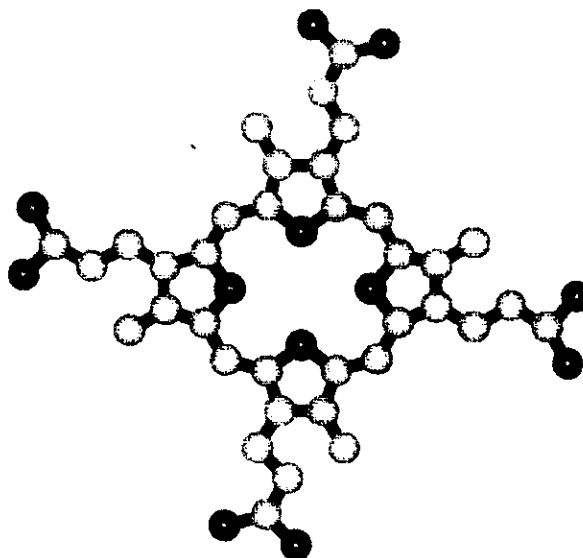


Figura 41. Arreglo espacial propuesto del tetraanión de CP-I.
(C en gris, N en azul y O en rojo)

**** Las figuras 40-42 se dibujaron con el programa Hyperchem. No son optimizaciones.**

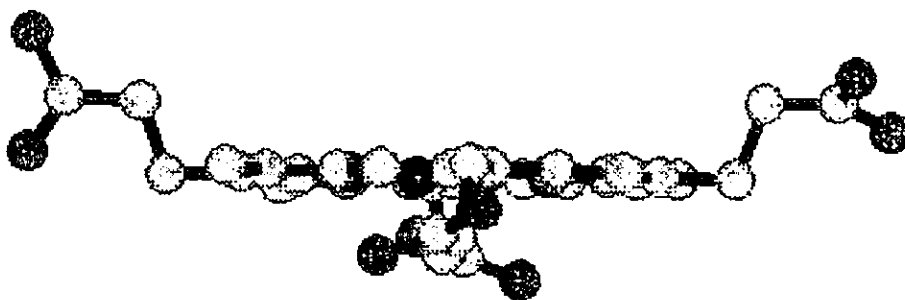


Figura 42. Arreglo espacial propuesto del tetraanión de CP-I. Obsérvese que los propionatos se acomodan en dos planos distintos. (C en gris, N en azul y O en rojo)

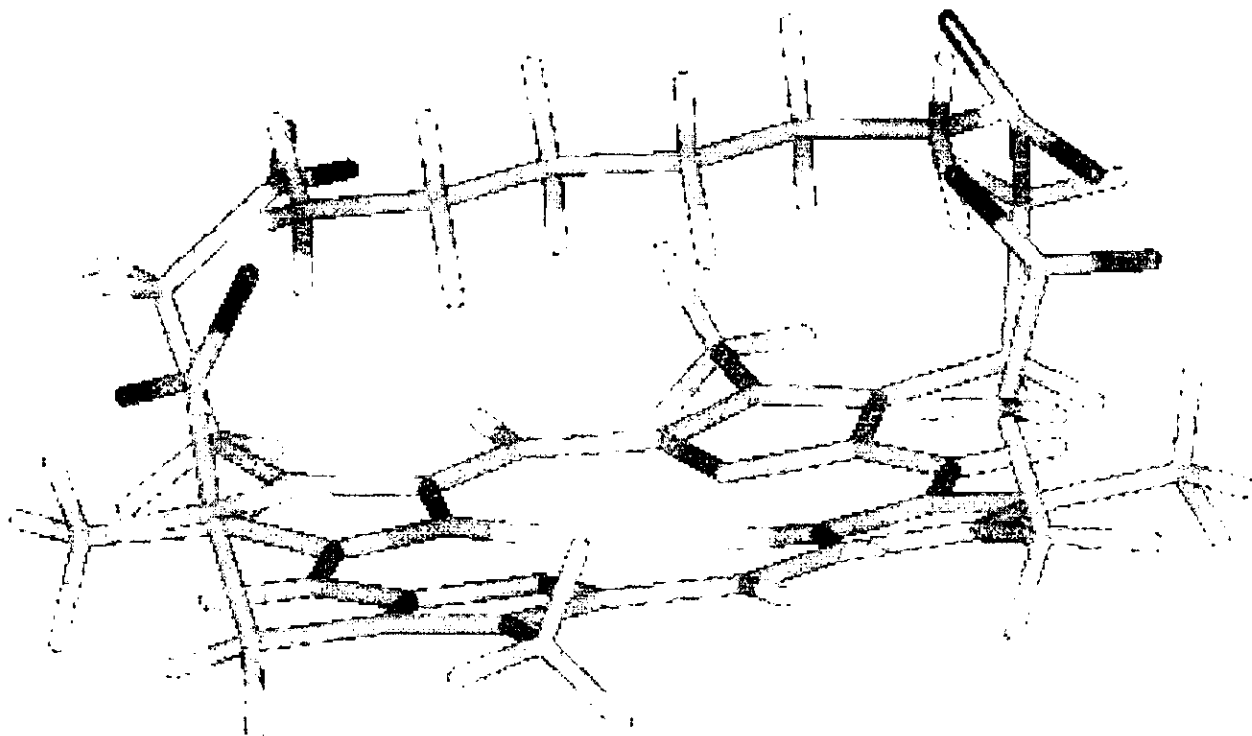


Figura 43. Arreglo espacial propuesto para el acomodo de los propionatos de CP-I y la molécula de DAB diprotonada. Obsérvese que los propionatos se acomodan en un plano.
(C en gris oscuro, N en azul y O en rojo, H en gris claro)

5.7 Efecto de fuerza iónica sobre la constante de asociación.

Dentro de las expectativas de este trabajo pretendemos evaluar la influencia de la fuerza iónica sobre el proceso de asociación. Para ello, se repitieron las valoraciones de las aminas estudiadas, pero esta vez, variando la fuerza iónica del medio.

La razón de este cambio radica en que al determinar la constante de asociación a diferentes condiciones de pH e I , es posible encontrar el valor de K a fuerza iónica cero por medio de la ecuación de *Debye - Hückel* en su forma semiempírica³⁴ (Ecuación 4).

$$\log K = \log K^0 + \frac{1.02 \times z_p \times z_H \times \sqrt{I}}{1 + 1.5 \times \sqrt{I}} \quad (4)$$

Donde:

- K = Constante de asociación experimental
- K^0 = Constante de asociación a fuerza iónica cero.
- z_p = carga de la porfirina.
- z_H = carga del huésped.
- I = fuerza iónica.

Se informan los valores de K para cada amina a diferentes condiciones de fuerza iónica (Tablas 16-20), las gráficas de $\log K$ como función de I (Figuras 44-46), y los parámetros para cada ajuste (Tabla 21).

Tabla 16. Valores de K para el sistema CP-I + En - > CP-I•En

pH	K (M ⁻¹)	I	pH	K (M ⁻¹)	I
7	105 ± 15	0.1	8	33 ± 3	0.1
7	123 ± 2	0.055	8	20 ± 1	0.055
7	178 ± 2	0.03	8	20 ± 1	0.03
7	163 ± 1	0.025	8	25 ± 2	0.025
7	185 ± 1	0.015	8	25 ± 2	0.015

Tabla 17. Valores de K para el sistema $CP-I + DAP \rightleftharpoons CP-I \cdot DAP$

pH	$K (M^{-1})$	I
7.5	240 ± 5	0.03
7.5	320 ± 5	0.025
7.5	395 ± 5	0.015

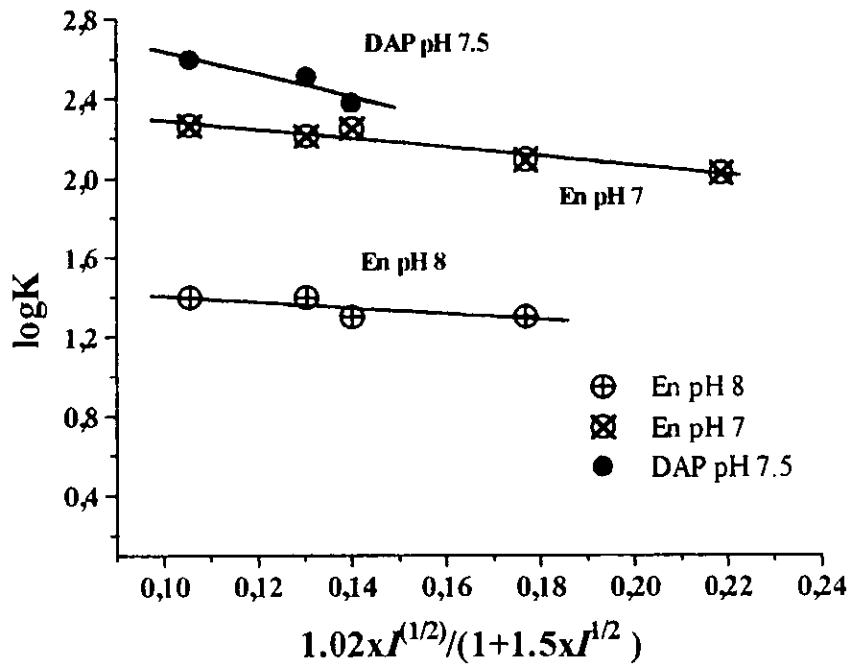


Figura 44. Dependencia de $\log K$ con respecto a I para En y DAP.

1,4-diaminobutano.

Tabla 18. Valores de K para el sistema $CP-I + DAB \rightleftharpoons CP-I \cdot DAB$

pH	$K (M^{-1})$	I	pH	$K (M^{-1})$	I
7	93 ± 1	0.1	9	60 ± 2	0.1
7	239 ± 2	0.055	9	152 ± 1	0.055
7	524 ± 2	0.03	9	180 ± 1	0.3
7	487 ± 6	0.025			
7	720 ± 10	0.015			
8	76 ± 1	0.1	10	30 ± 1	0.1
8	230 ± 2	0.055	10	77 ± 1	0.055
8	460 ± 10	0.03	10	67 ± 1	0.3
8	380 ± 5	0.025			
8	425 ± 3	0.015			

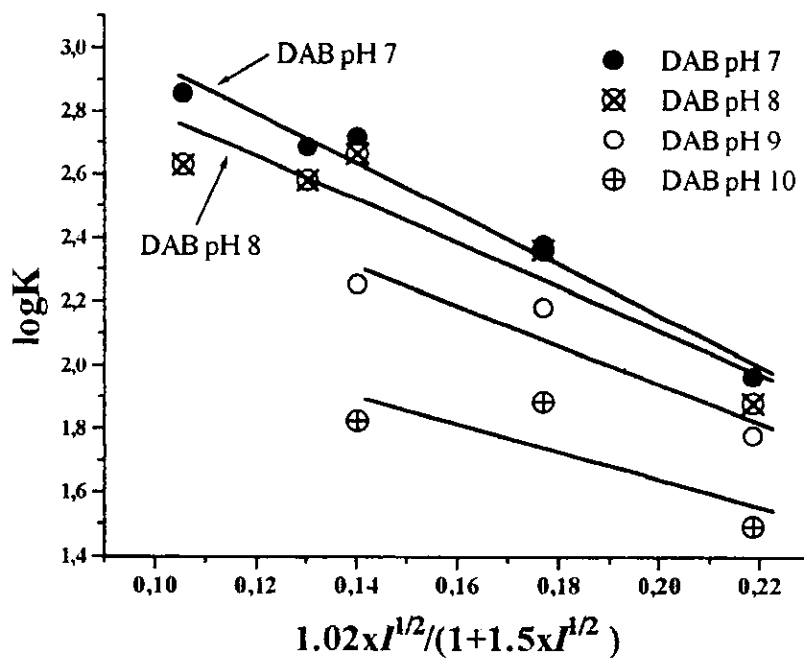
Figura 45. Dependencia de $\log K$ con respecto a I para DAB.

Tabla 19. Constantes de asociación para el sistema **CP-I + SP** \rightleftharpoons **CP-I·SP**

pH	K (M⁻¹)	I	pH	K (M⁻¹)	I
7	10300 ± 1950	0.055	9	1200 ± 180	0.1
7	14160 ± 180	0.03	9	1670 ± 30	0.055
7	17000 ± 200	0.025	9	2870 ± 140	0.3
7	22620 ± 510	0.015			
		•			
8	2360 ± 40	0.1	10	175 ± 15	0.1
8	7160 ± 90	0.055	10	490 ± 7	0.055
8	9000 ± 100	0.03	10	1660 ± 20	0.3
8	12240 ± 160	0.025			
8	16220 ± 250	0.015			

Tabla 20. Valores de K para el sistema **CP-I + DAO** \rightleftharpoons **CP-I·DAO**

pH	K (M⁻¹)	I
8	350 ± 50	0.1
8	810 ± 60	0.055
8	900 ± 15	0.03

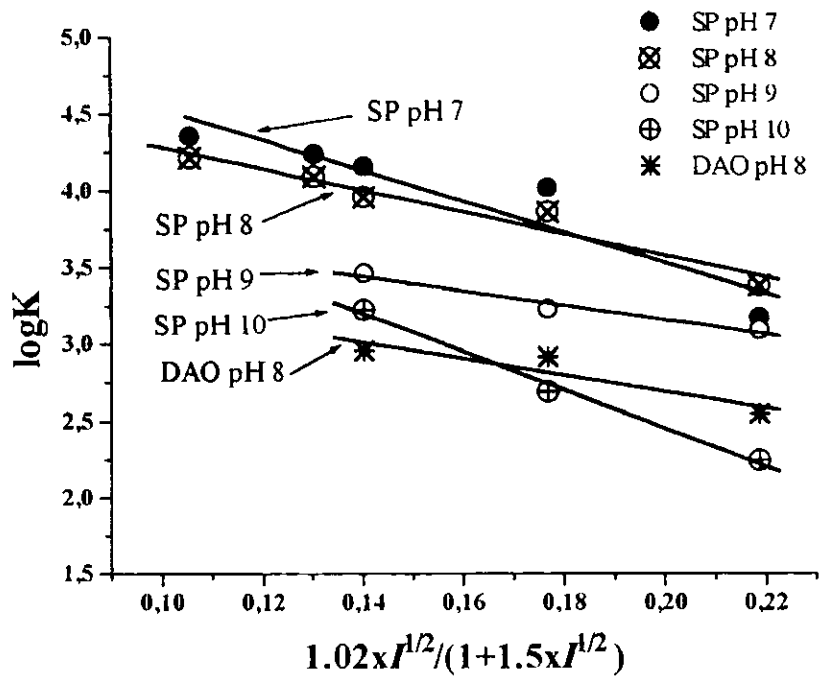


Figura 46. Dependencia de $\log K$ con respecto a I para SP y DAO.

Tabla 21. Parámetros para el ajuste por regresión lineal de la dependencia de **K** con respecto a **I**, y valores calculados de K^0 para el sistema **CP-I + Huésped** \rightleftharpoons **CP-I**·huésped:

Huésped	pH	-m	b	K^0 (M^{-1})
En	7	2.526	2.31	335
En	8	0.210	0.53	35
DAP	7.5	3.211	5.71	1625
DAB	7	3.747	7.94	5590
DAB	8	3.783	8.466	6070
DAB	9	3.166	6.12	1465
DAB	10	2.510	4.33	320
DAO	8	3.755	5.33	5690
SP	7	5.530	10.0	338840
SP	8	4.990	7.08	97720
SP	9	4.105	4.76	12735
SP	10	4.930	12.42	85110

De la información adquirida, y recabada en la **Tabla 21**, podemos observar que las constantes de asociación a $I = 0$ presentan siempre la magnitud más grande para aquellos valores de pH en los cuales las poliaminas se encuentran en su forma diprotonada, lo que concuerda con las observaciones generadas del ajuste de **K** en función del pH (**Tabla 15**).

Encontramos que esta vez, **K** se incrementa conforme la cadena de hidrocarbonada de la diamina es mayor, lo cual es la tendencia que esperaríamos si la interacción **CP-I + Huésped** presenta una importante contribución hidrofóbica en la energía de asociación, en especies como **DAB**, **DAO** y **SP** que son más hidrofóbicas que el resto de las aminas empleadas, la constante de asociación debe sufrir un incremento importante, lo cual, en efecto se observa.

Baste observar que para el mismo pH, la constante K^0 calculada para el agregado CP-I-SP es 60 veces más grande que la correspondiente a los agregados CP-I-DAB o CP-I-DAO. La evidencia nos demuestra que la Coproporfirina I presenta reconocimiento por SP.

Podemos calcular ahora el valor de $\Delta\Delta G_{\text{asoc.}}$ (ver sección 5.6, Figura 40), a fuerza iónica cero, el cual se calcula a partir de la pendiente generada del ajuste lineal de los datos recabados en la Tabla 21 para $\log K^0$ vs. carga del huésped (Figura 47):

Observemos que el valor de la pendiente para este caso es aproximadamente dos veces más grande que la calculada cuando el valor de I era de 0.1; luego, dado que la hidrofobicidad no depende de la fuerza iónica del medio, encontramos que en efecto la contribución electrostática predomina en la interacción CP-I-huésped. El valor calculado de $\Delta\Delta G_{\text{asoc.}}$ es de **7 kJ/mol**. Cabe destacar que *dentro del error experimental*, los valores de K^0 son confiables; la dispersión de los datos, que se observa en los valores de $\log K^0$ para $n^+=1$, no es tan grande que impida que puedan ser empleados para el cálculo de $\Delta\Delta G_{\text{asoc.}}$ de los diversos sistemas estudiados.

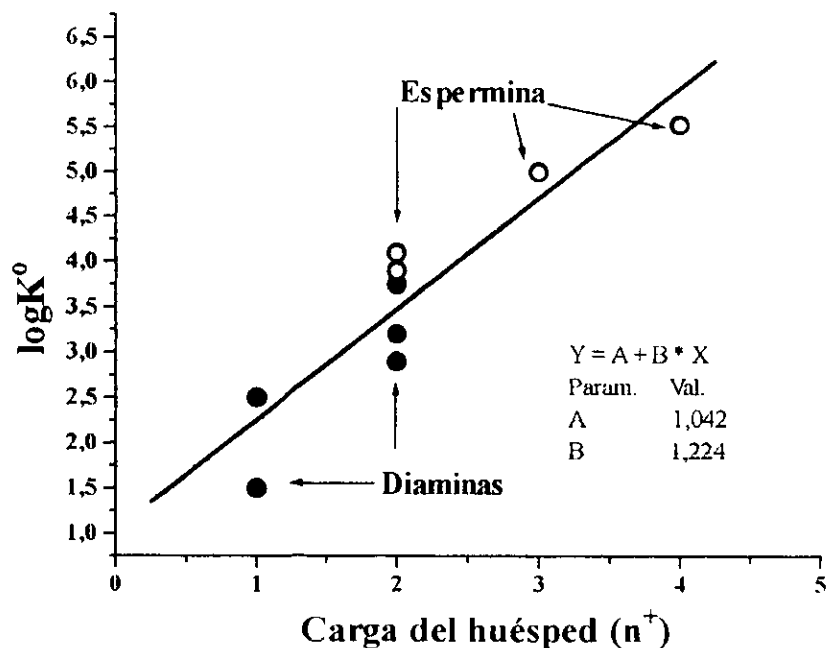


Figura 47. Dependencia de $\log K^0$ con respecto a la carga del huésped (n^+).

5.8 Efecto de disolvente.

Complementario a lo anterior, queremos saber cual es el papel que desempeña el disolvente para el sistema CP-I + Huésped. Para este fin, se elige el DAP para estudiar la influencia del disolvente en el proceso de asociación de CP-I.

Se determinaron las constantes de asociación entre CP-I y DAP, pero con la variante de que se adicionó etanol tridestilado al *buffer*, de manera que contuviera 5 y 10 % de etanol. Se informan los valores de **K** para este sistema (Tabla 22). En la Figura 48 se ilustra un ejemplo de los ajustes para los datos obtenidos de estos experimentos.

Tabla 22. Valores de **K** para el sistema CP-I + DAP \rightleftharpoons CP-I·DAP ($I = 0.1$ M):

pH	K(M ⁻¹)	% EtOH (v/v)
8	165 ± 10	5
9	52 ± 1	5
10	20 ± 1	5
8	200 ± 20	10
9	65 ± 5	10
10	15 ± 1	10

Observamos que el aumento en la concentración de EtOH en el medio incrementa el valor de la **K** de manera significativa solo para el caso en el que el valor de pH es 8 (ver **Tabla 10**); es decir, cuando la diamina se encuentra completamente protonada. Si asumimos que la contribución dominante en la energía de asociación es la interacción electrostática, al disminuir la constante dieléctrica del medio con la adición de etanol, el valor de **K** debe incrementarse. Es éste el comportamiento observado. Encontramos de nueva cuenta que los datos experimentales se ajustan bastante bien a las **Ecuaciones 1** y **2**, generando complejos moleculares con estequiometría 1:1.

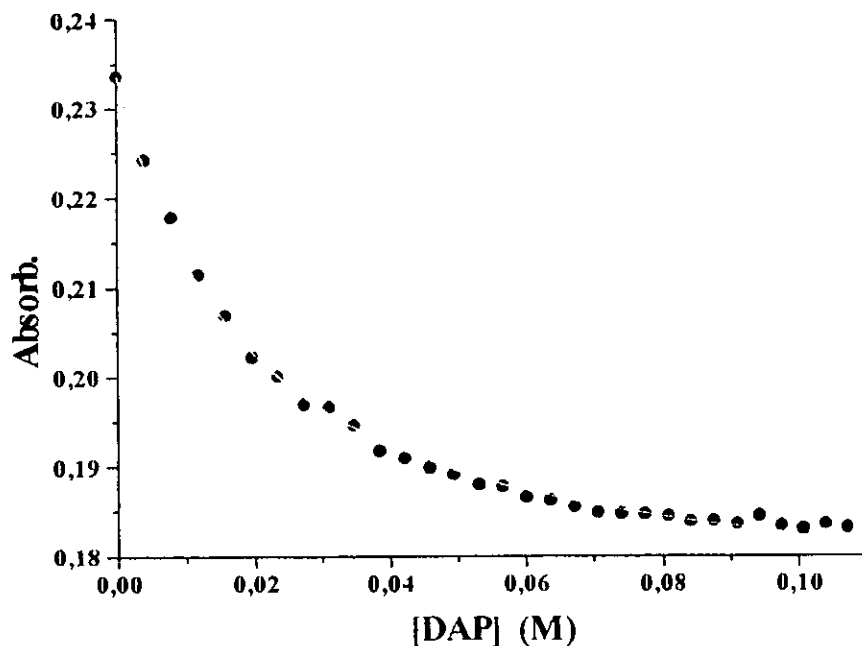


Figura 48. Ejemplo de ajuste de los datos experimentales para la valoración espectrofotométrica de **CP-I** con **DAP** (pH 9, $I = 0.1$, $\lambda = 392$ nm, *buffer* con 5% de EtOH).

5.9 Reversibilidad del sistema CP-I + huésped.

Finalmente, se pretende demostrar que la asociación de **CP-I** con las poliaminas es un fenómeno reversible. Para ello partimos de la suposición de que al introducir una molécula también tetraaniónica, pero capaz de enlazarse más fuertemente a las poliaminas que la misma **CP-I**, entonces los espectros para las valoraciones de **CP-I** con poliaminas mostrarán el siguiente comportamiento: al agregar una cantidad dada de poliaminas (en este caso **SP**) a una disolución de **CP-I**, la absorción presentará un decremento, como hemos venido observando. Ahora bien, la adición de una especie tetraaniónica que se enlace más fuertemente con las poliaminas en comparación de la **CP-I**, tendrá el efecto de alterar los espectros de absorción de forma tal que cada vez se asemejen más al espectro de la **CP-I** libre.

Para probar nuestra suposición diseñamos un experimento en el cual a una disolución de **CP-I** se le adiciona espermina, y posteriormente se agrega al sistema cantidades crecientes de una disolución acuosa de $K_4[Fe(CN)_6]$ (**FC**), adquiriendo en seguida el espectro correspondiente a cada una de las adiciones (**Figura 49**). El experimento fue monitoreado por medio de espectroscopia UV - visible.

Condiciones experimentales:

[**CP-I**]: 1 μ M; *buffer*: fosfatos/boratos 5 mM (NaCl 0.1 M), pH 10, 25 °C.

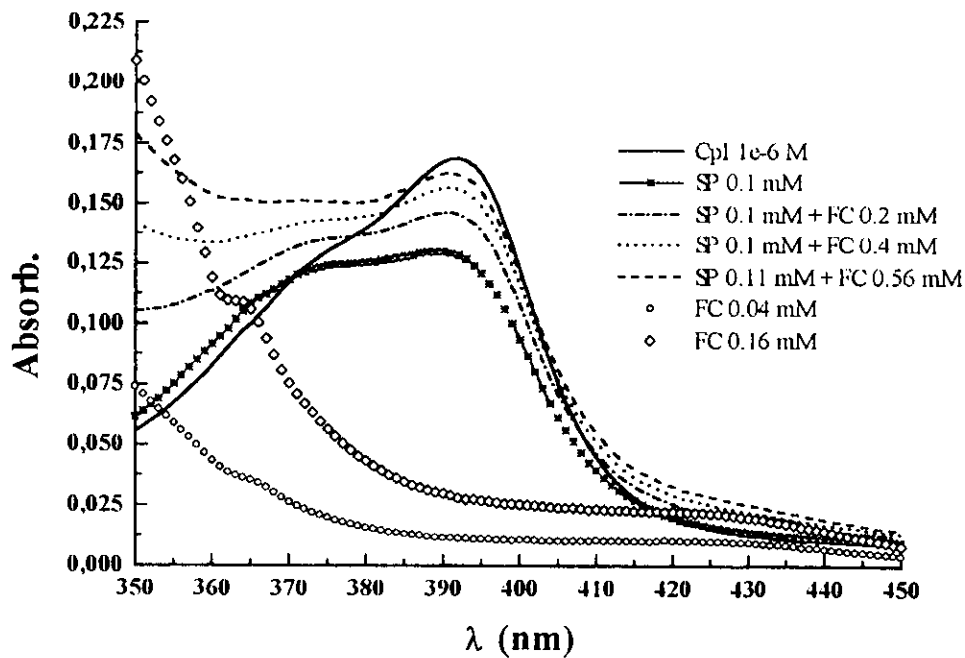


Figura 49. Espectros de absorción para la titulación con **FC** de agregados tipo **CP-I·SP**.

(pH 10, $I = 0.1$)

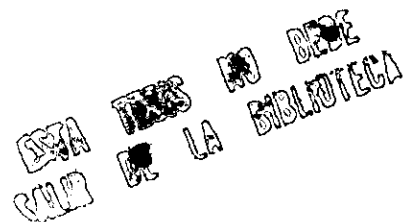
Podemos obtener una serie de observaciones de los espectros ilustrados en la **Figura 49**. Para ello, se evalúa la absorbancia a 392 nm, y se compara el espectro de **CP-I** libre con los correspondientes a la **CP-I** en su interacción con **SP** y con **FC** (**Tabla 23**):

Observamos que la adición de espermina disminuye la absorbancia, y al agregar **FC**, su magnitud comienza a incrementarse. Los espectros de absorción muestran una tendencia a adquirir la forma original, es decir, la de **CP-I** libre. Vale la pena destacar que los cambios del espectro en la región de 350-370 nm son resultado de la absorbancia propia del **FC**. Con el fin de probar la veracidad de esta afirmación se ilustraron los espectros de disoluciones de **FC** a dos diferentes concentraciones. Es claro que los espectros se solapan en esa región, dando como resultado las deformaciones al espectro original de la Coproporfirina.

Tabla 23. Valores de la absorbancia evaluada a 392 nm para la valoración con **FC** de agregados moleculares tipo **CP-I·SP**

Agregado:	Absorb.
CP-I 1 μM	0.17
CP-I 1 μM + SP 0.1 mM	0.13
CP-I 1 μM + SP 0.1 mM + FC 0.2 mM	0.14
CP-I 1 μM + SP 0.1 mM + FC 0.4 mM	0.15
CP-I 1 μM + SP 0.1 mM + FC 0.56 mM	0.16
FC 0.04 mM	0.01
FC 0.16 mM	0.03

La evidencia recabada nos indica de manera contundente que el proceso de asociación entre CP-I y las diversas poliaminas estudiadas es reversible.



6.- CONCLUSIONES:

Con base en la información recabada en la sección previa podemos elaborar una serie de conclusiones respecto al proceso de la asociación entre **CP-I** y poliaminas en medio acuoso:

- La variación en la fuerza iónica del medio reaccional, bajo las condiciones empleadas, no afecta significativamente el grado de agregación de la **CP-I**. Dentro del intervalo de concentración de **CP-I** empleado a lo largo de nuestros experimentos, tenemos que alrededor del 90% de la **CP-I** total permanece en forma monomérica, y por tanto, los cambios espectrales en las valoraciones de **CP-I** son resultado únicamente de la interacción PORFIRINA - HUESPED.
- No se detectó la formación de complejos entre la Coproporfirina I con las formas protonadas de la Me-NH₂ y *n*-PrNH₂ en las condiciones probadas.
- La molécula de **CP-I** forma agregados con todas las diaminas estudiadas, y el valor de **K** depende del pH del medio. Con base en los ajustes realizados, se encuentra que no presenta interacción con las diaminas en su forma neutra. Las formas monoprotonadas forman complejos débiles, mientras que los agregados con mayor estabilidad se presentan cuando las diaminas se encuentra en su forma diprotonada.
- Las constantes de asociación a $I = 0$ presentan siempre la magnitud más grande para aquellos valores de pH en los cuales las poliaminas se encuentran en su forma diprotonada. La **K** calculada de la dependencia de la constante experimental con respecto a I demuestra que la estabilidad de los complejos es mayor conforme crece la cadena alifática del huésped.
- Con base en los experimentos sobre la dependencia de **K** con respecto a la concentración de **CP-I**, podemos afirmar que los agregados entre **CP-I** y diaminas presentan en general una estequiometría 1:1. Existe evidencia sobre la formación de agregados moleculares con estequiometrías diferentes.

- Hemos encontrado que la **CP-I** presenta selectividad para su interacción con **SP** con respecto a todas las diaminas evaluadas. En efecto, si nuestro interés es construir un sensor para aminas, y en este caso las aminas biogénicas, hemos encontrado una manera sencilla de monitorear dichas especies. En las valoraciones espectrofotométricas, al adicionar concentraciones sumamente pequeñas de **SP** (del orden de 10^{-5} M), los cambios en el espectro de absorción de **CP-I** son enormes. Dado que las concentraciones de poliaminas biológicas en medio intracelulares son muy pequeñas, podemos esperar que la **CP-I** funcione como un eficiente sensor para estas especies.

7.- BIBLIOGRAFIA:

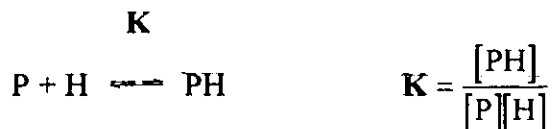
1. White, W. I. *"The Porphyrins"*. Dolphin, D. Ed., Academic, N. Y., 1978.
2. Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engaser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Cerio Venturo, G.; Hinds, L. deC. *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 4511.
3. Pasternack, R. F.; Francesconi, L.; Spiro E. *Inorganic Chemistry*, 1973, 12, 11, 2606.
4. Schneider, H-J.; Wang, M. *J. Org. Chem.*, 1994 59, 24, 7464.
5. Kano, K.; Hayakama, T.; Hashimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, 64, 768.
6. Kano, K.; Sato, T.; Yamada, S.; Ogawa, T. *J. Phys. Chem.*, 1983, 87, 566.
7. Kano, K.; Hashimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, 63, 633.
8. Kano, K.; Takei, M.; Hashimoto, S. *J. Phys. Chem.*, 1990, 94, 2181.
9. Morales, R. H. *Tesis de Maestria*, 1996, U. N. A. M.
10. Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. *Biochemistry*, 1983, 22, 2406.
11. Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. *Biochemistry*, 1983, 22, 5409.
12. Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Gaudemer, A.; Antebi, A.; Bassner, S.; De Poy, L.; Turner, D. H.; Williams, A.; Laplace, F.; Lansard, M. H.; Merienne, C.; Perrée-Fauvet, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 8179.
13. Schneider, H-J.; Schiestel, T.; Zimmermann, P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 7698.
14. Voyer, N.; Deschênes, D.; Bernier, J.; Roby, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 134.
15. Pascard, C.; Riche, C.; Cesario, M.; Kotzyba-Hibert, F.; Lehn, J. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 557.
16. Boudon, C.; Gross, M.; Kotzyba-Hibert, F.; Lehn, J. M.; Saigo, K. *J. Electroanal. Chem.*, 1985, 191, 201.
17. Hamilton, A.; Lehn, J. M.; Sessler, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 5158.
18. Behr, J. P.; Lehn, J. M.; Vierling, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1976, 621.
19. Behr, J. P.; Lehn, J. M.; Vierling, P. *Helvetica Chimica Acta*, 1982, 65, 6, 182.
20. Rebeck, J. Jr.; Askew, B.; Killoran, M.; Nemeth D.; Lin F.-T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 2426.

21. Zimmerman, S. C.; Wu, W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8054.
22. Adrian, J. C.; Wilcox, C. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8055.
23. Ventakesh, B.; Jayakumar, R.; Pnadian, R. P.; Manoharan, P. T. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1996**, *223*, 390.
24. Voyer, N.; Maltais, F. *Adv. Mat.* **1993**, *5*, 569.
25. Voyer, N.; Lamothe, J. *Tetrahedron*, **1994**, *51*, 34, 9241.
26. Morozova, L.; Desmet, J.; Joniau, M. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *218*, 303
27. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3rd Ed., Pergamon Press, **1989**.
28. Dean, J. A. Ed. "Lange's Handbook of Chemistry", 12th Ed., 5-69 a 5-93.
29. Martell, A. E.; Smith, R. M. "Critical Stability Constants", Plenum Press, New York, **2**, **1975**.
30. Spencer, J. N.; DeGamo, J. N.; Paul, I. M.; He, Q.; Ke, X.; Wu, Z.; Yoder, C. H.; Chen, S.; Mihalick, J. E. *J. Solution Chem.*, **1995**, *24*, 601.
31. Connors, K. A. "Binding Constants", Wiley, New York, **1987**.
32. Schwarzenbach, G. *Helvetica Chimica Acta*, **1933**, *16*, 522
33. Martell, A. E.; Smith, R. M. "Critical Stability Constants", Plenum Press, New York, **5**, **1982**.
34. De Stefano, C.; Foti, C.; Giuffrè, O.; Sammartano, S. *Talanta*, **1996**, *43*, 717.

APENDICE 1

Cálculo de la constante de formación.

Se propone el equilibrio siguiente para la asociación de porfirina libre (P) y huésped (H):



La absorbancia esta dada por:

$$\text{Absorb.} = \epsilon_P[P] + \epsilon_{PH}[PH] \qquad \text{Ec. 1}$$

$$[P]_T = [P] + [PH]$$

$$[H]_T = [H] + [PH] \approx [H]$$

Dada la condición: $[H]_T \gg [P]_T$

Se genera la expresión para $[P]_T$:

$$[P]_T = [P] + K[P][H]_T = [P](1 + K[H]_T)$$

Resolviendo $[P]$ y $[PH]$:

$$[P] = [P]_T / (1 + K[H]_T)$$

$$[PH] = (K[H]_T[P]_T) / (1 + K[H]_T)$$

Sustituyendo $[P]$ y $[PH]$ en la Ec. 1:

$$\text{Absorb.} = \epsilon_P [P]_T / (1 + K[H]_T) + \epsilon_{PH} (K[H]_T [P]_T) / (1 + K[H]_T)$$

Rearreglando la expresión anterior:

$$\text{Absorb.} = (\epsilon [P]_T + \epsilon_{PH} [P]_T K [H]_T) / (1 + K [H]_T)$$

Finalmente:

$$\text{Abs.} = (\text{Abs}_0 + \text{Abs}_0 (K [H]_T) / (1 + K [H]_T))$$

Donde $[P]$ = concentración de porfirina libre.

- $[H]$ = concentración de huésped.
 $[P]_T$ = concentración total de porfirina.
 $[H]_T$ = concentración total de huésped
 K = constante de asociación.
 ϵ = coeficiente de absorción molar
 $[PH]$ = concentración del complejo porfirina-huésped.
 $Absorb_{\infty}$ = absorbancia al infinito (a saturación).
 $Absorb_0$ = absorbancia inicial.

Cálculo de la relación [Monómero]/[Dímero]:

Se tiene que el cociente entre la absorbancia de la CP-I, evaluada a 392 nm y 372 nm está dada por la expresión:

$$\frac{A_{392nm}}{A_{372nm}} = \frac{\alpha X + \beta}{\gamma + X} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde α, β, γ = constantes

$$X = [\text{Monómero}]/[\text{Dímero}]$$

$$Y = \frac{A_{392nm}}{A_{372nm}}$$

Reordenando la Ec. 2, se tiene que $XY + \gamma Y = \alpha X + \beta$

Reordenando la expresión anterior.

$$X = \frac{\beta - \gamma Y}{Y - \alpha}$$

Se tiene que: $[P]_T = [\text{Monómero}] + 2[\text{Dímero}] = [M] + 2[D]$ Ec. 3

Multiplicando la Ec. 3 por $1/[M]$:

$$\frac{[P]_T}{[M]} = 1 + \frac{2}{X}$$

Luego: % Monómero = $\frac{[M]}{[P]_T} \times 100$