



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE HISTAMINA CON PORFIRINAS METALICAS

T E S I S

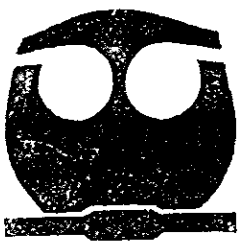
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

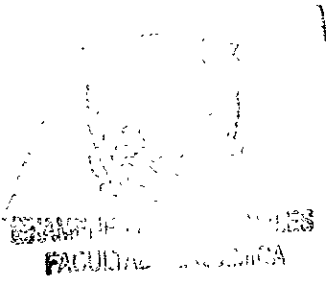
P R E S E N T A :

J. JESUS RECILLAS MOTA

286773



MEXICO, D.F.



2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. Francisca Iturbe Chinas.

Vocal: Dra. Laura María Gasque Silva.

Secretario: Dr. Jesús Gracia Mora.

1er Suplente: Q.F.B. Bertha Julieta Sandoval Guillen.

2do Suplente: Q. Katia Solórzano Maldonado.

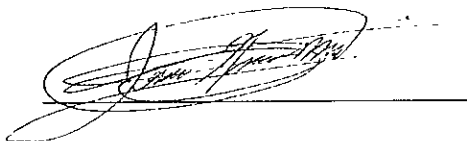
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 213 División de Estudios de Postgrado, Facultad de Química.

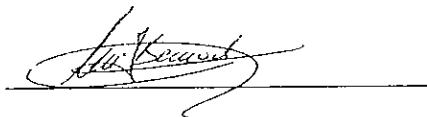
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear

Universidad Nacional Autónoma de México

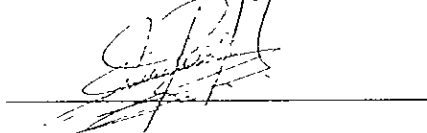
Asesor: Dr. Jesús Gracia Mora.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Gracia Mora', is written over a horizontal line.

Supervisor Técnico: Dra. María Josefa Bernad Bernad

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María Josefa Bernad Bernad', is written over a horizontal line.

Sustentante: J Jesús Recillas Mota.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J Jesús Recillas Mota', is written over a horizontal line.

Agradecimientos.

Al Dr. Jesús Gracia Mora, por ser mi maestro, asesor pero principalmente un gran amigo. Gracias por apoyarme a realizar este trabajo.

A la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad, por ser una gran amiga y la gran ayuda prestada para que este trabajo fuera realidad.

Al Dr. Edmundo Calva C, por permitirme continuar con mi trabajo en un momento difícil para nuestra Universidad.

Al Dr. Ricardo Mondragón, por permitirme continuar mi trabajo y hacerme sentir como uno más de casa.

Al Dr. Anatoli Iatsimirski, por todos sus comentarios y ayuda prestada para realizar este trabajo.

A la Dra. Ma. Laura Gasque Silva y la M en C. Francisca Iturbe Chinas por revisar y con sus comentarios mejorar el trabajo. Así como la ayuda prestada para conseguir mi objetivo.

A el M en C. Baldomero Gómez Reyes, por apoyarme en todo momento.

A la M. en C. Paola Gómez Tagle, por la ayuda prestada en todo momento.

A Oscar S. Yáñez y Rosa Isela del Villar, por el tiempo invertido en los espectros de RMN de las porfis.

Dr. David Díaz, por facilitarme el equipo de UV-vis.

A todos aquellos que directamente o indirectamente contribuyeron a que este trabajo fuera realidad.

Dedicatorias.

A DIOS, por todas las oportunidades, enseñanzas y personas que a través de mi vida me han hecho pensar en que hay que ser mejor ser humano.

A mis Padres, Jesús y María del Carmen, por ser ejemplo de lucha, trabajo y honestidad. Gracias por todo el apoyo y enseñanzas que he recibido de ustedes, por todo lo bueno y malo que hemos enfrentado juntos, por el pasado, presente y futuro, LOS AMO.

A mi hermana, Maricarmen Thalia por ser una gran amiga, ¡ Que digo! la más maravillosa amiga.

A mis tíos Félix Recillas Juárez y Minerva Targa de Recillas, por todos esos maravillosos detalles que han tenido siempre para mí y esos grandiosos momentos que hemos compartido, siendo para mi vida un ejemplo a seguir

A mis Abuelas, Esperanza e Hilaria, por todos sus consejos y dignidad que solo se pueden obtener a través de los años.

A mis tías Leonor y Concepción. Por todo el cariño que nos han brindado siempre.

A mi tío Teodoro Cortés Salvaterra, por todas tus enseñanzas y cariño para mí.

A mi "Tocayo" el Dr. Jesús Gracia Mora y Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad por enseñarme muchas cosas. pero entre tanta química y porfirinas, la principal es: el verdadero valor de un amigo. Gracias de todo corazón. Espero haya aprendido mucho de los dos

A la memoria de mi Padrino Samuel Puente, espero después tengamos más tiempo.

A los P. Martín Mejía Soto y Socorro Rosas por haberme escuchado y apoyado en momentos buenos y malos

Al Dr Edmundo Calva por toda su ayuda, consejos y charlas tan amenas de un alumno muy adelantado del maestro tiempo. Gracias por su ejemplo de dignidad, honor y coraje.

Al Dr Ricardo Mondragón, Mónica, Tais, Claudia, Don José. A todo el departamento de bioquímica del CINVESTAV por todo el apoyo recibido, la confianza y calidez de parte de ellos.

A mis amigos: Aurora, Leonardo, Mauro, Andrés, Milton, Omar, Cintya, Rivelino, Miguel, Gladys, Sigfrido Sandín, Valentín, Edgar y todos aquellos compañeros de la carrera que hicieron única la estancia en la Universidad.

A todos los compañeros del 213 que hicieron menos pesado el trabajo de laboratorio (Toño, Yamilete, Baldomero, Paola, Geonel, Lupitas).

A Baldomero. por todos tus consejos.

A las profesoras Graciela Müller Carrera, Mercedes Llano y Teresa Unda, por todas lo que aprendí en el subprograma 121.

A los buenos amigos de sala multimedia que hicieron más padre mi trabajo: Iliana, Ros, Alan, Beto, Toño, Fabo, Soraya, Poncho, Alex, Mauricio, Luisa.

A los buenos amigos de la Pastoral: Jesús, Pepe, Sharón, Pablo, Edgar, Nena, Tere, Luis y los que por flojera no escribo pero no los olvido. En forma muy especial para Ana Lilia.

A mi familia Recillas Rodríguez por todo lo que hemos compartido.

Abreviaturas.

1:1 = Equilibrio 1 histamina con 1 derivado de porfirina

1:1:2 = Equilibrio 1 histamina con 1 derivado de porfirina y equilibrio 2 histamina con 1 derivado de porfirina.

TMA = Trimetblamina.

IMP = Inosina monofosfato.

ATP = Adenosin Trifosfato.

HPLC = Cromatografía líquida de alta presión

CG = Cromatografía de gases.

UV = Ultravioleta.

mM = milimolar

μm = micromoles.

μL = microlitros.

M = metal

L = ligante.

P = derivado porfirinico.

H = Histamina.

{HP} = complejo derivado porfirina histamina.

{H₂P} = complejo derivado porfirina 2histamina

TCPP = tetracarboxifenilporfirina.

TMPyP = tetra(*N*-metilpiridinio)porfirina

TCP = 5,10,15,20-tetra-piridilporfirina

TPPS₃ = tris(4-sulfonatofenil)porfirina.

TPPS₄ = tetrakis (4-sulfonatofenil)porfirina

$\Delta\text{abs.}$ = diferencia de absorbancia.

$\Delta\epsilon$ = diferencia de coeficientes de absortividad molar.

ΔH = entalpía.

ΔS = entropía

K = constante de equilibrio

Cal = caloría

Lys = lisina.

Arg = Arginina.

Ome = metoxi.

cc = configuración cis-cis

tt = configuración trans-trans

nm = nanómetros

λ = longitud de onda.

Å = amstrong.

PH₂ = porfirina libre

PH₂²⁻ = porfirina en forma diácido

P²⁻ = porfirina forma dianión.

Tris = (Tris[*N*-hidroximetil] aminometano)

D₂O = agua deuterada.

TG-FTIR = Termografía gravimétrica acoplada a infrarrojo con transformada de Fourier
ESCA = Análisis químico por espectroscopia electrónica
FDA = Food and Drug Administration.

Índice.

Abreviaturas.	
Introducción	1
Antecedentes	3
Histamina y factores que afectan su formación	4
La formación de histamina como indicador de frescura en los productos marinos. .	12
Límites recomendados de contenidos de aminas	12
Determinación de aminas biogénicas en pescado	13
Cromatografía líquida	13
HPLC	14
Cromatografía de capa fina	15
Cromatografía Gas-líquido	15
Evaluación enzimática	16
Evaluación sensorial	17
Métodos microbiológicos	17
Compuestos volátiles	17
Determinación con ATP	18
Mediciones físicas	19
Las porfirinas	21
Interacción histamina-compuestos metálicos	26
Porfirinas	26
Otros sistemas	29
Planteamiento del problema	34
Objetivos	35
Objetivo general	35
Objetivos particulares	35
Metodología experimental	36
Reactivos	36
Amortiguador	37
PH	37

Estudios por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV – visible.	37
Análisis de resultados	40
Reacciones de complejación histamina con metaloporfirina	43
Asociación con histamina	44
Discusión en función de las constantes	54
Conclusiones	59
Apéndices	61
Bibliografía	66

Introducción

Una de las áreas más importantes de la química en las últimas décadas ha sido el reconocimiento molecular, este fenómeno se fundamenta en que una molécula pueda interactuar específicamente con otra, es decir, que una molécula huésped reconozca fundamentalmente a una molécula anfitrión. El reconocimiento generalmente funciona a través de interacciones por varios sitios acordes a la geometría de las moléculas involucradas en el proceso. Las interacciones pueden ser de diferente naturaleza y esto depende de la propia estructura de las moléculas.

Durante un largo periodo, la asociación no covalente se trató como un tipo de interacción débil y no específico, se consideró como un componente de procesos tales como solvatación y adsorción a interfaces. Un descubrimiento de importancia primordial fue que la asociación no covalente es responsable en buena medida de la alta eficiencia y especificidad en el reconocimiento molecular incluyendo una gran cantidad de procesos biológicos. Así se sentaba las bases de una nueva área de la química, actualmente llamada *Química supramolecular*.¹

Esto ha generado mucho interés por el estudio de estos sistemas, para tratar de generar estructuras receptoras capaces de reconocer específicamente moléculas de interés práctico, así como elucidar el comportamiento químico para encontrar cada vez mejores receptores².

Por otro lado la histamina es un compuesto de gran importancia en procesos biológicos, el contar con métodos rápidos y eficientes para detectar esta sustancia es primordial, por lo que el desarrollo de moléculas capaces de reconocer a la histamina representa una buena alternativa para este objetivo, ya que la histamina es una sustancia relacionada con la histaminosis, que es una intoxicación química producida por la ingestión de alimentos con una alta concentración de ésta.

Las porfirinas sustituidas tienen características estructurales adecuadas para que pueda existir una interacción por varios sitios con la histamina. Las porfirinas pueden actuar como ligantes de gran variedad de cationes metálicos formando compuestos complejos con número de coordinación cuatro, con la posibilidad de aumentar el número de coordinación hasta seis cuando se coordinen en las posiciones axiales otro tipo de ligantes.

Por esa razón en este trabajo se experimentó como receptor para la histamina. Las siguientes porfirinas: benzóica, coproporfirina y una porfirina tetrasustituida con tosilato, y con cada una se coordinaron dos metales formando las metaloporfirinas de Zinc y Cobre.

La histamina, además de tener la posibilidad de coordinarse al metal puede interaccionar con grupos sustituidos de cada porfirina para estabilizar más el complejo porfirina-metálica-histamina a través de interacciones tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones de apilamiento π , Van der Waals, etc.

Antecedentes

En los tiempos prehistóricos, durante los cuales el hombre primitivo se mantuvo vivo principalmente de la caza, probablemente descubrió pronto el arte fácil de la pesca. En el antiguo Egipto, la principal fuente alimenticia era el pescado. Al principio sólo se realizaba en el río Nilo y más tarde también en el Mar Rojo

Durante la Edad Media, el bacalao salado, la sardina y su pariente más pequeño, blando y graso, la anchoa, eran conocidos en la cuenca mediterránea e incluso se inició la exportación en pequeña escala al oriente medio.

Algunos países dependen en gran parte de la pesca para cubrir sus necesidades proteicas. Japón, la primera potencia pesquera del mundo, vivió una época en la que no consumía carne de animales de abasto (la ingestión de carne la introdujeron los visitantes extranjeros). Y sin embargo, el pescado es el único alimento importante de origen animal que todavía no ha sido completamente domesticado o cultivado. Sólo se dispone de salmones y truchas criados en granjas.

Hasta hace poco, el pescado fresco solamente se consumía en las zonas costeras, ya que su rápida alteración creaba problemas de transporte insalvables. El moderno transporte refrigerado y el rápido procesado mecánico que se inicia ya a bordo, han resuelto el problema en gran medida, pero aún persisten problemas relacionados con la alteración rápida del pescado.

Hay muchas razones para una alteración del pescado más rápida que la de la carne de mamífero, entre ellas se tienen las siguientes: mayor contenido de agua, mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que son más fácilmente oxidables y por tanto más fácilmente degradables, poco tejido proteico y por tanto poca protección frente a la oxidación y penetración microbiana.

Los animales de abasto sacrificados con el mínimo estrés y lo mejor posible no experimentan sacudidas y poseen en sus músculos una alta concentración de glucógeno al que se le denomina con frecuencia almidón animal, se origina de carbohidratos sencillos como la glucosa y se almacena en el hígado bajo la influencia de la hormona insulina. Cuando se necesita para

producir energía es liberado de su almacén, esto lo realiza la hormona adrenalina que se produce cuando se excita un mamífero, o incluso un animal de "sangre fría". Después de la muerte tranquila de un animal acaecen una serie de reacciones en cadena que se inician con la degradación del glucógeno y terminan con la formación de ácido láctico que actúa como una especie de conservante alimenticio. Si un animal lucha por su vida utiliza en este combate gran parte de su glucógeno y producirá muy poco ácido láctico, cuando se captura un pez generalmente hace grandes esfuerzos y contracciones antes de morir y en consecuencia, después de la muerte se altera rápidamente.

Histamina y factores que afectan su formación.

Seguido de la muerte del pescado, el Adenosin Trifosfato (ATP), es rápidamente degradado a Inosina monofosfato (IMP), por las enzimas endógenas (autólisis). Las siguientes degradaciones del IMP a inosina y hipoxantina es mucho más lenta y es catalizada principalmente por la enzima endógena IMP fosfohidrolasa y la inosina ribohidrolasa, con la contribución de enzimas bacterianas que se incrementan conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. La degradación de ATP tiene relación paralela de cómo se reduce la frescura del pescado³.

Además tenemos otro problema inherente a la captura del pez, cuando se encuentran en la red, la presión de la red y el peso de unos peces sobre otros determina que las bacterias del contenido intestinal salgan con éste y se extiendan por la piel, en estas condiciones el pescado se altera pronto, ya que las bacterias solo se inactivan por abajo de los -6°C.

El pescado tiene una alta cantidad de lípidos insaturados que son fácilmente oxidables, resultando en una alteración en aroma, sabor, textura, color y valor nutricional. La oxidación se presenta inmediatamente después de la captura. Pero toma mayor importancia a temperaturas menores de 0°C cuando la oxidación mejor se lleva por la actividad microbiana dando un factor de mayor daño⁴

La oxidación de los lípidos inicia con tempranos cambios en el pescado, esos cambios alternan el balance natural entre antioxidantes y pro-oxidantes incluido oxígeno activo, la activación de hemoproteínas y un incremento del hierro libre por consumo de antioxidantes⁵.

El contenido de aminoácidos libres en los productos pesqueros es alto cuando se compara con los animales terrestres ya que tiene como función en los organismos acuáticos la de osmoreguladores⁶ considerando esto, sabiendo que el músculo de pescado es un soporte ideal para la formación de microorganismos y de una amplia variedad de compuestos amino, resultado de una descarboxilación enzimática de los aminoácidos, esto ocurre durante un proceso de descomposición que implica un proceso de proteólisis junto con una producción y activación de las aminodescarboxilasas⁷.

De estas reacciones de descarboxilación de los aminoácidos se forman ciertas aminas, conocidas como biogénicas (ver figura N° 1). Estas aminas pueden ser alifáticas, cíclicas o heterocíclicas de bajo peso molecular, entre ellas se encuentra la: trimetilamina, putrecina, cadaverina, espermina e histamina, algunas de ellas generadas en el músculo del pescado de la siguiente manera Cadaverina, generada a partir de la lisina; putrecina, generada a partir de la ornitina e histamina de la histidina.

De entre ellas, la histamina, fue la primera amina biogénica caracterizada de este grupo de aminas. Es una amina no volátil, formada por descarboxilación del aminoácido histidina, para lo cual se precisa de la enzima **L-histidina-descarboxilasa**,

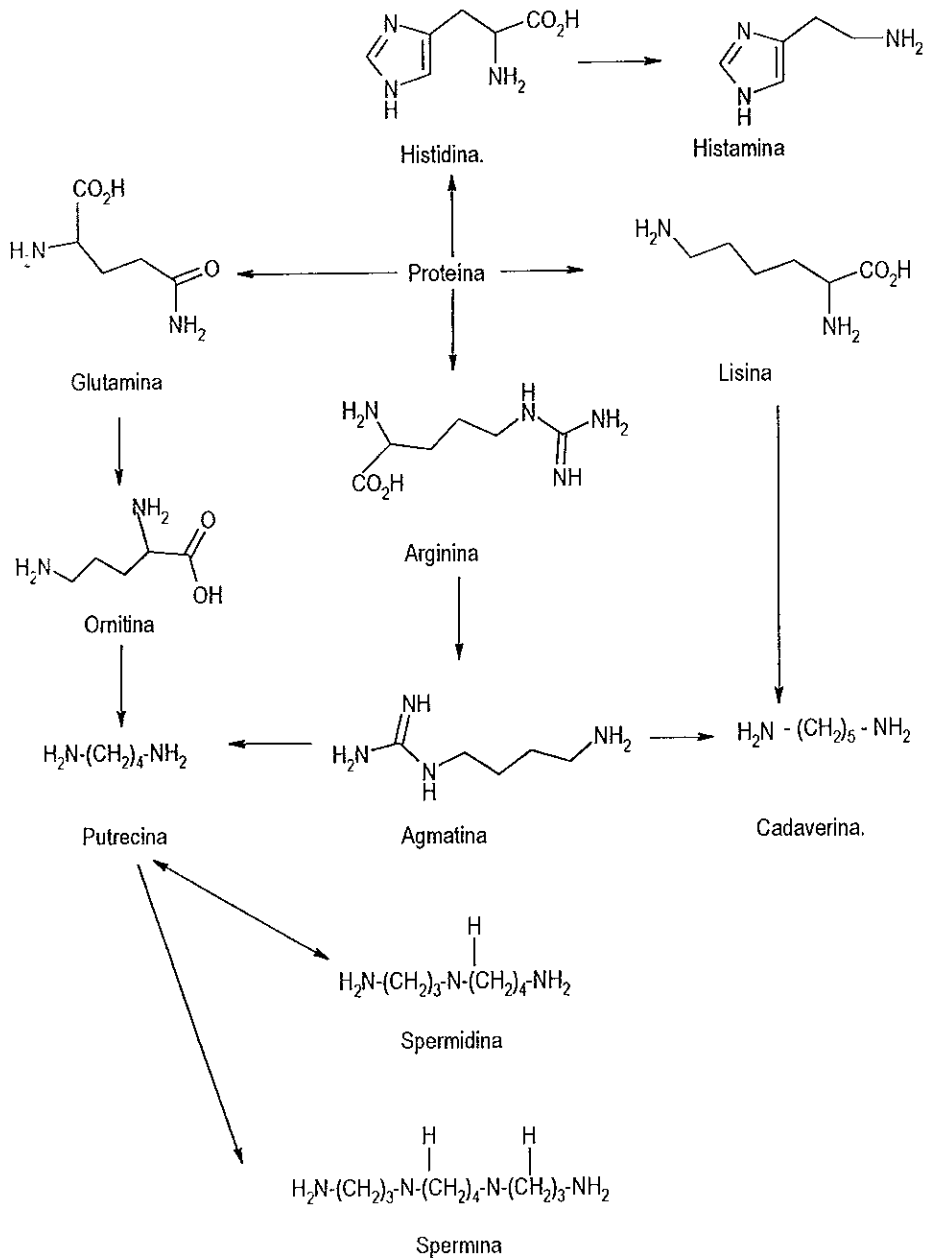


Figura N°1 Ruta de formación de histamina y otras aminas biogénicas.

Los factores involucrados en la formación de histamina que a altas concentraciones causa la intoxicación llamada escombroidosis o intoxicación histamínica es la forma más frecuente de intoxicación por pescado en todo el mundo. La escombroidosis la pueden producir pescados escombroides (caballa o escombro, atún, bonito o albacora), o no escombroides, como el pez espada. Estos factores han sido estudiados en muchas de estas variedades⁸.

En el trabajo de Bremner en 1992, se asume que la histamina es producida en una menor parte por autólisis. Esto es debido a que después del agua que se encuentra en un contenido de 80% (p/p), las proteínas son el mayor constituyente (15-20%). Las proteínas que se encuentran en el músculo pueden ser clasificadas de la siguiente forma: proteínas sarcoplásticas que son solubles en agua; proteínas contráctiles (como miosina y actina), las cuales son extraíbles en disoluciones de una alta fuerza iónica y las proteínas que son insolubles en disoluciones tanto de alta y baja fuerza iónica (colágeno). En el almacenamiento post-mortem, no hay un cambio en las proteínas sarcoplásticas ni en su actividad enzimática y composición, aunque en el caso de las proteínas miofibrilares, las proteínas del citoesqueleto (α -actinina y α -conectina) son las que presentan proteólisis. La región Z de la miofibrilla aparece destruida por acción de las proteasas liberando α -actinina. Esto además muestra a la β -conectina, proteína que tiene un considerable peso molecular además una disposición longitudinal a lo largo de la miofibrilla, ésta es rota de la α -conectina por la proteólisis. Sin embargo los cambios no son reportados en la mayoría de las proteínas contráctiles: actina y miosina. La proteínas de colágeno son relativamente un componente menor del músculo y a pesar de haber un conflicto evidente, es generalmente aceptado que en cierto grado las colagenasas toman lugar en la descomposición⁹.

Por otro lado, la principal forma de producción de histamina es por microorganismos de flora inicial y los desarrollados en el pescado, mediante la acción de enzimas endógenas. Kimata, hace referencia a un microorganismo en especial que está relacionado con envenenamiento por histamina en Japón que es el *Proteus morganii* que pertenece a la flora natural de muchos peces. La histamina, se encuentra en altos niveles, en tejidos de pescados en descomposición. Aunque hay otros alimentos que pueden tener también altas concentraciones de histamina como pueden ser el queso y pescado en conserva en el cual el microorganismo causante de la histamina es el *Lactobacillus casei*, este microorganismo es capaz de producir histamina en conservas de pescado

almacenadas a pH = 5 y temperatura ambiente. Estos productos fermentados son característicos en los países asiáticos siendo éstos frecuentemente ricos en histamina. La sardina fermentada con pan de arroz es una comida tradicional Japonesa, ésta preparada en toneles por un periodo de 6 meses a 1 año de fermentación. En un estudio realizado por Yatsunami y colaboradores, se observa un crecimiento de bacterias formadoras de histamina halotolerantes y halófilas de $10^1 - 10^2$ a 10^4-10^5 después de un periodo de 6 meses, el contenido de putrecina, histamina y tirosina, también tuvo un incremento considerable durante este periodo. El aislamiento de los microorganismos halotolerantes y halófilos en la sardina cruda, fueron identificados como: Micrococcus, Vibro, Pseudomonas III / IV NH y Pseudomonas III / IV H, los microorganismos identificados 6 meses después en el proceso de fermentación fueron: Staphylococcus, Micrococcus y Vibro¹⁰.

Por otro lado Sanceda, estudió el comportamiento de la histamina durante la fermentación en la manufactura de salsas de pescado. Para tal objetivo utilizaron pescado fresco y pescado descompuesto, con y sin agregado de histidina. El contenido de histamina en la adición de 2% de histidina con pescado fresco no cambia significativamente después de un lapso de 4 meses. Sin embargo cuando la histidina es adicionada a un pescado en descomposición el contenido de histamina presenta un ascenso pero decrece continuamente con respecto al tiempo. Este decaimiento sugiere la presencia de una bacteria que descompone a la histamina. También se puede concluir que al inicio de la fermentación las bacterias más favorecidas son las que pueden descarboxilar a la histidina y conforme pasa el tiempo de fermentación las condiciones ya no le son favorables. Analizaron 10 salsas comerciales de pescado y en 8, los niveles de histamina estaban por debajo de nivel de descomposición marcado por FDA de 50mg/Kg¹¹.

En 1995, Wei y colaboradores realizaron pruebas de almacenamiento con pez espada fresco, se vio que contenía al inicio espermina y con el paso del tiempo de almacenamiento, hubo un aumento en la cantidad de putrecina, cadaverina, histamina y espermina. El orden de grado de producción de las aminas biogénicas fue el siguiente: histamina > cadaverina > espermina > putrecina¹².

En un estudio realizado por Aksnes y Brekken en 1988, determinaron que la formación de aminoácidos también depende de la estación de recolección y de alimentación anterior a la captura

la recolección de pescado, en verano, durante su alimentación rápida, libera gran cantidad de lisina y arginina, seguido por los precursores microbianos de la cadaverina y la putrecina respectivamente, debido a la presencia de gran cantidad de enzimas del tracto intestinal¹³.

En 1988, Dawood y colaboradores, estudiaron el efecto de la propiedad (entre 0°C y 30°C) de trucha arcoiris fresca, (*Salmo Irideus*) por un periodo de 6 horas antes de un almacenamiento en frío, las muestras enteras y evisceradas, fueron analizadas para putrecina, cadaverina, histamina y espermina, para la espermina por HPLC a partir de sus derivados de benzoil por intervalos de 2 a 14 días de almacenamiento a 0°C, obteniendo los siguiente resultados: un incremento en la concentración de putrecina (menor de 3.5 µg/g a 6-8 µg/g); cadaverina (menor de 1 µg/g a 1-4 µg/g) e histamina (menor de 1 µg/g a 4.5-13 µg/g) durante el almacenamiento mientras que los niveles de espermina que inicialmente era menor de 5µg/g y espermina inicialmente menor de 6 µg/g. Decrecieron después con un crecimiento inicial durante los primeros 4 días. La concentración de aminas en el pescado eviscerado fue menor que en el pescado entero¹⁴.

Okuzumi y su grupo en 1990, estudiaron los cambios de la flora microbiana y el contenido de poliaminas durante el almacenamiento de carne picada de macarela (*Trachurus japonicus*). Fue estudiada en los estado de descomposición (la cuenta total aeróbica era de 1.1 a 1.3 X 10¹⁰ /g) en muestras almacenadas a 5°C, *Pseudomonas* I/II y *Pseudomonas* III/IV-NH, eran las típicas bacterias en el deterioro, que dominaban en la flora bacteriana y fueron detectados altos contenidos de aminas, siendo los siguientes valores los obtenidos: putrecina(2.3-54 mg/100g), cadaverina(11-15 mg/100g) e histamina (7.2 -12 mg/100g)¹⁵.

Yamanaka y colaboradores en 1987, examinaron la variación de: tiramida, putrecina, cadaverina, agmatina y triptamina en el músculo de calamar durante almacenamiento a las siguientes temperaturas: 0, 3.5 y 15°C. Inicialmente, cuando el músculo está fresco, la agmatina es detectada en pequeñas cantidades, la cantidad de agmatina se incrementa conforme pasa el tiempo de almacenamiento llegando a exceder los 30mg/100g al inicio de la descomposición y de 40mg/100g en un estado avanzado de descomposición, a partir de esto, concluyeron que la agmatina formada a partir de la arginina, puede ser un buen indicador de la frescura del calamar¹⁶.

En un estudio de pulpa de trucha congelada Dawood y colaboradores, reportaron que la concentración de putrecina y cadaverina estaba en exceso (1.10 ppm) en el segundo día de que el pescado entero estaba a 0°C, de allí propusieron que la determinación de ambas aminas puede ser utilizada para determinar su calidad. Para muestras almacenadas a 30°C, se comprobó que *Vibrio* y *Photobacterium* eran las bacterias dominantes y se obtenían altas concentraciones de histamina (210-1336 mg/100g) y cadaverina (74 - 612 mg/100g)¹⁴.

El envenenamiento por histamina está reportado como una de las mayores intoxicaciones de origen alimentario Originalmente asociada con el consumo de pescados pertenecientes a los géneros escombroides y aunque también se han presentado en especies no escombroides y muy rara vez en quesos madurados. La escombroidosis es una intoxicación que daña a los seres humanos que en casos severos es muy rápida (10 a 30 minutos). Los síntomas del envenenamiento por histamina incluyen: dolor de cabeza, náusea, vómito, comezón, diarrea, sensación de ardor estomacal e hipotensión ^{8,17}.

Los niveles de histamina que pueden llegar a constituir niveles tóxicos es muy incierto debido a los potenciadores de la toxicidad, ya que pueden ser más baja que la dosis efectiva presente en el pescado. Está aceptado que en la presencia de una intoxicación por histamina cuando se presenta un buen proceso de enfriamiento, la concentración de histamina raramente pasa de 5 mg/100g de muestra.

Sin embargo, el riesgo de envenenamiento por histamina no sólo está asociado con el consumo de pescado fresco, Ijomah en 1992 concluyó en su estudio, que también debido a la resistencia de la histamina al calor puede estar presente en otros productos como el atún enlatado. La presencia de histamina en cantidades tóxicas en carnes esterilizadas puede ser debido a las pobres condiciones de higiene en el proceso de elaboración. Arnold y Brown, en 1978, mencionan que cuando hay incidentes de envenenamiento por especies escombroides, la concentración de histamina generalmente se encuentra a más de 100 mg/100g de muestra¹⁸. En el trabajo hecho por Mersero en 1974, la intoxicación escombroidosis se atribuye al consumo de atún conteniendo histamina en una concentración de 68-280 mg/100g de muestra¹⁹

Debido a que la histamina y las aminas biogénicas no pueden fácilmente ser destruidas por métodos físicos como podría ser el enfriamiento y calentamiento hay que evitar su formación.

Contrario a lo que se esperaba la nueva evidencia médica ha demostrado que la histamina presente en el pescado tiene una participación menor en la etiología de la escombroidosis. En consecuencia hay dos hipótesis que se desarrollaron a partir de esto y son las siguientes: 1) la acción de la histamina en la dieta es potenciada por otros componentes en un pescado tóxico o 2) las toxinas, en ciertas células del organismo y una terapia de antihistamínicos resulta ser efectivo para reducir el nivel de histamina endógena y de los efectos de la histamina de la dieta¹⁹⁻²².

Muchos reportes en vivo y en vitro sugieren que el metabolismo de absorción y/o la presencia de una amina biogénica puede afectar el efecto de una segunda amina. Las diaminas y poliaminas inhiben la unión entre la histamina con la mucina, por lo tanto la histamina puede ser liberada de la mucina intestinal e incrementar la cantidad de histamina absorbida en lumen intestinal resultando que haya un aumento en la toxicidad por histamina^{23,24}.

La temperatura de almacenamiento es un factor muy importante para la producción de histamina, generalmente a temperaturas de 0°C o menores inhibe la formación de histamina, Taylor en 1982, recaba información a temperaturas entre 2 y 10 °C y aunque no está bien definido ya que muchos estudios han reportado que a esas temperaturas la formación es mínima o no hay producción de histamina, concluye que las diferencias entre estos estudios es quizá debida al tipo y nivel de flora microbiana en el pescado usado para los estudios²⁵

La formación de histamina como indicador de frescura en los productos marinos.

El uso potencial de la concentración de histamina como criterio de aseguramiento en la frescura de los productos marinos se ha discutido en muchas investigaciones. La presencia de histamina en el músculo de pescado es un buen indicador de la descomposición que se está llevando a cabo, por lo que la concentración de esta amina biogénica tiene correlación con la calidad sanitaria del pescado

Límites recomendados de contenidos de aminos

En 1982, la FDA estableció el nivel de acción de defecto por histamina en los productos de pescado escombroides como 20 mg/g, lo cuál indica un mal manejo y un nivel de acción de peligro de 50 mg/100g, el cuál es considerado como una riesgo para la salud. Aunque la relación entre el nivel de histamina y la toxicidad de la muestra de pescado no es muy clara, el tener un contenido de histamina mayor de 200 ppm en el pescado puede ser considerado como toxicológicamente significativo y un contenido mayor de 50 ppm indica que el pescado fue sometido a malas prácticas de manufactura y posiblemente sometido a calentamiento^{18,26}. En Francia el máximo permitido para la concentración de histamina en producto marinos es de 10 mg/100g aplicado para el atún²⁷.

La FDA en 1995 propuso una nueva guía, a partir de la revisión de políticas anteriores, en la cuál se relaciona la descomposición de productos pesqueros con la concentración de histamina en los mismos. A continuación se presentan los cambios más importantes realizados:

1. Considerar la descomposición del pescado cuando la concentración de histamina sea de 50 ppm, anteriormente se consideraba 100 ppm.
2. Extender la nueva aplicación al atún y mahi-mahi crudos y congelados.
3. Eliminar la comprobación de la descomposición del pescado por métodos sensoriales cuando la concentración de histamina era menor de 200 ppm
4. Considerar en descomposición a otras especies cuando los niveles de histamina se encuentran entre 50ppm - 500 ppm.

5. Considerar a otros pescados diferentes al atún, implicados en un envenenamiento por histamina o que puedan causar daño a la salud, cuando los niveles de histamina se encuentren por arriba de 500 ppm²⁸.

Determinación de aminas biogénicas en pescado.

La frescura tiene la mayor contribución a la calidad del pescado y de los productos pesqueros, siendo esencial para la calidad final de éstos.

Varias técnicas analíticas, incluidas la cromatografía de capa fina, HPLC, cromatografía de gases, análisis de aminoácidos, sensores electroquímicos, sensores de amperaje y ensayos enzimáticos se han desarrollado para la determinación de aminas y así determinar la frescura del pescado.

El procedimiento fluorométrico es el método oficial de la AOAC, siendo además el más común para la determinación de histamina²⁹. El método involucra una extracción con metanol de la muestra de alimento, la separación de la histamina de los aminoácidos pasado a través de una columna de intercambio iónico y reaccionando con *o*-ftaldehído bajo condiciones controladas, seguidas después por la medición fluorométrica. Este método proporciona exactitud y sensibilidad con un Límite de aproximadamente 1 mg histamina/100g de muestra²⁷.

Cromatografía líquida

La detección de la histamina separada por cromatografía líquida tiene problemas dado que la histamina absorbe pobremente la luz ultravioleta y flourece pobremente, la histamina no es una molécula conveniente para la detección electroquímica. Se han hecho variantes donde la introducción en una post-columna que reacciona con *o*- ftaldehído para formar un derivado fluorescente que aumente la sensibilidad y especificidad. El Límite de detección es de 1.5 ng con una respuesta lineal en un intervalo de 7 y 750 ng³⁰.

La variante de cromatografía líquida propuesta por Veciana-Nogues, en 1995, es descrita para la determinación de aminas biogénicas en pescado y productos de pescado. La histamina, tiramina, serotonina, β -feniletilamina, triptamina, putrecina, cadaverina, agmatina, espermina, y espermidina pueden ser determinadas en menos de 60 minutos. La preparación de la muestra implica sólo 2 extracciones con 0.6N HClO₄ y son filtrados en a través de una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro. La ausencia de interferencias por aminas volátiles, aminoácidos y dipéptidos está comprobada. Los estudios de fiabilidad fueron satisfactorios, el método es lineal para cada amina en un intervalo de 0.25 y 8 mg/L y una precisión (coeficiente de variación) de entre 0.7-0.95³¹.

Cromatografía Líquida de alta presión.

En el método propuesto por Gow-Chi Yen y Chi-Luan Hsieh en 1991, tiene como objetivo, la determinación simultánea de putrecina, cadaverina, tripamina, 2-feniletilamina, espermina, espermina, histamina, tiramina y agmatina. Las aminas son derivadas con cloruro de benzoilo y separadas con una columna RP-18, usando un gradiente de elución con una mezcla de agua-metanol durante 10 minutos. El contenido de aminas en pescado enlatado fueron detectadas con este método, detectando 9 aminas en bajos niveles³².

Por otro lado, Sato y colaboradores en 1995, realizaron un nueva vía para la pre-columna de derivación y análisis de histamina por medio de HPCL, el método está basado en la formación del derivado diazo acoplado con la histamina. Este método de derivación es simple, eficiente, sensible y específico para la histamina y otros compuestos imidazol. Por medio de HPLC, permite rapidez y la separación de la fase unida con detección de luz visible de ese compuesto en 20 minutos con una sensibilidad de 10 pmoles. Este método fue utilizado para confirmar la cantidad de histamina producida en el músculo del pescado *Scomber japonicus*³³.

Un trabajo similar al hecho por Gow-Chi Yen and Chi-Luan Hsieh fue el realizado por Hwang Deng-Fwu, y colaborares en 1997, encontrando condiciones óptimas para la bencilación de las aminas con cloruro de benzoilo a 30°C por 40 minutos para eliminar la influencia de la interferencia de picos durante el análisis. La curva de calibración para cada amina es lineal en un intervalo de 0.002 μ g – 4 μ g. La amina es recuperada de la carne de pescado por extracción con 6% ácido

tricloroacético con HClO_4 1M Este estudio se hizo en un filete de marlín frito que contuvo 84.1mg/100g de histamina³⁴.

Cromatografía de capa fina.

Bajos niveles de espermina, espermidina, putrecina, cadaverina e histamina pueden ser determinados con cromatografía de capa fina, (CCF), con el método desarrollado por Spinelli y colaboradores en 1974. El método usa derivados de fluorescentes de amina formados con cloruro de dansilo, (5-dimetilamino)-1-naftaleno sulfón cloro)³⁵.

Cromatografía Gas-líquido.

Staruszkiewicz y Bond en 1981 desarrollaron un procedimiento de CG para la determinación cuantitativa de las diaminas putrecina y cadaverina usando derivados perfluoropropionil. La extracción de las aminas de alimentos fue hecha con metanol y hexanodiamina usado como estándar interno. El residuo seco de las sales de clorhidrato de las aminas fue preparado y derivado con perfluoropropionato anhidro por calentamiento a 50° C durante 30 minutos. Se usó una columna de alúmina para separar la mezcla de reacción y los derivados fueron eluidos con 30% de disolución de acetato de etilo en tolueno. La separación de este procedimiento de CG, fue hecha en la columna a 180°C, usando este procedimiento, pudo ser cuantificado menos de 1 mg de diaminas/g de muestra; además se utilizó un detector de captura de electrones³⁶.

El grupo de Yamamoto, desarrollo un método cuantitativo para la determinación de putrecina, cadaverina, espermidina y espermina en alimentos. Ésta se consigue por una elusión a través de una columna con resina de intercambio iónico y son convertidas en derivados carbonilos por medio de la reacción con etil cloroformato en medio acuoso antes de aplicar la cromatografía con la flama de ionización. Usaron 1,8 diamino octano como estándar interno y realizaron la separación y la determinación de los derivados en una columna Uniport HP (0.5m) bajo condiciones de temperatura programada³⁷.

Evaluación enzimática.

Lerke y colaboradores, realizaron un método rápido para detectar histamina en el pescado. El procedimiento cualitativo usa dos pasos secuenciales, en el primero, la enzima diamina oxidasa cataliza la desaparición de histamina con la producción de peróxido de hidrógeno. La detección del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo por la formación de cristal violeta a partir de bases leuco con la presencia de peroxidasa a 596 nm; este método se puede utilizar en pescado crudo o pescado procesado³⁸.

Posteriormente, una modificación del método de Lerke por el grupo de Rodríguez-Jerez resultó un método rápido para determinar la histamina, consiste en la determinación de la longitud de onda óptima, esta depende del tiempo de incubación a una temperatura constante de 37°C. Resultando que la longitud de onda óptima fue de 580 nm, con una incubación de 15 minutos, con esas condiciones la linealidad que se observa entre 1 y 25 ppm de histamina³⁹.

Otros métodos que se emplean para la determinación de aminas son los que usan la diamina oxidasa. Entre éstos se encuentran los realizados por Male y por S. Tombelli, éste último desarrolló un método amperométrico que funciona como un sensor de histamina, putrecina y cadaverina. La diamina oxidasa es extraída del riñón de cerdo, purificada, homogenizada e inmovilizada dentro de una membrana porosa de nylon. La membrana enzimática fue sujeta con un electrodo amperométrico para la determinación de la concentración de las aminas acumulados en filetes de pescado durante el almacenamiento. Para la detección del peróxido de hidrógeno liberado, el electrodo de platino debe estar a +400 mV vs. Ag/AgCl para impedir la contaminación y eliminar la interferencia electroactiva. El biosensor es lineal arriba de 6mM y tiene un límite de detección de 25µM para estas tres aminas, las membranas con las enzimas son estables a 5°C y pueden ser usadas para 60 ensayos^{40,41}.

Evaluación Sensorial.

La evaluación sensorial es definida como la disciplina usada para evocar, medir, analizar, e interpretar las características de los alimentos, las pruebas están divididas en tres grupos: pruebas discriminativas, afectivas y descriptivas⁴².

Aunque son pruebas que tienen muy buena correlación entre los datos obtenidos y la cantidad de histamina en la muestra, presentan el problema de que tienen que ser realizadas con personal altamente entrenado y la cuantitatividad es muy pobre, lo que las hace pruebas poco accesibles.

Métodos Microbiológicos.

Muchas bacterias que dañan al pescado reducen el óxido de trimetilamina a trimetilamina (TMA), y esta reducción es usada como base para varios métodos rápidos conductimétricos, siendo un buen método con una buena correlación con la frescura del pescado, los cuales son informados en almacenamiento aeróbico y pescado empaquetado.

Luong y Male desarrollaron un sistema biosensor para medir la concentración de hipoxantina como indicador de frescura, la hipoxantina es un producto de autodegradación formado por la adenosina 5'- trifosfato en el pescado y es el responsable del sabor amargo característico de los pescados muy poco frescos⁴³.

Compuestos volátiles.

El olor es uno de los parámetros más importante para evaluar la frescura del pescado, siendo una medición para determinar el tiempo y condiciones de almacenamiento debido al daño presentado

Los compuestos volátiles que contribuyen al aroma del pescado se pueden dividir en 3 grupos basados en su origen.

Olor del pescado		
Olor de pescado fresco aromas de plantas, pepinos, hongos	Olor de daño microbiano sulfuro, amoniac y olores pútridos (diversas aminas)	Olor por daño de oxidación olor aceite de hígado de bacalao
Alcoholes y compuestos carbonilos C ₆ -C ₉ Ejemplo: 1,5- octadecin-3ol, 2,6-nonadienal.	Etanol,3-metil-1- butanol,etilacetato,amoniac, TMA, sulfuro de hidrógeno, mercaptano	Hexanal, 2,4 - heptadienal, 2,4,7- decatrienal

Tabla Nº 1 Compuestos que contribuyen al aroma del pescado.

Los métodos para el análisis de compuestos volátiles involucra la colección y concentración de éstos seguida por una cromatografía para identificar y cuantificar a los compuestos. Los compuestos de alto punto de ebullición requieren siempre métodos más eficientes de aislamiento como pueden ser disolventes orgánicos o CO₂ supercrítico.

Otros métodos se basan en las destilaciones simultáneas y la extracción en fase gas o en una destilación al alto vacío, una vez que una sustancia volátil ha sido atrapado ésta debe ser pasada por una fase térmica de desorción o extracción con disolventes para cromatografía para la correcta separación e identificación.

Aunque la cromatografía es un buen método de análisis para la detección de histamina, la complejidad y los costos de éstos los hacen reservados para nivel laboratorio e investigación⁴⁴.

Determinación con ATP.

Un índice químico adecuado para determinar la frescura del pescado debe ser cuantificable y objetivo. El ATP por sí solo no puede ser usado porque es rápidamente transformado a IMP, la concentración de los intermediarios de esta degradación crecen y caen rápidamente, no siendo útil

para determinar frescura en el pescado, como resultado la atención se ha puesto en la inosina y la hipoxantina que son los metabolitos terminales del ATP.

El valor de la degradación de ATP es expresado en función de un parámetro K, el cual está definido como la suma de las concentraciones de inosina e hipoxantina del total de concentraciones de metabolitos de ATP. El pescado fresco tiene un valor de K bajo, esto sugiere que el valor de K es un indicador viable de la frescura del pescado que puede ser aplicado tanto para pescado congelado, ahumado y bajo atmósferas modificadas. Aunque otros dicen que el valor de K está limitado, ya que depende de diferentes variables como son: la variación entre especies, el tiempo post mortem, la temperatura de almacenamiento, las condiciones de manejo y los métodos de matanza. Debido a esto el gráfico de K vs. tiempo, debe estar determinado por especie y bajo condiciones específicas de manejo y almacenaje⁴⁴.

Mediciones físicas

Los cambios físicos en el pescado son el resultado de la declinación de la frescura y principalmente de la estructura y color. Las mediciones de textura pueden servir para determinar cambios estructurales, para esto utilizamos texturómetros. La textura en el pescado entero es difícil de medir porque carece de una estructura uniforme, por lo que se hace difícil preparar muestras apropiadas, dando como resultado una gran variabilidad y dirigiendo su estudio a diferentes métodos, sin embargo, los resultados obtenidos muestran una buena correlación con resultados de análisis sensorial.

Otra forma para determinar la estructura del pescado fresco es la caracterización microestructural del músculo, se tienen diferentes técnicas: macroscopía (baja magnificación 2-10 veces), microscopía, láser cofocal, escáner de microscopía electrónica⁴⁴.

Dos métodos desarrollados para determinar la concentración de TMA han sido los elaborados por G Sakauntala y M Tridibendra y por el grupo de M Egashira. Estos métodos se basan en un óxido metálico semiconductor y en un sensor de gas. El primer grupo estudió un sistema con una ftalocianina de Manganeso y el segundo grupo lo realizó con TiO₂-Rutenio, llegando

a la conclusión de que la frescura puede ser monitoreada muy rápidamente y con gran sensibilidad usando estos microsensores, además de que es una prueba no destructiva de la muestra de estudio^{45,46}.

Otro de los métodos desarrollados para determinar a la trimetilamina, son los colorimétricos, Carrick M y Stephen J.H. desarrollaron un método para determinar rápidamente a este compuesto, este método está basado en un calix(4)areno que tiene incluido nitrofenilazofenol complejoado con litio. Estos autores hicieron interaccionar algunas aminas volátiles, como la TMA, con este sistema y encontraron que se desarrollaban un cambio de color amarillo a rojo debido a la formación de un complejo de inclusión, este cambio está en función de la concentración de TMA.⁴⁷

Las porfirinas

Las porfirinas son compuestos derivados de la porfina, Figura 2, por la sustitución de alguna o todas las posiciones periféricas. La química de este tipo de compuestos ha sido estudiada extensamente desde el siglo pasado y existen gran número de trabajos acerca de su reactividad, distribución e importancia biológica.

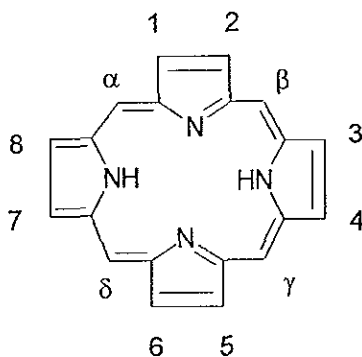


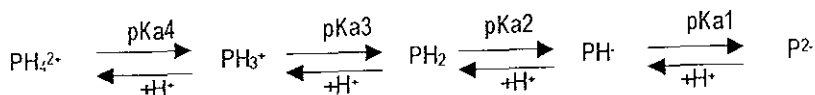
Figura 2. Anillo de la molécula de porfina. Posiciones periféricas sustituibles 1-8 y posiciones interpirrólicas α , β , γ , y δ , llamadas comúnmente *meso*

El macrociclo de la porfina está altamente conjugado y pueden escribirse muchas formas resonantes. Hay 22 electrones π , pero solamente 18 de éstos están incluidos en la deslocalización de acuerdo con la regla de Hückel ($4n+2$) para el criterio de aromaticidad.

Las porfirinas son compuestos altamente coloridos y sus principales bandas de absorción tienen coeficientes de absorptividad muy grandes siendo la banda de Soret, ubicada alrededor de los 400 nm, característica de la conjugación del macrociclo.

Las porfirinas pueden aceptar dos iones hidronio para formar el diácido 2^+ o donar dos protones y convertirse en el anión 2^- . Es de esta manera como las porfirinas forman complejos con iones metálicos generalmente dipositivos tales como: Fe^{2+} o Mg^{2+} los cuales son los sitios activos en muchas metaloenzimas, mismas que pueden coordinar axialmente a los sustratos correspondientes como: H_2O_2 , O_2 , CO , etc.

La porfirina puede verse como un anfótero con dos átomos de nitrógeno capaces de aceptar protones y dos grupos NH susceptibles de perderlos. Formalmente pueden escribirse los siguientes equilibrios para las constantes de acidez de una porfirina sin grupos laterales ionizables.



Las porfirinas que se encuentran en la naturaleza, poseen normalmente cadenas laterales de ácidos carboxílicos. Para estos grupos se ha propuesto una ionización de manera simultánea con los nitrógenos pirrólicos con un aparente incremento en la basicidad de la porfirina. Las cadenas de ácidos carboxílicos comúnmente encontradas en la porfirinas naturales, son los grupos carboximetil y β -carboxietil. A pesar de que no se ha podido determinar directamente la acidez de estos grupos en las porfirinas, algunos cálculos han propuesto que el pK_a para una porfirina monocarboxilada es de 4.8, dicarboxilada ≈ 5.6 , tetracarboxilada ≈ 6.5 y octacarboxilada $\approx 7.3^{48}$.

A partir de los radios de enlace covalente, se puede calcular que un enlace existente entre un átomo de nitrógeno y un átomo de la primera serie de transición debe tener un longitud de aproximadamente 200 pm. El tamaño del "hueco" en el centro del anillo porfirínico es ideal para situar metales de la primera serie de transición. El sistema porfirínico es demasiado rígido y la distancia de enlace metal-nitrógeno no varía de manera considerable es de 193-196 pm en las porfirinas de níquel y 210 pm en las porfirinas de hierro (II) de espín alto. La rigidez del anillo proviene de la deslocalización de los electrones π en los anillos pirrólicos. Sin embargo, si el átomo metálico es demasiado pequeño, como en las metaloporfirinas de níquel, el anillo se encoge para permitir un mayor acercamiento con los átomos de nitrógeno al metal. En el otro caso, si el átomo metálico es demasiado grande, no se puede ajustar dentro del "hueco" y se sitúa por encima del anillo, el cual también adquiere forma de cúpula (domo)⁴⁹.

El orden de estabilidad de los complejos de porfirinas con iones metálicos 2^+ es el que se espera con base en la serie de Irving-Williams, excepto que el ligante cuadrado plano favorece la configuración d^8 del Ni^{2+} . El orden es $\text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ⁴⁹.

También se ha medido la cinética de formación de estas metaloporfirinas y se ha encontrado un orden de $\text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.⁴⁹

La reactividad de las porfirinas es amplia y variada, pueden formar agregados estables con ellas mismas o con otras moléculas, entre ellas también las que tienen un interés biológico mediante interacciones no covalentes y de coordinación de éstas con el metal central. La figura 3 muestra esta reactividad.

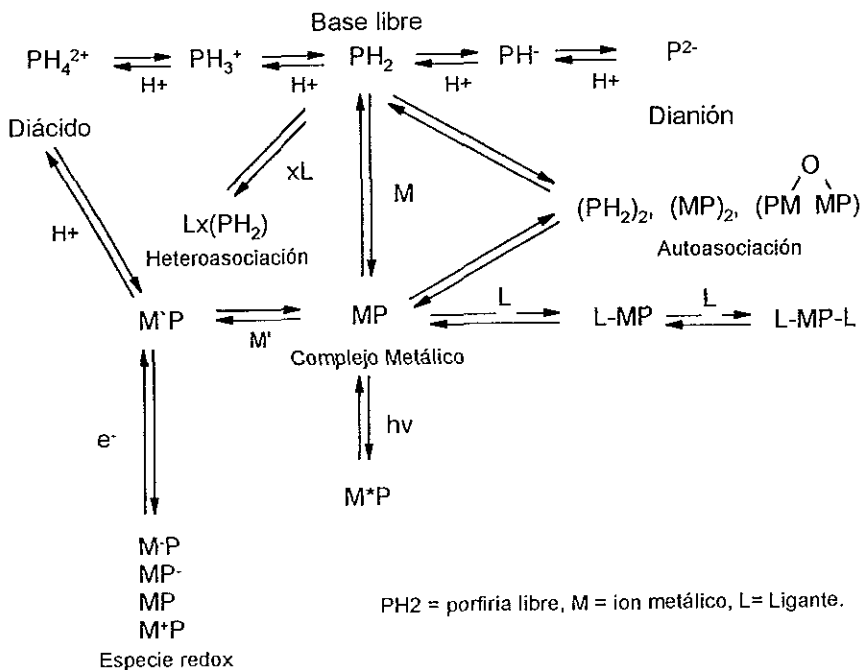


Figura 3. Reactividad de las porfirinas.

El anillo de porfirina o modificaciones del mismo son muy comunes en sistemas biológicos y son claves para muchos procesos en seres vivos, tal es el caso de los pigmentos pirrólicos (porfirinas, clorofilas, vitamina B₁₂, pigmentos biliares, etc). Estos constituyen la materia colorida más

abundante en los sistemas naturales, algunos de ellos se presentan como complejos metálicos, en los sistemas vivos, por ejemplo el grupo hemo (complejo de hierro (II) de la protoporfirina IX) que es el grupo prostético de la hemoglobina y la mioglobina y se encuentra presente en los citocromos y en las enzimas peroxidasa y catalasa. El microambiente de hierro en la mioglobina y en la hemoglobina es similar al que se encuentra en el citocromo C. El grupo hemo se encuentra coordinado al átomo de nitrógeno de un grupo histidina en la cadena proteínica. En un trabajo realizado por Chang y Traylor se mostró la importancia del ligante imidazol en una serie de experimentos con una mioglobina sintética; la presencia del grupo imidazol que es un enlazante π estabiliza hasta cierto punto al grupo hemo⁵⁰.

Quizá la razón de más importancia de los complejos porfirínicos en los sistemas biológicos es que las metaloporfirinas son compuestos biológicamente accesibles, cuyas funciones se pueden alterar mediante un cambio del metal, su estado de oxidación o por la naturaleza de los sustituyentes orgánicos en la estructura porfirínica. Adicionalmente al efectuarse modificaciones en las estructuras dan como resultado cambio en las propiedades y éstos son las que persisten a través de los procesos evolutivos.

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

- Autoasociación.- Es el proceso mediante el cual las moléculas de porfirinas o metaloporfirinas interaccionan consigo mismas para formar agregados diméricos, triméricos y polímeros de orden superior.
- Heteroasociación.- Es el proceso mediante el cual las moléculas de porfirinas o metaloporfirinas interaccionan con un huésped, u otras sustancias presentes en el medio.

La autoasociación de las porfirinas y de las metaloporfirinas es un fenómeno que se conoce desde hace tiempo. Se ha detectado principalmente por métodos espectroscópicos (UV-visible, fluorescencia, RMN, Raman). Como es de esperarse el espectro electrónico en la región ultravioleta visible, presenta dependencia de la concentración de la porfirina, sin embargo la observación de la batocromicidad en el espectro se ha tomado como evidencia de la especie asociada y en muchos

casos ésta se promueve por la presencia de sales en medios acuosos. Las porfirinas tienen la ventaja de ser evaluadas por la observación de los cambios espectrales en la banda de Soret ($\epsilon = 5 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), lo que permite detectarlas en concentraciones muy pequeñas.

Las propiedades de las porfirinas solubles en agua que tienen sustituyentes meso, tienen una fuerte dependencia de la carga de la porfirina y del medio (fuerza iónica, pH y disolvente). Las porfirinas que tienen carga negativa en la periferia como la TCPP, son consideradas más básicas y con una tendencia mayor a la autoasociación (Tabla 2). Esta tendencia no se había observado en porfirinas cargadas positivamente como TMPyP (tetrakis(N-metil-2-piridinio)porfirina) hasta que se observó en porfirinas con grupos amonio o aminas terciarias con carga positiva que tienden a la autoasociación en medio acuoso⁵¹⁻⁵³.

Porfirinas	K(M ⁻¹)	Medio
TPPS ₃	4.82×10^4	H ₂ O, 0.1M KNO ₃ , pH = 7.5, (TRIS) 25°C
TPPS ₄	9.6×10^4	H ₂ O, 20°C
NiTCPP	1.6×10^5	H ₂ O, 0.1M KNO ₃ , pH = 7.5, (TRIS) 25°C

Tabla 2. Constantes de dimerización para algunas porfirinas

El proceso de heteroasociación, que se presenta cuando la porfirina interactúa con especies diferentes a ella (ligantes), es por mucho el más estudiado. La gran mayoría de las investigaciones se han realizado con porfirinas sintéticas sustituidas en la posición meso y con dímeros unidos covalentemente. El tipo de ligante estudiado ha sido muy diverso: ciclodextrinas, quinonas, aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos, DNA, moléculas aromáticas con sustituyentes con carga y aminas.

Se han hecho estudios de la heteroasociación de porfirinas con diferente carga o diferente centro metálico, tabla-3. El valor de la constante para la heteroasociación es mucho mayor que para la autoasociación ya que principalmente se trata de interacciones ión-ión⁵⁴.

Porfirinas	K(M ⁻¹)	Medio
TPPPS ₄ -TTAP	9 x 10 ⁷	H ₂ O-Acetona (1:1) 25°C
CuTTAP-ZnTPPS ₄	1.37 x 10 ⁷	H ₂ O-Acetona (1:1) 25°C
ZnTCCP-ZnTMPyP	6.2 x 10 ⁶	H ₂ O-Metanol (4:1) 25°C

Tabla 3 Constantes de formación entre algunas porfirinas.

Interacción histamina –compuestos metálicos.

Porfirinas

Las porfirinas y las interacciones no covalentes como se vio anteriormente tienen un interés muy importante en sistemas biológicos, además, éstas pueden actuar como compuestos anfitriones, constituyendo una molécula nueva con una función de sensor óptico en base a los cambios registrados en la bandas de Soret. La porfirina puede ser sensible para unirse a varios ligantes, de acuerdo a su estructura en forma más selectiva con uno que con otros.

Un estudio realizado por Pasternack y colaboradores, se determinaron las propiedades en disolución de los derivados de Ni²⁺, Cu²⁺, y Zn²⁺ de la tetracarboxifenilporfirina (TCPP) y la tetra(*N*-metilpiridil)porfirina (TMPyP). En condiciones de $\mu = 0.1M$ y 25°C. estas metaloporfirinas no muestran una tendencia a la agregación, sin embargo, en estas condiciones los complejos porfirínicos de Ni²⁺ y Cu²⁺ se dimerizan con las siguientes constantes de equilibrio 1.57 x 10⁵ y 1.69 x 10⁵ M⁻¹, respectivamente⁵³.

Pasternack y Gaudemer, estudiaron la interacción de algunas metaloporfirinas de Zinc solubles en agua con los siguientes aminoácidos: Glicina, Leucina, Glutamina, Arginina, Fenilalanina, Triptofano. Las constantes de equilibrio determinadas fueron relacionadas con el reemplazo de agua como ligante axial de la tetrakis(4-*N*-metilpiridil)porfirina de Zinc (II) por los aminoácidos en un pH de 9; éstas se determinaron espectrofotométricamente. La constante de equilibrio fue determinada para la glicina como función de pH. De estos estudios de pH se determinó

que la sustitución de glicina por OH⁻ en el zinc es termodinámicamente poco favorable. Además se observó que a la estabilización también contribuyen las uniones intramoleculares no covalentes entre varios sitios de los aminoácidos y el macrociclo de la metaloporfirina⁵⁵.

Schneider y Wang estudiaron la energía de asociación de las porfirinas meso sustituidas 4-piridina, 4-anilina y 4 benzoato (TPPyP, TPA, TCP) evaluadas en agua con 23 diferentes ligandos, entre ellos la putrecina. La porfirina ocupada para evaluar a esta amina fue la 5,10,15,20-tetra-piridilporfirina (TCP) y determinaron la constante de unión, energía libre de unión; cambios en la banda de Soret en complejos dímeros de porfirina que contengan Zn y la distancia entre nitrógenos. Los valores determinados fueron: $56.68 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, 27.1 KJ/mol en CDCl_3 y 25°C, 4 nm y 6.24 Å respectivamente. Las titulaciones UV muestran muy buena correlación con los valores de las constantes evaluados a diferentes longitudes de onda (usualmente $\pm 10\%$). Lo que puede indicar una unión 1:1⁵⁶.

Otras de las moléculas de interés para encontrar receptores específicos para las aminas son los péptidos. Schneider y Sirish estudiaron el comportamiento de los derivados de porfirinas con sustituyentes de éteres corona solubles en agua. Éstos describen una afinidad por péptidos no protegidos, con una magnitud desconocida en disoluciones acuosas hasta el momento. La señal óptica que da la porfirina hace que sea considerada como un sensor. Además, puede ser la base para un nuevo sistema catalítico como la oxidación catalítica de los péptidos. En este trabajo hicieron titulaciones espectrofotométricas usando la porfirina comercial 5,10,15,20-tetrakis 4-metilpiridina como base, haciendo estos experimentos con los derivados de esta porfirina con 4 sustituyentes periféricos de 4-piridinio(1), y algunos aminoácidos y péptidos protegidos N-benzyloxycarbonil. Con estos experimentos, estos autores encontraron que los péptidos y aminoácidos no protegidos no presentaban unión ya que adicionando N-benzyloxycarbonil resulta en una mayor reducción de la banda de Soret. El cambio en el valor de absorbancia es de 0.2 a 0.4 y el de la longitud de onda es de 5 a 10 nm. También, por un ajuste no lineal de los valores de absorbancia obtenidos entre 400 y 430 nm se mostró un ajuste adecuado de los datos a un modelo 1:1. Un comportamiento similar obtuvieron con el derivado de porfirina con 3 grupos 4-piridinio y 1 grupo metilbenzoato(2). Éste resultó ser mejor que un tercer y cuarto derivado con uno y dos grupos 4-piridinio respectivamente, éstos fueron sintetizados de manera análoga y se esperaba que

podieran desplazar la carga y tuviera un mayor grado de selectividad, pero a pesar de que se hicieron experimentos de dilución, éstos mostraban cierto grado de agregación en agua, y por esto ya no fueron adecuados para estudios de asociación. Schneider observó que en un medio acuoso los derivados 1 y 2 presentaban una gran afinidad por los aminoácidos, pero que los péptidos no protegidos no mostraban unión. La carga positiva del péptido del R-NH₃⁺ terminal desestabilizaba el complejo con estos derivados, por lo que esto sugirió la introducción de otro tipo de sustituyente al anillo porfirínico, esta adición fue una unidad de éter corona. Las titulaciones con UV mostraron que este derivado mostraba constantes de asociación de los péptidos no protegidos mayores que las observadas con los péptidos protegidos con los derivados 1 y 2, se determinó que el modelo para este derivado era también 1:1⁶⁷.

Mizutani, Wada y Kitagawa estudiaron una serie de receptores de porfirina solubles en agua que contienen sitios de unión hidrofóbica, un sitio de ácido de Lewis (Zinc) y sitios de reconocimiento electrostático (grupos COO⁻). Todos los receptores estudiados tienen como estructura común a la porfirina [meso-tetrakis (p-carboxifenil)porfirinato] Zinc (Zn.TCPP) y los grupos *m*-carboxialcoxidos 1 =metoxi, 2= butoxi, 3 = deciloxi en las posiciones orto de los grupos fenilo. Estos receptores se unen a aminas, α -aminoácidos-ésteres y oligopeptidos en agua con una selectividad significativa. La adición del huésped causa un cambio al rojo en la banda de Soret, el espectro típico cambia debido a la coordinación del grupo amino con el Zinc, la constante de unión fue determinada por monitoreo de los cambios de absorbancia en la banda de Soret en función de la concentración de huésped.

La unión de los huéspedes hidrófilicos con los receptores metoxi, butoxi y deciloxi mostraban una fuerte unión con los amino ésteres catiónicos (Lys-OME y Arg-OME) e histamina en agua (Bórax, pH=9, I = 0.1M) La constante de asociación de la histamina con el derivado metoxi es notoria, ésta gran afinidad puede deberse a que la coordinación entre el zinc y el grupo imidazol es adecuada, además existe la interacción electrostática entre los grupos carboxilato del derivado metoxi y el grupo amonio de la histamina. Las siguientes observaciones revelan la importancia de las interacciones electrostáticas en la asociación: 1) la constante de asociación de la histamina es mucho más grande que la del imidazol y 2) la constante de asociación de la histamina a pH = 9 se incrementa cuando la fuerza iónica es reducida de 0.1 M a 0.01M y también se incrementa cuando variamos el pH de 9 a 8. Debido a que los pKa de la histamina son de 6.1 para el grupo imidazol y

9.9 para el grupo amino, la histamina con un pH de 8 presenta en mayor proporción la especie con el grupo NH_2 protonado, el cual es mucho más afín al derivado metoxi que la histamina en forma neutra.

Los receptores con sustituyentes metoxi, butoxi y deciloxi; se unen con la histamina a $\text{pH}=8$ a 25°C con unas constantes de unión de 1.57×10^5 , 3.1×10^4 y $1.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivamente, donde la coordinación (Imd-Zn) y el puente salino (NH_3^+-OOC) estabiliza el complejo. La gran dependencia de la constante de unión con la fuerza iónica indica que la interacción electrostática entre los grupos amonio de la histamina y los grupos carboxilato del receptor contribuyen significativamente para una unión estrecha en agua.

Los valores de cambio de entalpía y cambios de entropía de la complejación son bajos en magnitud en comparación con los reportados para la asociación de aminas o α -amino ester de metaloporfirinas de zinc en disolventes orgánicos. Típicamente, los intervalos de ΔH° son de -30 a -100 kJ/mol y ΔS° de -30 a -220 J/(K mol) en disolventes orgánicos. Los valores bajos de ΔH° y ΔS° reportados en agua son atribuibles a los efectos de compensación de entalpía-entropía, los cuales son parcialmente por causa del proceso de solvatación-desolvatación⁵⁸.

Algunos trabajos relevantes acerca de sistemas para detección de aminas han sido hechos con porfirinas unidas a algunas matrices de alta porosidad, tal es el caso del trabajo publicado por Delmarre D. y Bied-Charreton C, en el cual inmovilizan tetrafenilporfirina de cobalto y tetrametilpiridinio porfirina de cobalto en materiales sol-gel encontrando que el espectro del material sol-gel con porfirina unida covalentemente tiene diferentes propiedades espectroscópicas cuando la piridina difunde a través de este material⁵⁹.

Otros sistemas.

Como se había mencionado, el interés por el estudio de los sistemas huésped-anfitrión no se limita solo a las porfirinas y metaloporfirinas, si no que también se han hecho estudios de otras

moléculas más que pueden funcionar como receptores solubles en agua. En base a esto cabe destacar el trabajo desarrollado por Nelen M.I y Eliseev, A.V, en el cual estudiaron el reconocimiento molecular de metilguanidina, tetrametilamonio y sales de amonio en disolventes próticos (D_2O , metanol y etanol) con 2 receptores dianiónicos base variando entre ellos la configuración cis (c) y trans (t) Fig 4, teniendo en total 6 derivados con las siguientes configuraciones: 1tt,1ct,1cc,2tt,2ct,2cc. Los resultados a que llegaron fue que entre más distancia había entre los grupos carboxilato en el receptor, la estabilidad se reduce, el complejo que se forma es un 1:1⁶⁰.

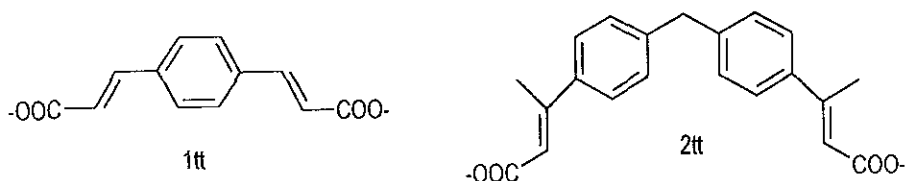


Figura N° 4. Estructuras rígidas de los receptores dianiónicos, configuración trans-trans.

Lehn y Vierling hicieron un estudio comparativo de los complejos $[18]-N_3O_3$ para determinar la selectividad de esta molécula receptora para cationes amonio primarios encontrando una alta selectividad y gran afinidad. Ésta se debe a la presencia de 3 sitios simétricos con nitrógeno. El grupo $R-NH_3^+$ se une dentro de la cavidad circular del macrociclo vía 3 enlaces de hidrógeno $^+NH \cdots H$ completado con 6 interacciones electrostáticas entre los sitios de oxígeno y los hidrógenos de $-NH_3^+$ Representado en la figura 5⁶¹.

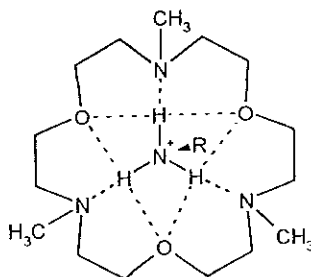


Figura 5 .- Éter corona $[18] - N_3O_3$

Hossain y Schneider diseñaron un receptor para reconocer selectivamente a péptidos en agua, esta molécula contiene un éter corona terminal y unidades amonio, es preparado a partir de 4-formil-benzo-18-corona-6 con 4-(dimetilamino)-anilina. Este compuesto es soluble en agua y en menor grado en una mezcla agua-metanol. En un programa de modelaje molecular usando la mínima energía establecieron que la unión entre el anfitrión y el tripéptido (huésped) está libre de esfuerzo entre la corona y el R^+NH_3 . Mediante RMN determinaron que el modelo de ajuste más adecuado era una unión 1:1, determinando que las constantes de unión en medio acuoso eran del orden de $100 M^{-1}$, mientras que en metanol las constantes son mayores, alrededor de $10^4 M^{-1}$, demostrando que esta molécula tiene mayor selectividad en un medio menos polar⁶².

Entre otros trabajos, uno de los más importante es el desarrollado por Inoue, M.B., Machi, L. y Quintus, F. donde coordinan la histamina e imidazoles con compuestos de coordinación con macrociclos con Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} que fueron estudiados por 1H -RMN y espectroscopia electrónica, la molécula ligante estudiada fue la 2,9 dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclododecano diácido acético, $(12edtaen)H_2$ y 2,9 dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclotridecano diácido acético $(13edtapn)H_2$ La molécula de histamina o imidazol sustituye a la molécula de agua en $[M(12edtaen)H_2(H_2O)]^0$ y $[M(13edtapn)H_2(H_2O)]^{063}$.

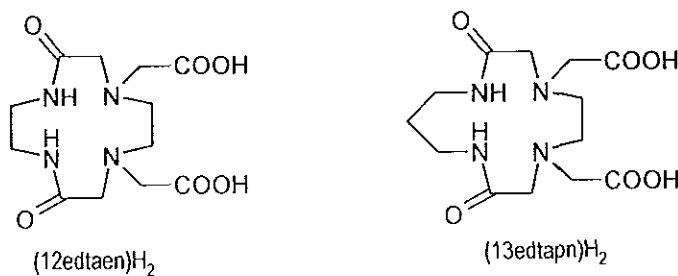


Figura Nº 6 Moléculas receptoras del trabajo de Inoue y colaboradores.

Las constantes de formación de $[ZnL(hsH^+)]^+$ (hsH^+ : ión histaminio) son del mismo orden de magnitud como el correspondiente $[CdL(hsH^+)]^+$, sin embargo, la donación de electrón de hsH^+ en el complejo de Zn^{2+} es significativamente menor que en el complejo de Cd^{2+} . El quelato de Cu^{2+} con el macrociclo de 13 miembros forma $[Cu(13edtapnH_2)]^{2-}$ en el cual los átomos de nitrógeno desprotonados de la amida se coordinan. En la reacción entre quelato metálico y hsH^+ , uno de los

sitos vacío de coordinación del quelato de Cu^{2+} es ocupado por la molécula de hsH^+ y se forma $[\text{Cu}(\text{13edtapnH}_2)(\text{hsH}^+)]$. Como la reacción de complejación no ocurre con imidazol, la complejación de hsH^+ ocurre con dos sitios de unión de cada componente.

Inoue, M.B., Quintus F. y Navarro, R.E. realizaron un trabajo similar al anterior, donde hacen un estudio espectrofotométrico y potenciométrico de la reacción de histidina con un macrociclo de base amida unido con Cu^{2+} . El macrociclo es el 2,9-dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclotridecano ácido acético (abreviado como LH_2), forma con la histidina aductos en el cual la molécula de histidina ocupa un sitio secundario de coordinación del macrociclo- Cu^{2+} . La formación de ese compuesto se pone de manifiesto por el cambio de la banda d-d del macrociclo en presencia de histidina a diferentes valores de pH. La composición de las especies fue determinada por titulaciones potenciométricas y la formación de constantes se obtuvo como: $\log[\text{CuL}(\text{hdH})]/[\text{CuL}][\text{hdH}] = 2.8(0.2)$ y $\log[\text{Cu}(\text{LH}_2)(\text{hdH})]/[\text{Cu}(\text{LH}_2)][\text{hdH}] = 2.6(0.4)$ (hd =ion histidinato (-1); $\text{LH}_2 = \text{L}$ con los átomos del nitrógeno de la amida desprotonados). Estos aductos se forman por la coordinación del átomo de nitrógeno del anillo imidazol al ion del metal central⁶⁴.

Materazzi, et al. realizaron un estudio de varios complejos de metales de transición de la forma MeHm_x , (donde Hm = histamina; $x = 1,2$) y $\text{MeHm}_x(\text{NO}_3)_2$ ($x = 2,4$). Los metales utilizados fueron los siguientes: Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} . Por medio de análisis de TG-FTIR acoplado, los pasos intermedios y los productos de la descomposición fueron analizados. Los resultados de análisis de ESCA para todos los compuestos de Ni^{2+} indicaban radios atómicos correctos entre nitrógenos orgánicos e inorgánicos y pudieron ser utilizados para determinar la forma de coordinación del metal⁶⁵.

Otro receptor estudiado es el propuesto por Chen, H., Ogo S., y Fish R.H., en cuyo trabajo se aplican las interacciones no covalentes para el reconocimiento molecular de aminoácidos aromáticos y alifáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y ácidos carboxílicos alifáticos, en medio acuoso, ocupando como receptor al $(\eta^5\text{-Pentametilciclopentadienil})\text{rodio-nucleobase}$. Se encontró que este receptor efectivamente reconoce y se une a un gran número de los huéspedes estudiados por procesos no covalentes, pero esta unión está influida por otros parámetros como son el impedimento estérico, efectos conformacionales y efectos de solvatación del agua⁶⁶.

Por otro lado el trabajo realizado por Inouye y colaboradores estudió una nueva clase de ciclofano, el pirenopano, que es soluble en agua y tiene la capacidad de acompañarse y formar una cavidad neutral. Esta área hidrofóbica se construye por dos anillos aromáticos alineados en forma paralela; la cavidad tiene las siguientes medidas: profundidad, 0.95 nm; anchura, 1.31 nm y longitud de 0.46 nm. La experimentación entre este receptor y compuestos aromáticos, catiónicos y aniónicos, por medio de espectros de UV determinaron que había cierta afinidad entre ellos, concluyendo que estas interacciones eran gobernadas por interacciones no covalentes⁶⁷.

Otro de los sistemas utilizados en el reconocimiento molecular y que sin lugar a dudas ha sido de los más estudiados son las ciclodextrinas. Tabushi, en 1977, describe la habilidad de los complejos metálicos y estudia el complejo metálico de 6-deoxi-6-dietiltri- β -ciclodextrina con Zn^{2+} como receptor. El Zn^{2+} se une con algunos aniones carboxilato con altas constantes de unión y gran selectividad con respecto a la 6-deoxi-6-dietiltri- β -ciclodextrina sin metal.⁶⁸

Planteamiento del problema.

La histamina es una sustancia que tiene gran repercusión en la salud por el consumo de alimentos, principalmente pescado que no tiene una óptima calidad sanitaria. Por otro lado se ha visto el interés generado por estudiar sistemas receptores con el fin de conocerlos y así generar nuevos y mejores receptores, es decir, muy selectivos y con alta fuerza de unión con alguna molécula en particular. En el caso de la histamina, las porfirinas metálicas sustituidas pueden ser buenos candidatos a ser receptores específicos para esta sustancia.

En base a lo comentado anteriormente y con el fin de encontrar un sistema con alta selectividad con metaloporfirinas para reconocer específicamente a la histamina, variando tanto el metal central como los sustituyentes periféricos de las porfirina, en este trabajo se experimentaron como receptor para la histamina las siguientes porfirinas: coproporfirina I, (21H,23H-Porfirina-2,7,12,17-tetraácido propanoico - 3,8,13,18-tetrametil); (5,10,15,20-Tetrakis(4-trimetilamonio) fenil)-21H,23H porfirina tetra-p-tosilato, 4,4',4'',4''' - (21H,23H-Porfirina 5,10,15,20-tetrayl)tetrakis- (ácido benzoico). A cada una se le coordinaron dos metales formando las metaloporfirinas de zinc y cobre. La histamina, además de tener la posibilidad de coordinarse al metal, puede interactuar con grupos sustituidos de cada porfirina para estabilizar más el complejo porfirina-metálica-histamina a través de interacciones tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones de apilamiento π , Van der Waals, etc.

En base a esto se plantean los siguientes objetivos.

Objetivos.

Objetivo General.

- Estudiar sistemas capaces de interaccionar con la histamina con alta selectividad y determinar el efecto de la carga de la porfirina sobre la selectividad de la unión.

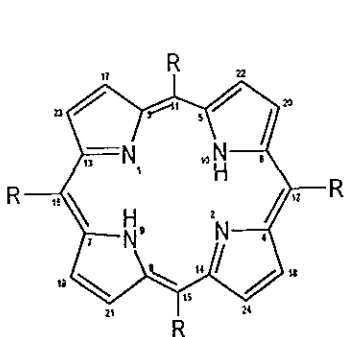
Objetivos particulares.

- Preparar los complejos de coordinación entre Cu^{2+} y Zn^{2+} y las porfirinas: Coproporfirina I, (21H,23H-Porfirina-2,7,12,17-tetraácido propanoico - 3,8,13,18-tetrametil); (5,10,15,20-Tetrakis(4-trimetilamonio) fenil)-21H,23H porfirina tetra-p-tosilato, 4,4',4'',4'''- (21H,23H-Porfirina 5,10,15,20-tetra) tetrakis- (ácido benzoico)
- Determinar las constantes de estabilidad entre las diferentes porfirinas metálicas sustituidas y la histamina.
- Determinar los cambios en la selectividad y fuerza de unión entre los derivados con la histamina en función de su naturaleza aniónica o catiónica.
- Determinar algunos parámetros termodinámicos (K_{eq} , ΔH y ΔS) entre porfirinas metálicas sustituidas e histamina.
- Determinar la estructura más probable del complejo porfirina-metal-histamina más estable.
- Determinar cual de los sistemas estudiados es el mejor receptor para la histamina.

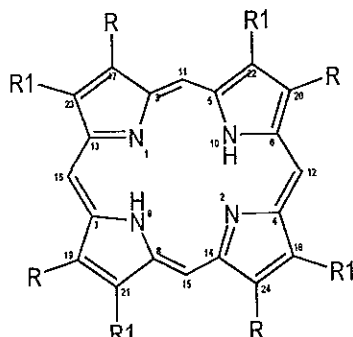
Metodología experimental

Reactivos.

La Coproporfirina I, (21H,23H-Porfirina-2,7,12,17-tetraácido propanoico - 3,8,13,18-tetrametil); (5,10,15,20-Tetrakis(4-trimetilamonio) fenil)-21H,23H porfirina tetra-*p*-tosilato, 4,4',4'',4'''- (21H,23H-Porfirina 5,10,15,20-tetra)l)tetrakis- (ácido benzoico) Figura N°7.

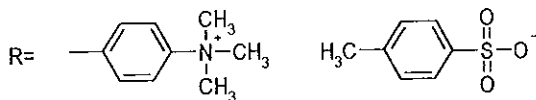


Anillo base para porfirina benzoica y tosionato

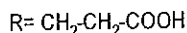


Anillo base para coproporfirina.

5,10,15,20-Tetrakis(4-trimetilamonio)fenil-21H,23Hporfirina tetra-*p*-tosilato



Coproporfirina I dihidroclorhidrato



4,4',4'',4'''- (21H,23H-Porfirina-5,10,15,20 tetra)l)tetrakis (ácido benzoico)

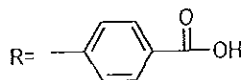


Figura 7 - Anillos base de las porfirinas utilizadas con los sustituyentes de las 3 porfirinas.

Estas porfirinas fueron obtenidas comercialmente de *Aldrich* y se utilizaron sin purificación posterior

La histamina se obtuvo comercialmente de *Fluka*, en forma base y se utilizó sin purificación posterior.

Las sales de $ZnCl_2$ (*Baker*) y $CuCl_2$, (*Baker*) Tris (*Aldrich*) y NaCl (*Mallinckrodt*), se obtuvieron comercialmente y estas fueron grado RA, se utilizaron sin purificación posterior.

Amortiguador.

Todas las disoluciones preparadas fueron hechas con amortiguador de Tris 0.1M y NaCl 0.1 a pH 9, realizadas con agua nanopura purificada con el equipo *Milli-Q Water Reagent System*.

pH.

En todas las disoluciones estudiadas se usó un amortiguador en el que se ajustó el pH con HCl 6M. El pH se determinó con un pH-metro *Orion* modelo 710-A con una precisión de ± 0.005 unidades de pH y electrodos de vidrio combinado y semimicro de la marca ROSS®

Estudios por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV – visible.

Se utilizó un espectrofotómetro *Ocean optics*, modelo PC2000, con una ventana espectral de 200nm a 850nm y una resolución de 0.36nm acoplado con un baño con un intervalo de (15°C – 60°C). y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los estudios que se realizaron en un inicio fueron determinar la concentración de porfirina a utilizar, para lo cual se tomaron en cuenta varias condiciones: tenía que ser una concentración de porfirinas que al medir su absorbancia, ésta cumpliera la ley de Beer. Además se buscó que todas las concentraciones sean iguales para que el estudio sea comparativo entre los 6 derivados en su capacidad de selectividad y fuerza de unión a la histamina. Por otro lado, hemos visto que las

porfirinas tienden a una autoasociación, para no favorecer ésta y cumplir con las demás condiciones la concentración elegida fue de $8.2 \times 10^{-7} \text{M}$.

Paso seguido se estudió la metalación de la porfirina en estudio, que aunque no es el objetivo de este trabajo era necesario conocer cuánto tiempo llevaría tener el complejo formado para lo cual se ocupó una relación molar 1:10 entre la porfirina y el metal, con una concentración final de porfirina de $8.2 \times 10^{-7} \text{M}$ y $8.2 \times 10^{-6} \text{M}$ para el metal. Posteriormente se realizó la cinética de metalación de la reacción siguiente, figura 8:

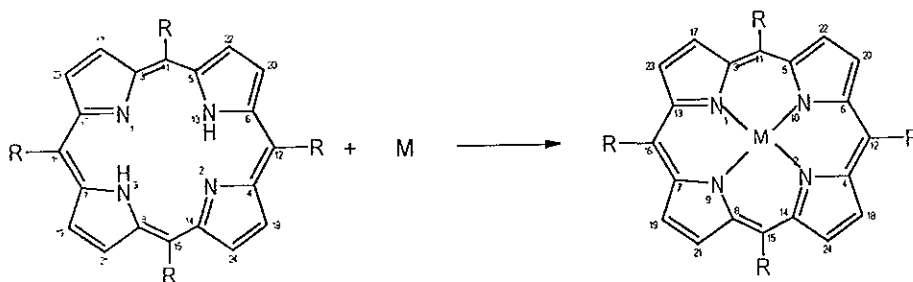
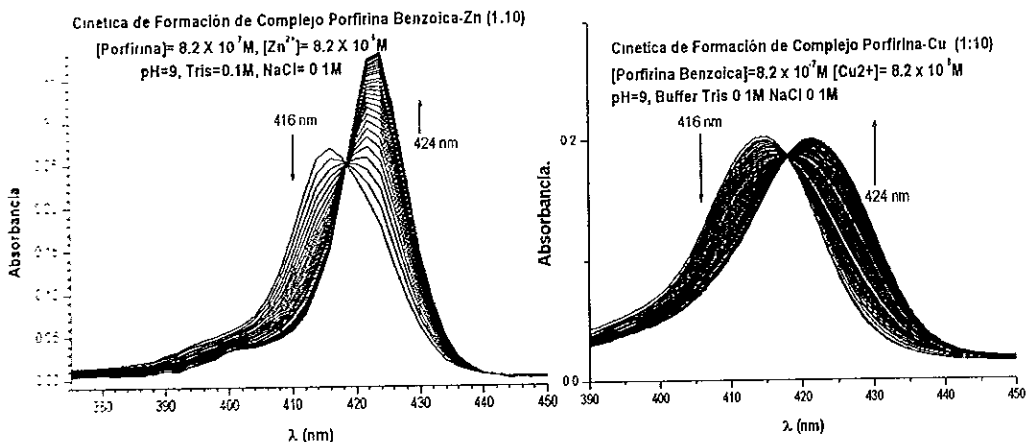


Figura N° 8.-Reacción de metalación para la porfirina de tosilato y benzóica.

Posteriormente se preparó una disolución stock de complejo de concentración $2.05 \times 10^{-6} \text{M}$ la cual se prepara a partir de disoluciones stock de porfirina y metal de concentración $5 \times 10^{-3} \text{M}$ cada una, mediante las diluciones adecuadas. La disolución stock de porfirina se preparó pesando la cantidad necesaria de porfirina, disolviéndola en amortiguador pH = 9 agregando amortiguador suficiente hasta el aforo. Para las disoluciones stock de los metales se disolvió CuCl_2 y ZnCl_2 en agua desionizada. Por medio de estudios cinéticos se determinó el tiempo que es necesario para que la reacción de metalación de la porfirina se complete y este resultado ser de 13 horas, este tiempo corresponde al derivado de porfirina benzóica con Cu^{2+} , siendo este el complejo más lento de toda la serie estudiada, el cuál nos dio la pauta de que al menos se debe de esperar 13 horas para tener los complejos formados en disolución por lo cual para asegurar la completa complejación en todos los casos, se dejó por un tiempo de 48 horas a temperatura constante de 25°C , protegidas de la luz solar

Pasado el tiempo de formación del complejo, se preparan 7 disoluciones a partir de la disolución stock de complejo formado tomando 800 μL . A cada una de estas disoluciones se varió el volumen de una disolución stock de histamina con una concentración de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ entre 0 μL – 1200 μL y complementamos con amortiguador para tener un volumen total de cada disolución de 2 mL para que finalmente tengamos una concentración constante de complejo de $8.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ y un intervalo de concentración de histamina entre 0 M – $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, dando un intervalo de relación entre el complejo y la histamina de 1 : 0-219 veces, estas disoluciones son agitadas con un vortex a mediana velocidad durante 0.5 minutos para cada tubo. Para la formación completa del complejo se dejan 24 horas a temperatura de 25°C, protegidas de la luz, después de este tiempo las disoluciones son estudiadas a 5 temperaturas: 20°C, 22.5°C, 25°C, 27.5°C, 30°C. Para un solo sistema se realizan todas las evaluaciones de todas las temperaturas, el orden que se practicó para determinar con que temperatura iniciamos es aleatorio. Para empezar a tomar lecturas de las disoluciones las dejamos 20 minutos a la temperatura a ensayar, estas temperaturas las tomamos con un termómetro marca digi-thermo, con un intervalo de -55°C a $148^{\circ}\text{C} \pm 0.05$ unidades de $^{\circ}\text{C}$. Después de este tiempo empezamos a tomar lecturas de las muestras en la longitud de onda máxima del sistema.

Análisis de Resultados.

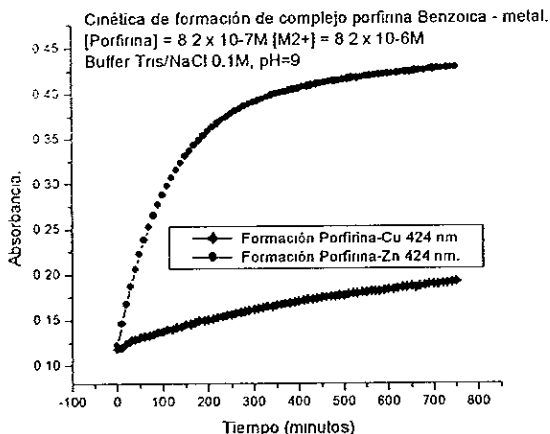


Gráfica N° 1.-Cinética de metalación de los derivados de Cu²⁺ y Zn²⁺ porfirina benzoica

Después de la elección de la concentración de porfirina a utilizar, 8.2×10^{-7} M, se sintetizaron las porfirinas metálicas de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Un paso importante en la síntesis de estos compuestos es determinar la cinética de metalación ya que es indispensable tener al sistema porfirina-metal, en equilibrio antes de realizar la interacción con histamina. Por esta razón se hicieron los estudios del tiempo de metalación de las porfirinas. Con este fin se realizaron cinéticas de metalación en condiciones de pseudo-primer orden para las 3 porfirinas con cobre y zinc, realizadas bajo las mismas condiciones de experimentación (pH, fuerza iónica, concentración de porfirina). En todos los espectros realizados de los 6 derivados se presenta un cambio del espectro de la porfirina original con respecto al tiempo. En todos los casos se observa un corrimiento de la longitud de onda hacia el rojo de 8 a 10 nm y una reducción de la banda de la porfirina y un aumento gradual en la señal de la metaloporfirina.

Para los derivados de coproporfirina y la porfirina benzoica, los espectros obtenidos en la cinética, nos muestran que evidentemente hay un cambio en el espectro original y esto se asocia a la metalación de la porfirina, además se puede sugerir que en estas condiciones hay al menos dos

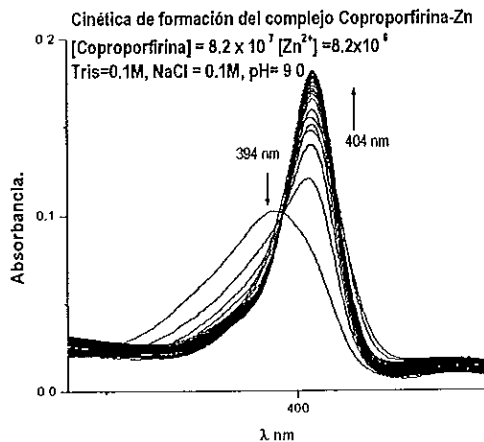
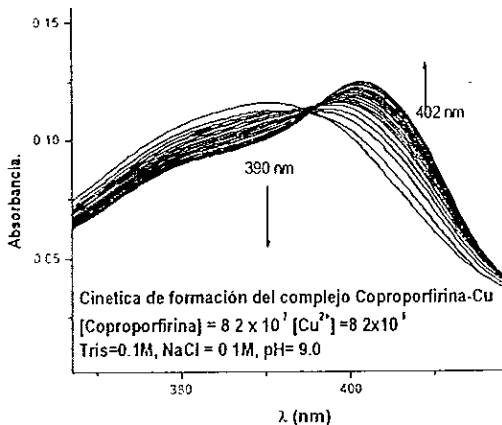
especies la porfirina y la metaloporfirina, esto basado en que sólo se tiene un punto isobestico, lo que se asocia un comportamiento 1:1.



Gráfica N°2 Comportamiento de los derivados porfirina benzóica derivado de cobre a este mismo tiempo aún no llega al equilibrio Gráficas N° 1 y 2

Por otro lado, los derivados de coproporfirina son los sistemas que más rápidamente llegan al equilibrio ya que precisan de 2 horas en el caso del zinc y 5 horas para el caso del cobre para formarse Grafica N° 3 y 4

En el caso del derivado de zinc de porfirina benzóica, ésta requiere de 12.5 horas, para su formación mientras que para el

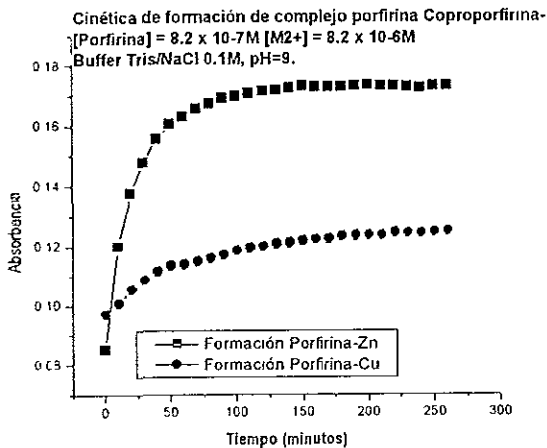


Gráfica N° 3 -Cinética de metalación de los derivados de Cu²⁺ y Zn²⁺ coproporfirina

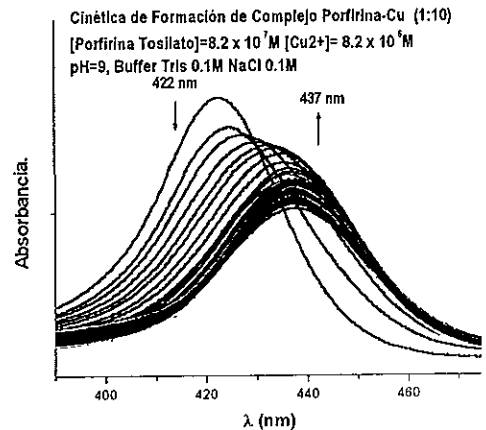
Sin embargo, aunque la porfirinas anteriores muestran una tendencia relativamente simple, la porfirina catiónica tiene un comportamiento distinto, con esta metaloporfirina se puede suponer un sistema más complejo cuya cinética se completa aproximadamente en 6.5 horas para el caso del zinc y de 6.6 horas para el caso del cobre Gráfica N° 5, 6 y 7

En resumen, se encontró que todos los sistemas llegan al equilibrio cinético después de 15 horas de reacción, por lo que en la preparación de las porfirinas metálicas siempre se dejaron reaccionar 48 horas para asegurar que se había alcanzado el equilibrio.

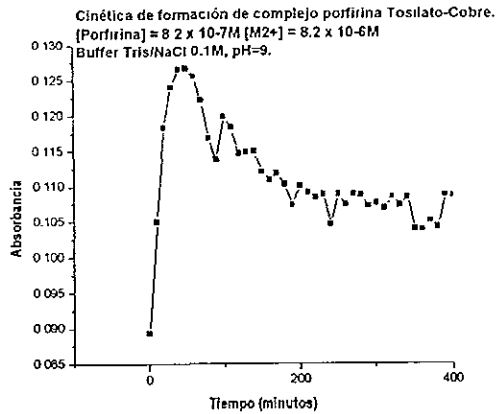
El perfil cinético de todos estos sistemas sugiere que se trata de procesos complejos, es decir, cinéticas con uno o más pasos de reacción, por lo que su cinética no se estudió a fondo debido a que no es objetivo de este trabajo.



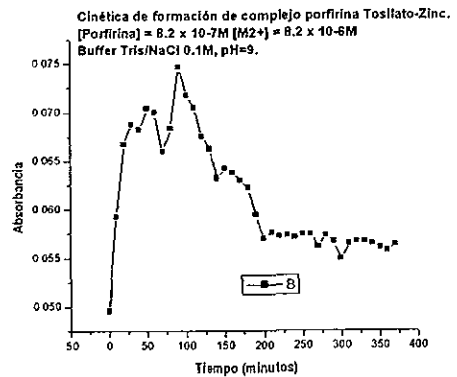
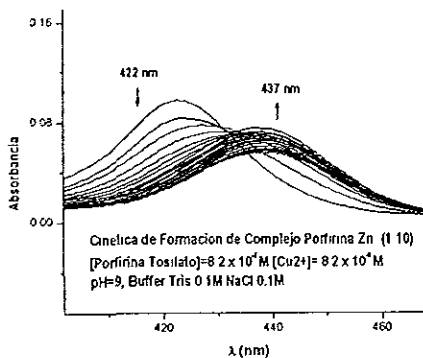
Gráfica N° 4 Comportamiento cinético derivados de Coproporfirina I



Gráfica N° 5 Cinética de metalación de Tosilato-Cu



Gráfica N°6. Comportamiento cinético del derivado de tosilato-Cu.



Gráfica N° 7 Cinética de metalación de Tosilato-Zn con su comportamiento a 437 nm .

Reacciones de complejación de histamina con metaloporfirinas

Los 6 derivados, que se estudiaron en este trabajo, son metaloporfirinas que son solubles en agua, a pH de 9 y a la concentración de $8.2 \times 10^{-7} M$, la tendencia a la autoasociación no es evidente. Estas porfirinas se encuentran totalmente desprotonadas. Los derivados estudiados con los metales cobre y zinc dan las siguientes combinaciones:

Metalsustituyente	Benzoato	Carboxilato	Tosilato.
Zinc (Zn^{2+})	✓	✓	✓
Cobre (Cu^{2+})	✓	✓	✓

Tabla 4. Derivados estudiados en este trabajo.

La histamina es una amina biogénica que cuenta con dos valores de pKa estos son: el del grupo imidazol, 6.1. y el del grupo amino terminal, 9.9 Como se puede ver en la figura 9.

Al pH de 9.0 el grupo imidazol se encuentra desprotonado, lo que nos da la posibilidad de que a ese par de electrones que tiene el nitrógeno pueda coordinarse con el metal central de la metaloporfirina.

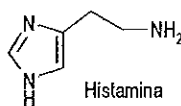


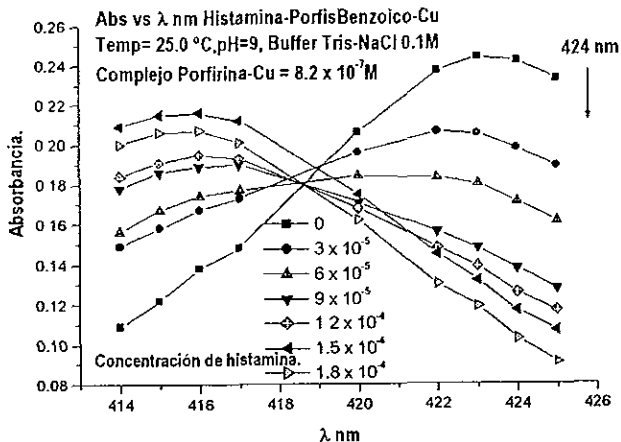
Figura N 9. Histamina

Las metaloporfirinas, son complejos que tienen un número de coordinación 4, pudiendo complejarse y formar un compuesto con un número de coordinación 5 o 6, con una o dos histaminas respectivamente. En base a nuestros resultados se observa que hay interacción entre las metaloporfirinas e histamina, existiendo dos posibles sistemas de complejación entre las 6 metaloporfirinas y la histamina, así pueden presentarse los equilibrios 1:1 o 1:1:2.

Asociación con histamina.

Los espectros de absorción electrónica en la región UV-visible de nuestros derivados muestran la banda característica de las porfirinas, la banda de Soret. Cuando se agrega histamina se observan cambios en esta banda dependiendo de su concentración.

Aprovechando esto; se llevó a cabo el estudio descrito en la metodología, donde se observó el cambio del espectro electrónico UV-visible a diferentes concentraciones de Histamina. Para el caso del derivado de la porfirina benzóica, se observa un cambio notable de la reducción de la absorción a 424 nm. Los espectros típicos obtenidos se muestran en la gráfica 8 para un comportamiento 1:1

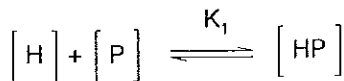


Gráfica N° 8 Cambios en el espectro UV-vis de Porfirina Benzóica-Cu vs. [Histamina], la flecha indica el cambio en el espectro al aumento de histamina.

El comportamiento de la porfirina benzóica complejada con cobre, representada en la gráfica 8 muestra un punto isobéptico, lo cual nos indica la presencia de al menos dos especies en disolución, se puede sugerir que se trata de la metaloporfirina sin complejar y la metaloporfirina con histamina.

Para cuantificar el comportamiento de asociación entre los derivados y la histamina como mencionamos anteriormente asumimos dos comportamientos: 1:1 que es donde únicamente se coordina una histamina axialmente y el 1:2 que es cuando ambas posiciones axiales son ocupadas por dos moléculas de histamina.

Para cuantificar el comportamiento 1:1 se tiene el siguiente equilibrio:



Con una constante de asociación definida como:

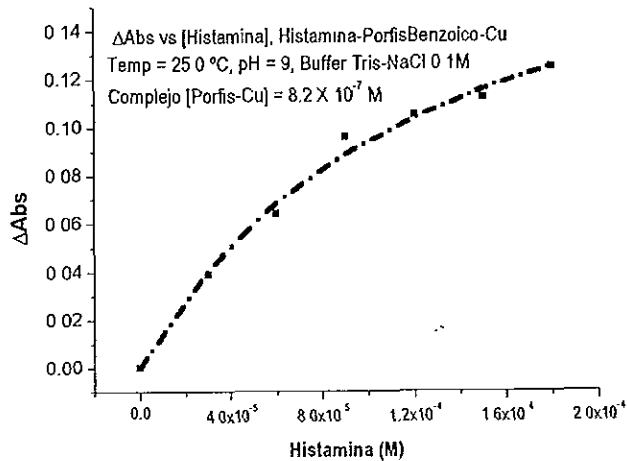
$$K_1 = \frac{[HP]}{[P][H]}$$

El cálculo de la K_1 se realizó mediante un ajuste no lineal a partir de los datos de Δ absorbancia con respecto a la concentración de histamina, gráfica N° 9, la ecuación de ajuste no lineal utilizada para el comportamiento 1:1 es la siguiente ecuación (ver apéndices):

$$\Delta Abs = \frac{K_1 [P]_t [H] \Delta \epsilon}{1 + K_1 [H]}$$

Ecuación 1.

La ecuación 1, tiene 2 parámetros desconocidos (K_1 y $\Delta \epsilon$), donde $\Delta \epsilon$ es la diferencia entre los coeficientes de absorptividad molar del complejo formado y de la metaloporfirina sola. Donde la gráfica resultante típica de este tipo de ajuste 1:1, es la siguiente.⁶⁹



Gráfica N°9. Ajuste no lineal típico de un modelo 1:1

La porfirina benzóica fue la única porfirina en la que sus dos derivados, los de cobre y zinc, mostraron un mejor ajuste a un comportamiento 1:1. Obteniendo los siguientes valores de K_1 los cuales se muestran en las tablas 4 y 5

Temperatura\ Parámetros	$K_1 (M^{-1})$
20°C	10728.64
22.5°C	8695.4250
25°C	7868.3683
27.5°C	6423.0276
30°C	5909.36

Tabla 4. Valores de K_1 Porfirina Benzóica-Cobre.

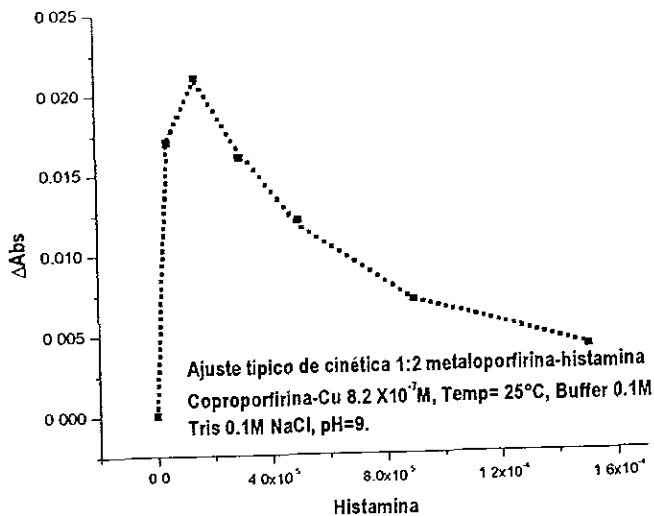
Temperatura\ Parámetros	$K_1 (M^{-1})$
20°C	11.21369
22.5°C	10.96881
25°C	10.44422
27.5°C	9.93078
30°C	9.25277

Tabla 5. Valores de K_1 Porfirina Benzóica-Zinc.

Por otro lado, el comportamiento observado en los demás derivados no coincidió con el que mostró la porfirina benzóica, lo que indica que los ajustes al modelo 1:1 no fueron adecuados para estos derivados, en cambio los ajustes a un modelo donde se considera los equilibrios 1:1 y 1:2 simultáneamente, fueron más adecuados para representar su comportamiento.

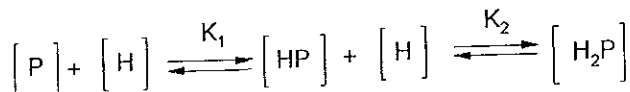
Un caso típico es el que se presenta en el derivado de la coproporfirina con cobre. Gráfica

Nº 10



Gráfica 10. Ajuste típico de un comportamiento 1:1 - 1:2

Para cuantificar este comportamiento tenemos el siguiente equilibrio, esto es, el comportamiento de HP como el complejo con una sola histamina y H_2P como el complejo con dos histaminas



Con las constantes de asociación definidas como:

$$k_1 = \frac{[HP]}{[P][H]} \qquad K_2 = \frac{[H_2P]}{[HP][H]}$$

El cálculo de las constantes se realizó mediante una regresión no lineal sobre la ecuación 2 (ver apéndices) a partir de los datos de Δ Absorbancia, en función de la concentración de histamina

$$\Delta Abs = K_1 [P]_t * \frac{\Delta \epsilon_1 [H] + K_2 \Delta \epsilon_2 [H]^2}{1 + K_1 H + K_2 K_1 [H]^2}$$

Ecuación 2

La ecuación tiene 4 parámetros desconocidos (K_1 , K_2 , $\Delta \epsilon_1$, $\Delta \epsilon_2$). Donde $\Delta \epsilon_1$, es la diferencia entre los coeficientes de absorptividad molar de la metaloporfirina sola y la complejada con una histamina; $\Delta \epsilon_2$ es la diferencia entre los coeficientes de absorptividad molar de la metaloporfirina con una histamina y complejada con dos histaminas. Un ajuste típico a esta ecuación es la que se muestra en la Gráfica 10.

Para los casos de las porfirinas con sustituyentes tosilato y carboxilato con cobre y zinc, los resultados experimentales se ajustaron de modo adecuado a la ecuación 2 y las constantes obtenidas se encuentran en las tablas 6 y 7

T°C/para	Cobre (Cu ²⁺)		Zinc (Zn ²⁺)	
	K ₁ (M ⁻¹)	K ₂ (M ⁻²)	K ₁ (M ⁻¹)	K ₂ (M ⁻²)
20.0°C	520.7662	11328.24	1734.052	5319.776
22.5°C	463.6309	15000.35	1865.271	5567.087
25.0°C	507.0702	11603.17	2450.148	3537.82
27.5°C	432.3685	29201.98	3116.169	2116.712
30.0°C	434.3864	28836.94	2898.45	2267.366

Tabla 6. Resultados obtenidos para la porfirina con sustituyentes tosilato.

T°C/para	Cobre (Cu ²⁺)		Zinc (Zn ²⁺)	
	K ₁ (M ⁻¹)	K ₂ (M ⁻²)	K ₁ (M ⁻¹)	K ₂ (M ⁻²)
20.0°C	0.03586	37.98e8	2159.219	272401
22.5°C	0.02624	37.23e8	2669.133	175392
25.0°C	0.0389	34.11e8	2934.562	150053
27.5°C	0.01231	30.21e8	2674.873	157418.6
30.0°C	0.0387	34.58e8	2636.772	148558.6

Tabla 7. Resultados obtenidos para la coproporfirina.

A partir de las constantes de asociación obtenidas de los ajustes no lineales, para cada uno de los derivados obtenemos parámetros termodinámicos al relacionar sus constantes de asociación en función de la temperatura, a través de la ecuación de Van Hoff:

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

Ecuación 3. Ecuación de Van Hoff

Para el comportamiento de los derivados de porfirina benzóica que se ajustan mejor a un modelo de comportamiento 1:1, por cada temperatura ensayada obtenemos una constante K₁. De esta manera para este caso obtendremos ΔG₁ derivados de la K₁. Por otro lado, para los derivados de porfirinas de tosilato y carboxilato que su comportamiento se ajusto mejor a un modelo 1:1:2, se obtienen dos constantes K₁ y K₂. Y por lo tanto dos serie de valor de ΔG, ΔG₁ y ΔG₂

Los valores obtenidos para los derivados de porfirina benzóica se presentan en la tabla 8.

Temperatura	Cobre (Cu ²⁺)		Zinc (Zn ²⁺)	
	K ₁ (M ⁻¹)	ΔG ₁ (Kcal/mol)	K ₁ (M ⁻¹)	ΔG ₁ (Kcal/mol)
293.15	10728.64	-5.410	11.21	-1.407
295.65	8695.42	-5.335	10.96	-1.406
298.15	7868.36	-5.320	10.44	-1.389
300.65	6423.02	-5.243	9.93	-1.371
303.15	5909.36	-5.237	9.25	-1.340

Tabla 8. Datos de ΔG₁ para derivado de porfirina de benzoato de cobre y zinc.

Por otro lado, para los demás derivados tenemos dos valores de ΔG , el comportamiento de los otros 4 derivados se presenta en las tablas (9,10,11,12).

Para el derivado de coproporfirina-Cobre, los datos obtenidos del cálculo de ΔG son los siguientes:

T (K)	$K_1 (M^{-1})$	$K_2(M^{-2})$	$\Delta G_1(Kcal/mol)$	$\Delta G_2(Kcal/mol)$
293.15	0.0359	3.80×10^9	1.94	-12.8
295.65	0.0262	3.72×10^9	2.14	-12.9
298.15	0.0389	3.41×10^9	1.92	-13.0
300.65	0.0123	3.02×10^9	2.63	-13.0
303.15	0.0387	3.46×10^9	1.96	-13.2

Tabla 9. Datos de ΔG_1 y ΔG_2 para derivado de coproporfirina de cobre.

Para el derivado de coproporfirina-Zinc, los datos obtenidos del cálculo de ΔG son los siguientes:

T (K)	$K_1 (M^{-1})$	$K_2(M^{-2})$	$\Delta G_1(Kcal/mol)$	$\Delta G_2(Kcal/mol)$
293.15	2160	2.72×10^5	-4.47	-7.29
295.65	2670	1.75×10^5	-4.63	-7.09
298.15	2930	1.50×10^5	-4.73	-7.06
300.65	2670	1.57×10^5	-4.71	-7.15
303.15	2640	1.49×10^5	-4.74	-7.17

Tabla 10. Datos de ΔG_1 y ΔG_2 para derivado de coproporfirina de zinc

Para el derivado de porfirina de tosílato de cobre los datos obtenidos son los siguientes

T (K)	$K_1(M^{-1})$	$K_2(M^{-2})$	$\Delta G_1(Kcal/mol)$	$\Delta G_2(Kcal/mol)$
293.15	521	11300	-3.64	-5.44
295.65	464	15000	-3.61	-5.65
298.15	507	11600	-3.69	-5.54
300.65	432	29200	-3.63	-6.14
303.15	434	28800	-3.66	-6.19

Tabla 11. Datos de ΔG_1 y ΔG_2 para derivado de porfirina de tosílato de cobre

Para el derivado de porfirina de tosilato con zinc los datos obtenidos son los siguientes:

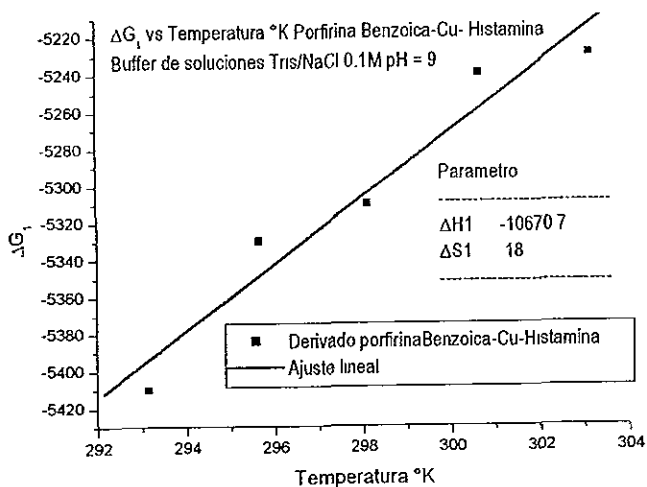
T (K)	$K_1(M^{-1})$	$K_2(M^{-2})$	$\Delta G_1(Kcal/mol)$	$\Delta G_2(Kcal/mol)$
293.15	1730	5320	-4.34	-5.00
295.65	1870	5570	-4.42	-5.07
298.15	2450	3560	-4.62	-4.84
300.65	3120	2120	-4.81	-4.57
303.15	2900	2270	-4.80	-4.65

Tabla 12. Datos de ΔG_1 y ΔG_2 para derivado de porfirina de tosilato de zinc.

Al graficar ΔG_1 o ΔG_2 con respecto a la temperatura en K, la gráfica típica que obtenemos es la representada en la gráfica N° 11, de donde determinamos el valor de ΔS del valor de pendiente y ΔH del valor de ordenada al origen. Esto a partir de la ecuación 4:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ecuación 4.



Gráfica N° 11. Ecuación típica de ajuste de la ecuación 4

R

Resumiendo los resultados obtenidos, se presentan en la tabla N° 13:

Derivado-porfirina	K ₁		K ₂	
	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol K)	ΔH_2 (cal/mol)	ΔS_2 (cal/mol K)
Benzóica-Zinc	-3530.68	-7.2		
Benzóica-Cobre.	-10670.7	-18		
Coproporfirina-Zinc	-989.94	+12.4	-3165.42	+13.2
Coproporfirina-Cobre	-19813.1	-74	-2246.6	+36
Tosilato-Zinc	+11025.06	+52.4	-19137.2	-48
Tosilato-Cobre	-1713.75	-6.4	+17939.05	+79.59

Tabla N° 13 - Valores de ΔH y ΔS para todos los derivados.

Discusión en función de las constantes.

Como ya se mencionó, se estudiaron 6 complejos porfirínicos, 3 de los cuales son de cobre y otros tantos de zinc, para el caso de cada conjunto es de suponerse que la influencia de la porfirina sobre el metal no debe variar sustancialmente. Por consecuencia, es lógico pensar que la coordinación con histamina sea muy similar, por lo que las constantes de asociación serían muy parecidas entre los 3 derivados de cada serie. Por esto sería lógico pensar que si hay diferencias apreciables entre las constantes de estabilidad éstas sean debidas a una interacción probablemente entre la histamina y los sustituyentes de la porfirina dando como resultado la unión con más de un centro.

Los resultados obtenidos, presentan un comportamiento muy distinto entre las constantes de estabilidad para cada grupo. De los 6 derivados estudiados, los de la porfirina benzóica presentan un comportamiento que se ajusta a un modelo de estabilidad 1:1 (ecuación 1). Mientras que para los derivados de porfirinas de tosilato y carboxilato su comportamiento se ajusta mejor a un modelo 1:1:2 (ecuación 2) Las constantes de estabilidad obtenidas, K_1 y K_2 , no son comparables directamente debido a que tienen diferentes unidades.

Los valores de K_1 , se comparan para la serie de porfirinas con Cu^{2+} , el derivado que presenta una constante de asociación mayor es la porfirina benzóica, mientras que el derivado que presenta menor valor de asociación es la coproporfirina. Esta es menor aproximadamente 10^6 veces, mientras que el derivado de tosilato queda con un valor intermedio 10^2 veces menor que el derivado de benzoato.

Por otro lado, la comparación de los valores de K_2 , entre los derivados de tosilato y coproporfirina, la coproporfirina, muestra una constante de asociación mayor por aproximadamente 10^5 veces respecto al derivado de tosilato.

En base con estos resultados se puede observar que los derivados aniónicos, es decir, con un grupo carboxilato como es el caso de los derivados de coproporfirina y benzoato, son los que

tienen mejor capacidad de estabilizar un posible complejo formado entre la metaloporfirina y la histamina.

Se puede sugerir que esta estabilización, en comparación con la porfirina catiónica, surge de una interacción entre el grupo amino terminal NH_2 de la histamina y el grupo carboxilato de nuestros derivados mediante puentes de hidrógeno.

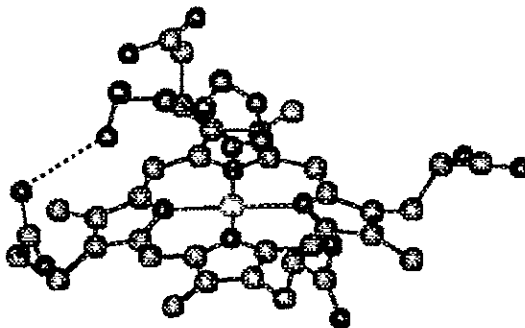


Figura N° 10 Coproporfirina -Zn complejada con histamina.

Adicionalmente, los grupos característicos de la coproporfirina ($\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) son más flexibles que los benzoatos del derivado de porfirina benzóica pudiendo interactuar más fácilmente con el grupo R-NH_2 . Si se hacen estudios de mecánica molecular, empleando el campo de fuerzas MM2, para estos sistemas se observa que las cadenas laterales de la coproporfirina ($\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) puede formar un puente de hidrógeno más fácilmente con el grupo R-NH_2 de la histamina (figura 10) en comparación con los grupos benzoato de la porfirina benzóica (figura 11), ya que el grupo benzoato presente no tiene la suficiente flexibilidad para que esta interacción sea más favorecida, la distancia aproximada del grupo benzoato al R-NH_2 de la histamina, es de aproximadamente 4.5 \AA , es decir, suficientemente lejos para que no se forme un puente de hidrógeno.

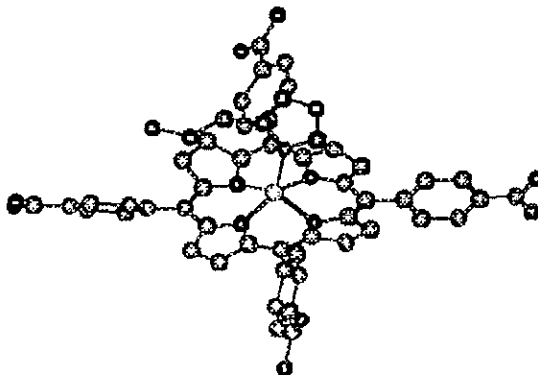


Figura N° 11 Porfirina Benzóica -Zn complejada con histamina

Los valores de K_1 , se comparan para la serie de porfirinas con Zn^{2+} , el derivado que presenta una constante de asociación mayor es la de coproporfirina mientras que el derivado que presenta una asociación menor es el derivado de porfirina benzóica esta última es menor aproximadamente en un orden de 10^2 veces respecto al derivado de coproporfirina. Para el derivado de tosilato, como en la serie de Cu^{2+} , presenta una tendencia intermedia siendo menor respecto al derivado de coproporfirina aproximadamente 2 veces.

Por otro lado, al comparar los valores de K_2 , el derivado que presenta una mayor constante de estabilidad es el de la coproporfirina, siendo ésta mayor aproximadamente 10^2 veces respecto al derivado de porfirina de tosilato, basado en este comportamiento, las porfirinas con Zn^{2+} muestran la misma tendencia que la presentada en los derivados de cobre, el sustituyente de la coproporfirina ($CH_2-CH_2-COO^-$) presenta valores mayores de constantes de asociación por la histamina que los otros dos derivados.

Por lo que respecta al derivado de porfirina de tosilato, sí bien este derivado es estructuralmente parecido a la porfirina benzóica, ésta cuenta con un grupo funcional diferente que es catiónico, los resultados obtenidos para la metaloporfirina de tosilato, no se ajustan adecuadamente a un modelo 1:1 y por otro lado muestra un buen ajuste al modelo 1:1:2, lo cual indica que este derivado podría coordinar 2 moléculas de histamina (figura 12).

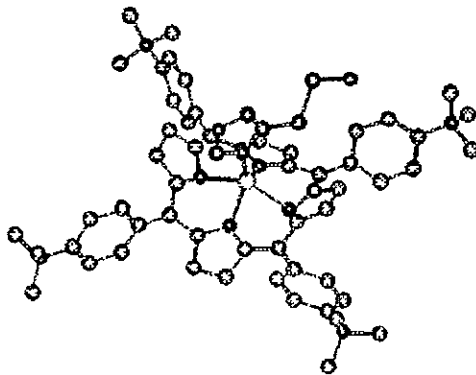


Figura N° 12 Porfirina Benzóica -Zn complejada con histamina

El derivado de porfirina de tosilato, que también tiene un anillo de benceno debería en principio comportarse como la metaloporfirina benzóica, no lo hace así y con los valores de constantes de estabilidad, se observa una tendencia intermedia. Por un lado, sus constantes podrían dar idea de que se asocian a 2 histaminas pero es un sistema menos estable respecto a los derivados de coproporfirina, suponemos esto por lo poco flexible del sustituyente tosilato. Por estudios de mecánica molecular, empleando el campo de fuerzas MM2, la distancia aproximada del grupo tosilato a el de R-NH₂ de la histamina, es de aproximadamente 5.4 Å, es decir, suficientemente lejos para que no haya interacción.

De los 6 derivados estudiados el que tiene una mayor fuerza de asociación para la histamina es el derivado de coproporfirina con Cu²⁺, seguido de este mismo derivado pero con Zn²⁺, con un valor de K₁ para el derivado de coproporfirina- Cu²⁺, de $\approx 0.03 \text{ M}^{-1}$ y K₂ de $\approx 37 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$ y para el derivado de Zn²⁺. K₁ $\approx 2000 \text{ M}^{-1}$ y K₂ de $\approx 200000 \text{ M}^{-2}$. Es notorio el bajo valor de K₁ para el derivado de cobre, lo cual indicaría que en principio habría una asociación muy pobre entre este derivado y la histamina, pero por otro lado muestra una K₂ muy alta, comportamiento que en principio podría deberse a que la reacción esta completamente desplazada a la formación de [H₂P].

Con estos datos se encontró en términos generales que el Cu²⁺ forma complejos más estables, esto concuerda con algunos antecedentes encontrados en la literatura donde la histamina tiene constantes de complejación más altas para Cu²⁺ que para Zn²⁺ en disolución acuosa⁷⁰.

Por otro lado, los resultados de los valores de ΔH y ΔS están acordes con la discusión de los valores de las constantes de estabilidad, en general, los valores de ΔH grandes y negativos indican una asociación fuerte de la histamina con la porfirina, esto es característico de la formación de un enlace fuerte, como puede ser el de coordinación. Los valores de ΔS muestran valores en general pequeños, ya sean positivos o negativos, indicando que las contribuciones entrópicas no son muy importantes, esto sugiere que el efecto hidrofóbico es insignificante en comparación con la interacción de los reactivos, este resultado concuerda con lo esperado, dada la característica iónica de las porfirinas. Esto se cumple para el caso de la porfirina benzóica y la coproporfirina, sin embargo, para el caso de ΔH_1 de la porfirina catiónica-Zn²⁺ y ΔH_2 del derivado de Cu²⁺ de esta misma porfirina los resultados muestran un ΔH positivo, esto puede ser asociado, tal vez, a alguna

interacción desestabilizante debido al tosilato que es catiónico, ya que esta porfirina difiere de la benzóica principalmente por la naturaleza de la carga, no obstante, en estos dos casos la contribución entrópica es favorable por lo que se presume que el complejo 1:1 de la porfirina tosilato zinc y el complejo 1:1:2 de la porfirina tosilato cobre están estabilizados principalmente por contribuciones entrópicas a diferencia del resto de los compuestos estudiados en este trabajo que están estabilizados por el factor entálpico

Conclusiones

Se prepararon dos series de derivados uno de Cu^{2+} y otro de Zn^{2+} de las siguientes porfirinas: benzóica, coproporfirina y tosilito y se estudiaron como moléculas receptoras para la histamina, mostrando para todos los casos una asociación. Para los derivados de porfirina benzóica, esta asociación mostró un mejor ajuste a un modelo 1:1 mientras que los derivados de coproporfirina y tosilito mostraron un mejor ajuste a un modelo 1:1:2. Se logró obtener una constante de asociación para cada derivado de porfirina benzóica K_1 , mientras que para los derivados de coproporfirina y tosilito fueron dos las constantes de asociación obtenidas para cada derivado, K_1 y K_2 .

En términos generales, los complejos de cobre mostraron una mayor afinidad por la histamina.

Se logró determinar que el derivado que reconoció más selectivamente a la histamina fue el de coproporfirina con Cu^{2+} , siendo el grupo carboxilato el que tuvo mayor selectividad por la histamina con respecto a los otros sistemas, esto se dedujo a partir de los valores de las constantes de equilibrio, ΔH y ΔS .

La mayor selectividad del derivado coproporfirina- Cu^{2+} probablemente se deba a la mayor flexibilidad de sus cadenas laterales con los sustituyentes carboxilato en comparación a la porfirina benzóica o a la porfirina catiónica, ya que permite la posibilidad de una mejor interacción con la histamina. Aunque la porfirina benzóica mostró un comportamiento 1:1:2, sus constantes de asociación son menores respecto a la coproporfirina.

La naturaleza de la carga de las porfirina mostró ser un parámetro importante, ya que el comportamiento tanto cinético como termodinámico de la porfirina catiónica, tosilito, es diferente con respecto a los otros dos derivados aniónicos y mostró constantes de estabilidad más altas que el complejo de la porfirina benzóica que es estructuralmente similar pero con carga opuesta. Por lo que resulta interesante estudiar el comportamiento que tendría un derivado catiónico pero con

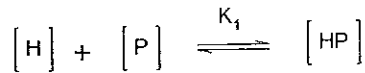
sustituyentes periféricos que tengan una mayor flexibilidad y así estudiar de forma más eficiente el efecto que imparte un sustituyente catiónico en comparación con un aniónico.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría utilizar de estos 6 derivados el de coproporfirina de cobre como candidato a sensor para la histamina, pero para comprobar su especificidad por la histamina se tendría que realizar reacciones de complejación con otras aminas biogénicas así como con algunos compuestos presentes en extractos de pescado u otro alimentos que podrían interaccionar con la porfirina por ejemplo: aminoácidos. En función de sus constantes de complejación se podría determinar la selectividad de histamina y hacer los cambios necesarios en el sistema hasta obtener un sensor de alta especificidad para esta amina biogénica.

Apéndices

Equilibrio 1:1

El equilibrio de asociación para una molécula de Histamina y una de metaloporfirina, representada por [H] y [P] respectivamente, es el siguiente:



con su constante de equilibrio asociada

$$K_1 = \frac{[HP]}{[H][P]}$$

De la constante de equilibrio queremos poner en función de parámetros conocidos por lo tanto:

$$[HP] = K_1 [H] [P]$$

La concentración total de porfirina e histamina esta dadas por los siguientes balance de materia:

$$[P]_t = [P] + [HP]$$

$$[H]_t = [H] + [HP]$$

Para el caso de la absorbancia inicial que se observa solo depende de una sola especie, esta es la porfirina total [P]_t; por lo tanto la absorbancia inicial esta dada por:

$$Abs_{inicial} = \epsilon_P [P]_t$$

Mientras que para una absorbancia final dos son las especies que determinan la absorbancia:

$$Abs_{total} = \epsilon_P [P] + \epsilon_{HP} [HP]$$

Para lo cual el ΔAbs queda definido por

$$\Delta Abs = Abs_{total} - Abs_{inicial} = \epsilon_P [P] + \epsilon_{HP} [HP] - \epsilon_P [P]_t$$

De esta igualdad tenemos una incógnita siendo esta el valor de HP por lo que sustituimos el valor de HP resultando la siguiente ecuación:

$$\Delta Abs = \epsilon_P [P]_t + \epsilon_{HP}[K_1(H) (P)]_t - \epsilon_P [P]_t$$

Sustituyendo el término de $[P]_t$ por el balance de materia la ecuación resulta:

$$\Delta Abs = \epsilon_P [P]_t + \epsilon_{HP}[K_1(H) (P)]_t - \epsilon_P [(P)_t + (HP)]$$

De nuevo sustituyendo el término $[HP]$, y eliminado términos similares la ecuación adquiere la siguiente forma:

$$\Delta Abs = \epsilon_{HP}[K_1(H) (P)]_t - \epsilon_P [K_1(H) (P)]_t$$

Factorizando términos la ecuación adquiere la forma siguiente:

$$\Delta Abs = K_1 [H]_t [P]_t (\epsilon_{HP} - \epsilon_P)$$

Partiendo de la consideración de que $[H]_t \approx [H]$, del balance de materia para la porfirina 3, sustituimos:

$$[P]_t = [P]_t + K_1 [P]_t [H] = [P]_t (1 + K_1[H])$$

Ordenando:

$$[P]_t = [P]_t (1 + K_1 [H])$$

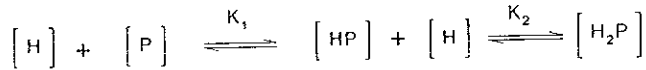
$$[P]_t = \frac{[P]_t}{1 + K_1 [H]}$$

Sustituyendo, resulta la ecuación que representa un equilibrio 1:1:

$$\Delta Abs = \frac{K_1 [P]_t \Delta \epsilon}{1 + K_1 [H]}$$

Equilibrio 1:1:2

El equilibrio de asociación para dos molécula de Histamina y una de metaloporfirina, representada la histamina por [H] y la metaloporfirina por [P] es el siguiente:



con sus constantes de equilibrio asociadas.

$$K_1 = \frac{[HP]}{[P][H]} \quad K_2 = \frac{[H_2P]}{[HP][H]}$$

Para el caso de la absorbancia inicial que se observa solo depende de una sola especie, esta es la porfirina total [P]_i, por lo tanto la absorbancia inicial esta dada por:

$$Abs_{inicial} = \epsilon_P [P]_i$$

Mientras que para una absorbancia final tres son las especies que determinan la absorbancia:

$$Abs_{final} = \epsilon_P [P]_f + \epsilon_{HP} [HP]_f + \epsilon_{H_2P} [H_2P]_f$$

Para lo cual el ΔAbs queda definido por

$$\Delta Abs = Abs_{final} - Abs_{inicial} = \epsilon_P [P]_f + \epsilon_{HP} [HP]_f + \epsilon_{H_2P} [H_2P]_f - \epsilon_P [P]_i$$

La ecuación anterior se define en parámetros conocidos

$$\Delta Abs = \epsilon_P [P]_f + \epsilon_{HP} [HP]_f + \epsilon_{H_2P} [H_2P]_f - \epsilon_P [P]_i - \epsilon_P [HP]_f - \epsilon_P [H_2P]_f$$

Se factorizan en función de los complejos formados.

$$\Delta Abs = (\epsilon_{HP} - \epsilon_P) [HP]_f + (\epsilon_{H_2P} - \epsilon_P) [H_2P]_f$$

Se describe la igualdad sustituyendo $\Delta\varepsilon_1 = (\varepsilon_{HP} - \varepsilon_P)$ y $\Delta\varepsilon_2 = (\varepsilon_{H_2P} - \varepsilon_P)$

$$\Delta Abs = \Delta\varepsilon_1 [HP] + \Delta\varepsilon_2 [H_2P]$$

Se coloca en términos conocidos:

$$\Delta Abs = \Delta\varepsilon_1 K_1 [P] [H] + \Delta\varepsilon_2 K_2 K_1 [P] [H] [H]$$

Se reordena

$$\Delta Abs = K_1 [P]_i [H] (\Delta\varepsilon_1 + \Delta\varepsilon_2 K_2 [H])$$

Se sustituye en el balance total de materia para la porfirina

$$[P]_i = [P] + [HP] + [H_2P]$$

$$[P]_i = [P] + K_1 [P] [H] + K_2 K_1 [P] [H] [H]$$

Ordenamos en términos semejantes y factorizamos

$$[P]_i = [P] (1 + K_1 [H] + K_2 K_1 [H]^2)$$

Colocamos la ecuación en función de porfirina total

$$[P]_i = \frac{[P]_t}{1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2}$$

$$\Delta A = \frac{K_1[P]_i[H]}{1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2} (\Delta \varepsilon_1 + \Delta \varepsilon_2 K_2[H])$$

Reordenado queda la ecuación resultante para un modelo de equilibrio 1:1:2

$$\Delta Abs = K_1[P]_i \frac{\Delta \varepsilon_1[H] + K_2 \Delta \varepsilon_2[H]^2}{1 + K_1[H] + K_2K_1[H]^2}$$

Bibliografía.

- 1)Lehn, J. H., La Química Supramolecular, *Mundo Científico* 1982, 20.
- 2)Schneider, H. J.; Dürr, H. *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry* Weinheim, Germany, 1991.
- 3)Coenders, A. *Química Culinaria*; Acirbia: Zaragoza, España., 1996.
- 4)Harris, P.; Tall, J. *Rancidity in Fish*, 1989.
- 5)Hultin, H. O., Oxidation of lipids in seafood, *Seafood Chemistry Processing, Technology and Quality* 1994, 47-74.
- 6)Haaland, H.; Arnesen, E.; Njaa, F., Amino acid composition of whole mackerel (*Scomber scombrus*) stored anaerobically at 20°C and at 2°C, *Int. J. Food Sci. Technol.* 1990, 25, 82-87.
- 7)Eitemiller, R. R.; De Souza, S. C. *Enzymatic mechanisms for amine formation in fish* Washington, D.C., 1984.
- 8)Lehane, L.; Olley, J., Histamine fish poisoning revisited, *International Journal of Food Microbiology* 2000, 58, 1-37.
- 9)Bremner, H. A., Fish Flesh Structure and the role of collagen it post-mortem Aspects and implication for fish processing, *Quality Assurance in the Fish Industry* 1992, 39-62.
- 10)Kimata, M. *The Histamine Problem*, Academic Press. New York, 1961; Vol 1.
- 11)Sanceda, N. G.; Suzuki, E.; Ohashi, W., Kurata, T., Histamine Behavior during the Fermentation Process in the Manufacture of Fish Sauce., *J. Agric Food Chem* 1999, 47, 3596-3600.

-
- 12) Wei, Q. K.; Chen, T. R.; Fang, W. R., Analysis of biogenic amines in fish muscles by high performance liquid chromatography, *J. Food Drug Anal* **1995**, *3*, 313.
- 13) Aksnes, A.; Brekken, B., Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin, *J. Sci. Food Agric* **1988**, *45*, 53-60.
- 14) Dawood, A.; Karkalas, J.; Roy, R.; Williams, C. S., The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*salmo irideus*), *Food Chem* **1988**, *27*, 33-45.
- 15) Okuzumi, M.; Fukumoto, I.; Fujii, T., Changes in bacterial flora and polyamines contents during storage of horse mackerel meat, *Nipp. Suis. Gakk.* **1990**, *56*, 1307-1312.
- 16) Yamanaka, H.; Shiomi, K.; Kikuchi, T., Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*), *J. Food Sci* **1987**, *52*, 936-938.
- 17) Taylor, S. L.; Stratton, J. E.; Nordlee, J. A., Histamine poisoning (Scombroid fish poisoning): An Allergy-like intoxication, *Clin Toxicol* **1989**, *27*, 225-240.
- 18) Arnold, S. H.; Brown, W. *Histamine(?) toxicity from fish products*; Academic Press: New York, 1978; Vol. 24.
- 19) Merson, M. H.; Baine, W. B.; Gangarosa, E. J.; Swanson, R. C., Scombroid fish poisoning- Outbreak traced to commercially canned tuna fish, *J. Am Med. Assoc* **1974**, *228*, 1268-1269.
- 20) Douglas, W. W. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 5 ed.; MacMillan: New York, 1980.
- 21) Clifford, M. N.; Walker, R.; Wright, J. H.; Murray, C. K., Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis., *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *47*, 365-375.

- 22)Jomah, P.; Walker, M. N.; Wright, J.; Hardy, R.; Murray, C. K., The importance of endogenous histamine relative to dietary histamine in the etiology of scombrototoxicosis, *Food Addit. Contam* **1991**, *8*, 531-542
- 23)Bjeldanes, L. F.; Schutz, D. E.; Morris, M. M., On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig, *Food Cosmetol. Toxicol* **1978**, *16*, 157-159.
- 24)Chu, C. H.; Bjeldanes, L. F., Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro, *J. Food. Sci* **1981**, *47*, 79-80.
- 25)Taylor, S. L.; Woychik, N. A., Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae, *J Food Prot* **1982**, *45*, 747-751.
- 26)Murray, C. K.; Hobbs, G.; Gilbert, R. J., Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish, *J. Hygiene* **1991**, *88*, 215-220.
- 27)Gouyguou, J. P.; Siquin, C.; Etienne, M.; Landrein, A.; Durand, P. *Quantitative and qualitative determination of biogenic amines in fish*; Fishing News Oxford., 1992.
- 28)FDA. *Defect action levels for histamine in tuna: Availability of guide*; FDA., 1982; Vol. 47.
- 29)AOAC *Fish and other marine products-Histamine*; 13 ed.: Arlington Va., 1980, pp 294-296.
- 30)Walters, M. J., Descomposition and filth in foods- Determination of histamine in fish by liquid chromatography with post-column reaction and fluorometric detection, *J. Assoc Anal Chem.* **1984**, *67*, 1040-1043.
- 31)Veciana-Nogues, M. T.; Hernandez-Jover, T.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M. C., Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products, *Journal of AOAC International* **1995**, *78*, 1045-1050.

- 32)Yen, G. C.; Hsieh, H. L., Simultaneous Analysis of Biogenic Amines in Canned Fish by HPLC, *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 158-160.
- 33)Sato, M; Nakano, T.; Takeuchi, M.; Kumagai, T.; Kanno, N.; Nagahisa, E.; Sato, Y., Specific Determination of Histamine in Fish by High-performance Liquid Chromatography after Diazo Coupling, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 1208-1210.
- 34)Hwang, D. F.; Chang, S. H.; Shiu, C. Y.; Chain, T. J., High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning, *Journal of Chromatography B* **1997**, *693*, 23-30.
- 35)Spinelli, A. M.; Lakritz, L.; Wasserman, A. E., Effects of processing on the amine content of pork bellies, *J. Agric. Food Chem* **1974**, *22*, 1026-1029.
- 36)Staruszkiewicz, W. F.; Bond, J. F., Gas Chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods, *J. Assoc. Off. Anal Chem* **1981**, *64*, 584-591.
- 37)Yamamoto, S.; Itano, H.; Kataoka, H.; Makita, M., Gas-Liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods., *J. Agric. Food Chem* **1982**, *30*, 435-439.
- 38)Lerke, P. A.; Porcuna, M. N.; Chin, H. B., Screening test for histamine in fish, *J. Food Sci* **1983**, *48*, 155-157
- 39)Rodríguez-Jerez, J. J.; Grassi, M. A.; Civera, T., A modification of Lerke enzymic test for histamine quantification. *J. Food Prot* **1994**, *57*, 1019-1021.
- 40)Tombelli, S.; Mascini, M., Electrochemical biosensor for biogenic amines: a comparison between different approaches., *Analytica Chimica Acta* **1998**, *358*, 277-284.

- 41) Male, K. B.; Bouvrette, P.; Luong, J. H. T.; Gibbs, B. F., Amperometric Biosensor for Total Histamine, Putrecine and Cadaverine using Diamine Oxidase, *Journal of Food Science* **1996**, *61*, 1012-1016.
- 42) Pedrero, F. *Evaluación sensorial de los alimentos*; Alhabrama: México D.F., 1992.
- 43) Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Huynh, M. D., Applications of Polarography for Assessment of Fish Freshness, *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 335-337.
- 44) Ólafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlesnshläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I. M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nilsen, H., Methods to evaluate fish freshness in research and industry, *Trends in Food Science and Technology* **1997**, *8*, 258-265.
- 45) Egashira, M.; Shimizu, Y.; Takao, Y., Enhance of Trimethylamine Sensitivity of Semiconductor Gas Sensor by Ruthenium., *Chemistry Letters* **1988**, 389-392.
- 46) Gupta, S.; Misra, T. N., Manganese phthalocyanine for the detection of fish freshness by its trimethylamine emission, *Sensors and Actuators* **1997**, *B 41*, 199-202.
- 47) Carrick, M.; Stephen, J. H., Assesment of a chromogenic Calix[4] arene for the rapid colorimetric detection of trimethylamine, *J Mater Chem* **1994**, *4*, 217-220.
- 48) Morales Rojas, H. *Estudio de la asociación de coproporfirina I en disolución acuosa*; UNAM: México D.F., 1996, pp 125.
- 49) Huheey, J. E. *Química Inorgánica*; Oxford University Press: México D.F., 1997.
- 50) Chang, C. K.; Traylor, T. G., Proximal base influence on the binding of oxygen and carbon monoxide to heme, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8477-8479.

- 51) Hambright, P.; Krishnamurthy, M.; Sutter, J. R., Monomer- dimer equilibration of water - soluble porphyrins as a function of the co-ordinated metal ion, *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1975**, 13-14.
- 52) Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engasser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Cerio, V.; Hinds, L., On the aggregation of Nickel (II), Copper (II), and Zinc (II) derivatives of water-soluble porphyrins, *J. Am. Chem. Soc* **1972**, *94*, 4511-4517.
- 53) Pasternack, R. F.; Francesconi, D.; Raff, D.; E., S., Aggregation of Nickel (II), Copper (II), and Zinc (II) Derivatives of Water-Soluble Porphyrins, *Inorganic Chemistry* **1973**, *12*, 2606-2611.
- 54) Ribo, J. M.; Crusats, J.; Farrera, J. A.; Valero, M., Aggregation in water solution of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1994**, 681-682.
- 55) Mikros, E.; Gaudemer, A.; Pasternack, R., Interactions of Water-soluble Zinc Porphyrin with Amino Acid, *Inorganica Chimica Acta* **1988**, *153*, 199-200.
- 56) Schneider, H. J.; Manxue, W., Ligand-Porphyrin complexes: Quantitative evaluation of Stacking and Ionic Contributions, *J. Org. Chem* **1994**, *59*, 7464-7472.
- 57) Sirish, M.; Schneider, H. J., Porphyrin derivatives as water-soluble receptors for peptides, *Chem. Commun.* **1999**, 907-908.
- 58) Mizutani, T.; Kenji, W. K.; Kitagawa, S., Porphyrin Receptors for Amines, Amino Acids and Oligopeptides in Water, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11425-11431.
- 59) Delmarre, D.; Bied-Charreton, C., Grafting of cobalt porphyrins in sol-gel matrices: application to the detection of amines, *Sensors and Actuators* **2000**, *B62*, 136-142.
- 60) Nelen, M. I.; Eliseev, A. V., Electrostatic molecular recognition in rigid frameworks, *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1997**, *2*, 1359-1364.

- 61)Lehn, J. M.; Vierling, P., The [18]-N3O3 Aza-Oxa Macrocycle: a Selective Receptor Unit for Primary Ammonium Cations, *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 1323-1326.
- 62)Hossain, A.; Schneider, H. J., Sequence-Selective Evaluation of Peptide Side-Chain Interaction. New Artificial Receptors for Selective Recognition in Water., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11208-11209
- 63)Inoue, M. B.; Machi, L.; Inoue, M.; Quintus, F., Coordination of histamine and imidazole with macrocyclic Zn²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ chelates of dioxotetraazacycloalkanediacetates, *Inorganica Chimica Acta* **1997**, *261*, 59-65.
- 64)Inoue, M. B.; Navarro, R. E.; Inoue, M.; Quintus, F., Potentiometric and spectroscopic studies of reactions of histidine with 13-membered amide -based macrocyclic Cu²⁺ chelates, *Inorganica Chimica Acta* **1999**, *295*, 115-119.
- 65)Materazzi, S. R.; Curini, R.; Gentili, A.; D'Ascenzo, G., TG-FTIR, DSC and ESCA characterization of histamine complex with transition metal ions, *Thermochimica acta* **1997**, *307*, 45-50.
- 66)Chen, H.; Ogo, S.; Fish, R. H., Bioorganometallic Chemistry.8. The Molecular Recognition of Aromatic and Aliphatic Amino Acid and Substituted Aromatic and Aliphatic Carboxylic Acid Guests with Supramolecular (n5-Pentamethylcyclopentadienyl)rhodium-Nucleobase, Nucleoside, and Nucleotide Cyclic Trimer Hosts via Non-Covalent pi-pi and Hydrophobic Interactions in Water: Steric, Electronic and Conformational Parameters, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4993-5001.
- 67)Inouye, M.; Fujimoto, K.; Furusyo, M.; Nakazumi, H., Molecular Recognition Abilities of a New Class of Water-Soluble Cyclophanes Capable of Encompassing a Neutral Cavity, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1452-1458.
- 68)Rizzarelli, E., Vecchio, G., Metal complexes of functionalized cyclodextrins as enzyme models and chiral receptors, *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *188*, 343-364.

69) Connors, K. A. *Binding Constants* New York, 1987.

70) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York and London; Vol. 2.