



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Reconocimiento molecular de carboxilatos y fosfatos por el receptor natural amikacina**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Gabriela Idania Vargas Zúñiga



TUTOR: Dr. Anatoli K. Iatsimirski

AÑO:2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	Dra. Silvia Elena Castillo Blum
VOCAL	Dr. Herbert Höpfl Bachner
SECRETARIO	Dr. Jesús Valdés Martínez
PRIMER SUPLENTE	Dr. Rafael Moreno Esparza
SEGUNDO SUPLENTE	Dr. Iván Castillo Pérez

Asesor

---

Dr. Anatoli K. Iatsimirski

Sustentante

---

Q. Gabriela Idania Vargas Zúñiga

## **Agradecimientos**

Agardezco profundamente al Dr. Anatoli Iatsimirski por su apoyo, paciencia y enseñanzas brindadas en la dirección de esta tesis.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la maestría.

Al departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la UNAM.

A la USAI de la UNAM y al CIQ de la UAEM por facilitar sus instalaciones para los experimentos de RMN

A la UNAM.

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio 213 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química. Y fue presentado en el XLI CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA en septiembre de 2006.

## CONTENIDO

1. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	8
3. 1 Fuerzas intermoleculares	8
3. 1.1 Interacciones carga – carga	9
3. 1. 2 Interacciones carga – carga en solución	10
3. 1. 3 Enlace de Hidrógeno	14
3. 2. Reconocimiento Molecular	16
3. 2. 1 Reconocimiento de Aniones	16
3.2 Reconocimiento de Carboxilatos	19
3. 3. Reconocimiento de carboxilatos con grupos amonio	20
3. 3. 1 Macrociclos	20
3. 3. 2 Heterociclos catiónicos	29
3. 3. 3 Receptores derivados de oligopirroles	30
3. 3. 4 Receptores con base guanidinio	33
3. 3. 5 Complejos metálicos como receptores de dicarboxilatos	36
3. 4. Reconocimiento de fosfatos	38
3. 5. Amikacina	40
4. OBJETIVOS	44
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	45
5. 1. Substancias empleadas, reactivos y programas	45
5.1. 1 Reactivos	45
5.1. 2 Equipo	49
5. 1. 3 Programas	50
5. 2. Técnicas empleadas	51
5. 2. 1 Estandarización de las disoluciones	51
5. 2. 2 Estudio potenciométrico	51
5. 2. 3 Titulaciones por Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$	55
5. 2. 4 Titulaciones por espectrofotometría	56

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6. 1. Potenciometría	57
6. 1. 1 Determinación de las constantes de protonación del aminoglucósido amikacina y de aniones empleados como huéspedes	57
6. 1. 2 Estudio por potenciometría de las interacciones amikacina – carboxilatos	60
6. 1.3 Estudio por potenciometría de las interacciones amikacina – fosfatos	78
6. 2. Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$	81
6. 3. Espectrofotometría	84
6. 3. 1 Estudio por espectrofotometría de las interacciones amikacina – indicadores aniónicos	84
7. CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	88
APÉNDICE	91

## 1. Símbolos y Abreviaturas

<b>A</b>	amikacina
<b>AcO</b>	acetato
<b>Bz</b>	benzoato
<b>Ftal</b>	ftalato
<b>D-Mal</b>	D(+) – malato
<b>L-Mal</b>	L(-) – malato
<b>Cit</b>	citrato
<b>Glut</b>	glutarato
<b>Maln</b>	malonato
<b>Oxal</b>	oxalato
<b>Succ</b>	succinato
<b>PhP</b>	fenilfosfato
<b>PhB</b>	ácido fenilborónico
<b>PhR</b>	fenol rojo
<b>BCG</b>	bromocresol verde
<b>GMP</b>	guanosina – 5' – monofosfato
$\beta$	constante acumulativa de formación
$K_{assn}$	constante de asociación
$I$	fuerza iónica
$\zeta$	producto de cargas involucradas

*Símbolos y Abreviaturas*

$z_i$	carga del ion
$\epsilon$	constante dieléctrica
$\gamma_i$	coeficiente de actividad
<b>AMP</b>	adenosina monofosfato
<b>ADP</b>	adenosina difosfato
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>NAD<sup>+</sup></b>	adenosina dinucleótido de nicotinamida
<b>NADH</b>	adenosina dinucleótido de nicotinamida protonada
<b>TMP</b>	timidina monofosfato



## **Resumen**

El presente trabajo es un estudio de reconocimiento molecular de carboxilatos alifáticos de importancia biológica como malato, succinato, glutarato, citrato y aromáticos como ftalato, por el aminoglucósido amikacina. Así también, se incluyen los posibles factores que intervienen en la estabilidad de los complejos formados, ya que estos aniones tienen la característica de poseer formas complejas, además de tener cadenas alifáticas largas y flexibles que separan las fracciones carboxílicas, a diferencia de los aniones rígidos como ftalato. También, se realizó el estudio de los iones fenil fosfato y guanosina – 5' – monofosfato (GMP); éste último de gran importancia, porque se encuentra en el ADN.

De los resultados se observó, que los complejos formados entre amikacina protonada y succinato, tienen valores de constantes de asociación ( $K_{\text{assn}}$ ) mayores que con los otros aniones alifáticos estudiados. Esto se debe a que amikacina presenta un cambio conformacional para tener una mayor interacción entre los carboxilatos del succinato y los grupos amonio del receptor. Por otro lado, los complejos formados entre amikacina y el ftalato, presentan valores de  $K_{\text{assn}}$  mayores que con aniones alifáticos; esto es porque la preorganización de las cargas negativas del huésped, se encuentran más dirigidas hacia los grupos amonio del receptor.

Los complejos entre amikacina y los iones fosfato, presentaron constantes de asociación mayores que con los carboxilatos, en donde el complejo amikacina – GMP, tuvo el valor de constante de asociación más grande, posiblemente debido a que los grupos funcionales de la guanosina se encuentran estabilizando al complejo.

## **2. Introducción**

La química supramolecular es una disciplina de la química relativamente joven. El concepto de química supramolecular fue introducido por Lehn en década de los 70, describiéndolo como el estudio de la química basada en interacciones no covalentes. La importancia de esta química, reside en las implicaciones de estas interacciones en diferentes procesos biológicos, por ejemplo: las interacciones no covalentes que intervienen y controlan la unión de una proteína con su sustrato, el reconocimiento antígeno – anticuerpo o enzima – sustrato y la transcripción del código genético, entre otras.

Los objetos de estudio de la química supramolecular son entidades supramoleculares o supermoléculas, que principalmente están constituidas por un receptor (anfitrión) y un huésped (sustrato). Generalmente, el receptor es una molécula grande, que tiene un sitio específico de unión que puede ser una cavidad, o bien, el receptor también puede ser un agregado (como algunas enzimas). Por otro lado, el huésped tiene la característica de ser más pequeño, puede ser un catión monoatómico, por ejemplo: un catión metálico, o una molécula compleja como un neurotransmisor. Una de las características principales de las entidades supramoleculares es el arreglo espacial de sus componentes y la construcción de su estructura, así como la naturaleza de las interacciones intermoleculares que sean capaces de establecer con otras moléculas, las cuales, son importantes para mantener unidos a los componentes de la supermolécula. Las interacciones presentes en un arreglo supramolecular pueden ser interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, de Van der Waals y/o interacciones  $\pi - \pi$ ; por ello, los diferentes tipos de interacciones presentes en una supermolécula tienen diferentes preferencias angulares, intensidad, direccionalidad y distancia.<sup>1,2</sup>

Aunque las interacciones intermoleculares son más débiles que un enlace covalente, las supermoléculas son entidades termodinámicamente estables. Esto es porque la suma de estas interacciones, contribuyen a una entalpía favorable. Además, si esta supermolécula se encuentra en disolución, los efectos solvofóbicos tienen un papel importante en la estabilidad del complejo anfitrión – huésped, ya que la liberación de moléculas de disolvente que solvatan al anfitrión y al huésped, ayudan a que el proceso sea entrópicamente favorable. Esto compensa la pérdida en entropía debida a los efectos involucrados en el proceso de acercamiento de las moléculas del anfitrión hacia el huésped para compartir una superficie común (colección, orientación y restricción de los grados de libertad de las moléculas), de tal forma que la formación del complejo resulta en un cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) favorable.

El reconocimiento molecular es la habilidad que tiene una molécula de discriminar entre uno o más sustratos similares. Las características del receptor como el tamaño, la forma, la conformación y la quiralidad son primordiales en el reconocimiento molecular; así como las características de sus sitios de unión, como son: sus propiedades electrostáticas (carga y polarizabilidad), la capacidad de llevar a cabo procesos químicos de oxidación, reducción, desprotonación, etc. Otro factor primordial en el reconocimiento molecular altamente específico entre el receptor y el sustrato es la complementariedad geométrica de forma, tamaño y cavidades, que depende de una arquitectura tridimensional bien definida que comprende un arreglo específico de los sitios de unión, que en conjunción con los fenómenos de solvatación y complejación forman una supermolécula.<sup>2</sup>

En este sentido, las estructuras que cuenten con cierta de rigidez y con varios sitios de unión son de especial interés para el diseño de receptores artificiales, ya que tienen cavidades de forma y tamaño adecuado capaces de albergar a ciertos sustratos y formar puentes y conexiones que pueden dar paso a sitios de unión y funciones reactivas en posiciones específicas.

Por lo que el uso de estructuras naturales o semisintéticas que presenten cierto grado de rigidez es un área de mucho interés, ya que no implica el empleo de rutas sintéticas complicadas ni el problema de ciclización a alta dilución, mientras que da la ventaja de tener moléculas con arreglos complejos de grupos funcionales y centros quirales. Adicionalmente, dependiendo de las características de las moléculas huésped de interés, los anfitriones pueden ser modificados para obtener sitios de unión diferentes para la asociación selectiva de diferentes huéspedes. A pesar de estas ventajas, hasta el momento este grupo está constituido principalmente por ciclodextrinas modificadas.

En esta tesis se presenta el estudio del reconocimiento molecular de aniones carboxilatos y de fosfatos por el aminoglucósido amikacina en medio acuoso por medio de titulaciones potenciométricas, espectrofotométricas y de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , que consta de las siguientes secciones:

**Antecedentes.** Se describen conceptos básicos necesarios para el entendimiento de este trabajo, como qué es la química supramolecular y las interacciones no covalentes que gobiernan a estas supermoléculas; así como una breve descripción de receptores y sistemas en solución que son capaces de reconocer aniones, en especial los iones dicarboxilatos y fosfatos. También se incluyen los antecedentes del aminoglucósido semisintético amikacina.

**Parte experimental.** Esta sección contiene un enlistado de los huéspedes y el anfitrión usados para este trabajo de tesis, el equipo empleado, los programas de ajuste de datos experimentales y las técnicas empleadas para la estandarización de soluciones.

**Determinación de las constantes de protonación del aminoglucósido amikacina.** Se presentan las constantes de protonación de amikacina en las condiciones de trabajo de esta tesis y se hace una comparación con lo informado anteriormente.

**Estudio por potenciometría de las interacciones amikacina – carboxilatos y amikacina – fosfatos.** Aquí se presentan y se hace un análisis de la formación de complejos amikacina - carboxilatos y/o fosfato, en base a los estudios potenciométricos.

**Estudio por espectrofotometría de las interacciones amikacina – indicadores aniónicos.** En esta sección se presenta el análisis de la formación de complejos entre amikacina y los indicadores fenol rojo (**PhR**) y bromocresol verde (**BCG**), por medio de titulaciones espectrofotométricas por UV/Vis.

**Estudio por RMN <sup>1</sup>H de las interacciones de amikacina – ftalato.** Por último, se presenta el análisis de los complejos formados entre amikacina y el ion ftalato a diferentes concentraciones de anfitrión y valores de pH.

**Conclusiones.** Se resumen las conclusiones generales obtenidas en los estudios del anfitrión amikacina.

**Bibliografía.** Se presentan las referencias y libros citados a lo largo de este escrito.

### **3. Antecedentes**

#### **3. 1. Fuerzas intermoleculares**

Una molécula puede ser considerada como un grupo de átomos cuya energía de unión es mucho más grande que  $kT$  a temperatura ambiente (donde  $k$  es la constante de Boltzman, y  $T$  la temperatura absoluta). En el otro extremo, se tienen los agregados de Van der Waals, que son ensambles débiles de átomos o moléculas cuyas energías de unión son del orden de  $kT$ , por ello tienden a disociarse por efecto de las colisiones térmicas. Entre estas dos categorías debe de considerarse a los complejos supramoleculares, cuyas constantes de unión pueden ser determinadas a temperatura ambiente. Así, la energía del enlace en una especie discreta supramolecular es típicamente menor que la de un enlace covalente (menor de 100 kJ/mol, mientras que el enlace covalente más débil es de alrededor de 150 kJ/mol).<sup>3</sup>

Mientras que las fuerzas que rigen a los sistemas moleculares son el resultado de un traslape de orbitales; las fuerzas moleculares que rigen a los sistemas supramoleculares, son las de largo alcance, en donde la magnitud de la fuerza de este tipo de interacciones es proporcional a una potencia de la distancia interatómica, e incluyen a las fuerzas de Van der Waals, electrostáticas e interacciones  $\pi - \pi$ .

**Tabla 1.** Propiedades de las fuerzas intermoleculares,  $r$  es la distancia que separa a los dos especies que interactúan.<sup>3</sup>

Tipo de interacción	Magnitud	Dependencia con la distancia
Ion – Ion	Muy fuerte	$1/r$ , largo alcance
Ion - dipolo	Fuerte	$1/r^2$ , corto alcance
Dipolo - dipolo	Moderadamente fuerte	$1/r^3$ , corto alcance
Ion – dipolo inducido	Débil	$1/r^4$ , muy corto alcance
Dipolo – dipolo inducido	Muy débil	$1/r^6$ , extremadamente corto alcance
Dipolo instantáneo – dipolo inducido	Muy débil	$1/r^6$ , extremadamente corto alcance
Fuerzas de dispersión de London	Muy débil	$1/r^6$ , extremadamente corto alcance

### 3.1. 1. Interacciones carga-carga

Entre las interacciones no covalentes conocidas más simples y más fuertes están las interacciones carga – carga, en donde la fuerza de la interacción puede ser controlada por la constante dieléctrica del medio, debido a esto, generalmente son de suma importancia en el reconocimiento molecular. Estas interacciones tienen efectos aditivos y pueden ser atractivas o repulsivas. Adicionalmente, se puede considerar que la intensidad de la interacción carga – carga, depende del inverso de la distancia interatómica, por lo que pueden ser vistas simplemente como la suma de las interacciones entre pares de las cargas puntuales y para ello podemos utilizar la ley de Coulomb,

$$V = \sum_{i=1}^{M_A} \sum_{j=1}^{M_B} \frac{q_i q_j}{4 \pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (1)$$

en donde  $V$  es la energía potencial,  $M_A$  y  $M_B$  son el número de cargas netas en las moléculas  $A$  y  $B$ ,  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas de los átomos de las moléculas  $A$  y  $B$ ,  $r_{ij}$  es la distancia de separación entre las cargas y  $\epsilon_0$  es la constante de permitividad eléctrica en el vacío. Por lo que para el cálculo de una interacción en un medio como aire o en un líquido, se sustituye  $\epsilon_0$  por  $\epsilon$ , en donde  $\epsilon$  es la permitividad del medio o bien, si es un líquido se utiliza la constante dieléctrica del disolvente,  $\epsilon$ , (también llamada permitividad relativa del medio), la cual es equivalente a  $\epsilon/\epsilon_0$ .

### 3.1.2. Interacciones carga – carga en disolución

La formación de pares iónicos en agua, generalmente resulta en un incremento en la entropía y algunas veces en un valor desfavorable de la entalpía. La asociación de las especies iónicas está favorecida predominantemente por la liberación de moléculas de disolvente altamente ordenadas de la capa de solvatación que se encuentra rodeando a los iones, tal como en el efecto solvofóbico.

Una manera de calcular esta asociación es por medio de la ecuación de Bjerrum (2), la cual se deriva de cargas puntuales de Coulomb, describiendo a la constante de asociación,  $K_{\text{assn}}$ , en función de las cargas  $Z_A$  y  $Z_B$ , de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), y de un factor  $Q(b)$  que está en función de la constante dieléctrica, de  $Z$  y de la distancia mínima entre los centros iónicos  $A$  y  $B$ ,

$$K = (4\pi N/1000)(Z_A Z_B e^2 / \epsilon kT)^3 Q(b) \quad (2)$$

donde el parámetro  $b$  ( $b = Z_A Z_B e^2 / \epsilon kT a$ ) está relacionado con la distancia crítica  $q = ab/2 = Z_A Z_B e^2 / 2\epsilon kT$ , que está definida como la distancia a la que el potencial de



energía eléctrica de los iones A y B equivale a  $2kT$ . La ecuación de Bjerrum considera que cuando los centros de los iones A y B se aproximan a una distancia más corta o igual que  $a$ , se forma un par iónico. Esta ecuación, predice muy bien la estabilidad de pares iónicos formados por iones esféricos pequeños y poco polarizables, sin embargo, para iones poliatómicos como las interacciones entre dicarboxilatos y cationes inorgánicos existen desviaciones de esta ecuación. <sup>4</sup>

Cuando los iones A y B están en contacto, la ecuación que resulta ser más adecuada es la de Fuoss, (3),

$$K = (4\pi N a^3 / 3000) e^{(Z_A Z_B e^2 / \epsilon k T a)} \quad (3)$$

a 298 K

$$K = 0.00252 a^3 e^{(560 Z_A Z_B / \epsilon a)}$$

$$\log K = -2.6 + 3 \log a + 243 Z_A Z_B / \epsilon a \quad (4)$$

y sus unidades están en Å. Al comparar los resultados experimentales utilizando la ecuación de Bjerrum y la ecuación de Fuoss, no se observa una diferencia clara entre las ecuaciones, sin embargo, esta última es preferida por su forma matemática y porque su base conceptual es más simple. Los valores experimentales obtenidos para pares iónicos simples en agua y en mezclas de agua y disolvente orgánico, en general, coinciden con los valores teóricos obtenidos por las ecuaciones de Bjerrum y Fuoss. <sup>4</sup>

Al analizar los valores del cambio de energía libre de complejación anfitrión – huésped ( $\Delta G_{AH}$ ) de diversos sistemas de pares iónicos en agua ( $R_2NH_2^+$ ,  $R_4N^+$ , piridinio,  $-NH^+$ ,  $-COO^-$ ,  $SO_3^-$ ,  $OPO(OH)O^-$ ,  $OPOO_2^{2-}$ , fenolato, etc.) como función del número posible de puentes salinos, Schneider y Theis, <sup>5</sup> mostraron que existía una correlación lineal, en donde observaron un  $\Delta G = -5 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$  por puente salino.

Este valor coincide con el valor calculado por la ecuación de Bjerrum en base a la predicción coulombica para  $K \sim 100 \text{ M}^{-1}$  para  $Z_A = Z_B = 2$  con  $d \sim 6 \text{ \AA}$ , que resulta ser inesperadamente constante (considerando las grandes diferencias de tamaño y polarizabilidad de los iones participantes). Incluso, esta correlación se extiende a moléculas como poliaminas que se asocian con el ADN.<sup>6</sup>

Debido a que en la práctica es difícil estimar el número de puentes salinos, en complejos anfitrión – huésped con múltiples sitios de interacción, se han construido gráficas del logaritmo de la constante de asociación en función del producto de las cargas totales  $Z_A Z_B$  del anfitrión y del huésped, de esta manera se encontró para un total de 203 pares iónicos a una fuerza iónica ( $I$ ) de cero, una correlación lineal cuya pendiente corresponde a la de la ecuación de Fuoss con una  $a = 5.3 \text{ \AA}$ .<sup>4</sup>

De las ecuaciones de Bjerrum y Fuoss, se puede deducir que las estabilidades de los pares iónicos, se incrementan a medida que disminuye la polaridad del disolvente. En una mezcla de disolvente no polar – agua, como por ejemplo: 80% dioxano – agua, se observó un aumento en la estabilidad de pares iónicos aromáticos hasta de un orden de magnitud en la estabilidad de los pares iónicos. Adicionalmente, se observó el efecto contrario al antes mencionado en anfitriones iónicos muy polarizables, en donde hay un aumento en la estabilidad de los pares iónicos al aumentar la cantidad de agua a la mezcla agua – disolvente no polar.<sup>7</sup>

De Robertis y Sammartano, analizaron una gran cantidad de los datos para formación de los pares iónicos en agua, y han llegado a una conclusión que la correlación lineal sencilla entre  $\log K$  y el producto de las cargas de especies iónicas  $Z_A Z_B$ , ecuación (5), se cumple con una buena precisión para diferentes grupos de las especies, es decir, carboxilatos, organofosfatos o iones inorgánicos.<sup>8</sup>

$$\log K = a Z_A Z_B + b \quad (5)$$

El valor de la pendiente “a” en la ecuación (5), es cercano a 0.5 y varía un poco para cada grupo de los iones. El valor del parámetro “b” es cercano al 0. El cumplimiento satisfactorio de una ecuación tan sencilla, se debe a la baja direccionalidad y a la dependencia débil de la distancia (ver pag. 8) de las interacciones carga-carga.

Con respecto al efecto de la fuerza iónica en equilibrios anfitrión – huésped, puede ser tratado satisfactoriamente con la ecuación de Debye – Hückel, (6),

$$\log K = \log K^0 - 0.5(Z_R^2 - Z_P^2)\sqrt{I}/(1 + \sqrt{I}) \quad (6)$$

donde  $I$  es la fuerza iónica,  $K^0$  es la constante de equilibrio a  $I = 0$ ,  $Z_R^2$  es la suma de los cuadrados de las cargas de las especies iónicas y  $Z_P^2$  es la suma de los cuadrados de las cargas de los productos. La extensión empírica de la ecuación (6) que se ha empleado para un gran número de equilibrios iónicos tanto en sistemas orgánicos como inorgánicos es la ecuación (7) <sup>8,9</sup>

$$\log K = \log K^0 - (Z_R^2 - Z_P^2)\sqrt{I}/(2 + 3\sqrt{I}) + CI + DI\sqrt{I} \quad (7)$$

donde  $C = 0.11p^* + 0.20 (Z_R^2 - Z_P^2)$ ,  $D = -0.075 (Z_R^2 - Z_P^2)$  y  $p^*$  es la diferencia en el número de moles de las especies restantes y de los productos.

Cabe notar, que en sistemas supramoleculares, los efectos salinos muestran que a medida de que disminuye la fuerza iónica, se observa un incremento en la estabilidad de los complejos iónicos, incluso con iones orgánicos grandes, anisotrópicos y multicargados se ha observado comportamientos lineales consistentes con las predicciones de las ecuaciones empíricas del tipo Debye – Hückel. <sup>6</sup>

### 3.1.3. Enlace de hidrógeno

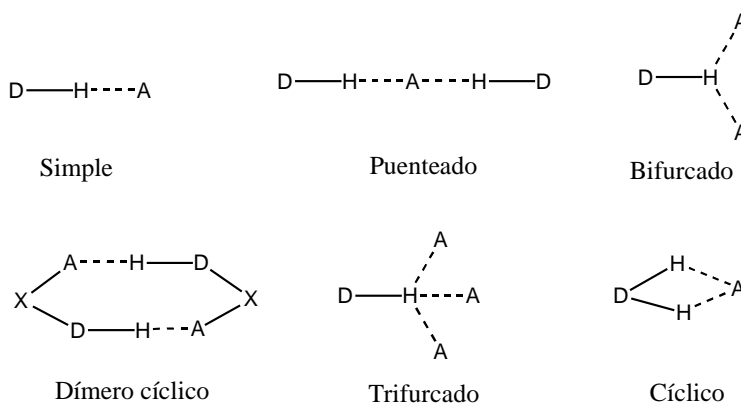
El enlace de hidrógeno es para fines prácticos, una interacción atractiva entre un donador de protón y un aceptor de protón. Tanto el donador como el aceptor tienen carácter electronegativo frente al protón involucrado en el enlace de hidrógeno que está siendo compartido entre los pares electrónicos de ambos componentes.

Entre los grupos donadores más comunes de enlace de hidrógeno se encuentran N-H, O-H, S-H, mientras que los átomos aceptores son generalmente N, O, S, F, Cl, Br y I, las nubes electrónicas de alquenos, alquinos, grupos  $\pi$  aromáticos y metales de transición.<sup>3</sup> Sin embargo, los enlaces de hidrógeno formados por átomos aceptores más electronegativos que carbono generalmente son más fuertes en los sistemas supramoleculares, ya que las fuerzas de enlace para especies neutras van de 5 a 60 KJ mol<sup>-1</sup>, más aún, si en la interacción existe una especie iónica, la magnitud de la fuerza puede incluso superar dicho intervalo.<sup>10</sup> Adicionalmente, la direccionalidad inherente de los enlaces de hidrógeno los hace ideales para el uso de sistemas supramoleculares creados por pares complementarios. El enlace de hidrógeno puede variar en fuerza, así se han clasificado en 3 tipos, fuertes, moderados y débiles cuyas características se presentan en la tabla 2.<sup>11</sup>

**Tabla 2.** Propiedades de los puentes de hidrogeno.

Características del puentes de hidrógenos	Fuerte	Moderado	Débil
Interacción D-H $\cdots$ A	Mayormente covalente	Mayormente electrostática	Electrostática
longitud	D-H $\approx$ H $\cdots$ A	D-H<H $\cdots$ A	D-H<<H $\cdots$ A
H $\cdots$ A[Å]	~1.2 – 1.5	~1.5 – 2.2	2.2 – 3.2
D $\cdots$ A[Å]	2.2 – 2.5	2.5 – 3.2	3.2 -4.0
Ángulo [°]	175 -180	130 - 180	90 - 150
Energía [kJ/mol]	58 - 167	17 - 63	<17
Desplazamiento químico en RMN <sup>1</sup> H (ppm)	14 - 22	<14	...

Los enlaces de hidrógeno fuertes se presentan entre especies cargadas, por ejemplo: los donadores pueden ser el grupo hidroxonio y sales de amonio aromáticas; mientras que ejemplos de grupos aceptores son: los iones fluoruro, hidroxilo, hidrogen fosfato, sulfatos y carboxilatos. En el caso de los enlaces moderados - que son los más comunes - tanto los grupos aceptores como los donadores son neutros; ejemplos de grupos donadores son: aminas primarias, alcoholes, grupos carboxílicos y tioles; y ejemplos de grupos aceptores son éteres, ésteres y cetonas. Los enlaces de hidrógeno débiles se forman entre grupos donadores, donde el átomo unido al hidrógeno tiene una electronegatividad similar a la de éste último y el grupo aceptor tiene electrones disponibles; como ejemplos se tienen a las interacciones C-H -  $\pi$  entre protones alquílicos relativamente ácidos y la nube  $\pi$  de alquenos, de sistemas aromáticos o alquinos. Los arreglos más comunes de este tipo de interacción son: simples (este tipo es regularmente angular, desviándose en mayor o menor grado del arreglo idealmente lineal), bifurcado, trifurcado, tipo puente o cíclico, como se puede ver en la figura 1.



**Figura 1.** Arreglos más comunes de los enlaces de hidrógeno (D= donador; A= aceptor).

### **3. 2. Reconocimiento molecular**

El reconocimiento molecular se define como el proceso que involucra tanto la unión reversible como la selección del sustrato por parte de una especie receptora con un propósito específico.<sup>12</sup> Se puede decir, que el reconocimiento molecular involucra un principio de complementariedad del sustrato hacia el receptor y viceversa; de esta manera, la unión del ligante es expresada en las constantes de formación de complejos y disociación de la supermolécula a nivel supramolecular.<sup>2</sup>

El reconocimiento molecular no sólo tiene que ver con sistemas sintéticos, sino que también en el área biológica y medicinal, como inmunología, farmacología y genética. En el caso de la química, la importancia del reconocimiento molecular cae en campos como el de los sensores y otras aplicaciones analíticas (separación) y en algunos aspectos de catálisis.

#### *3.2.1. Reconocimiento de aniones*

El reconocimiento de aniones, es hoy por hoy el mayor campo de interés de la química supramolecular reflejando su relevancia en los sistemas biológicos, médicos y farmacológicos, así como analíticos, de catálisis, reciclado y procesos ambientales.

En este sentido, un receptor cargado positivamente, ofrece ser suficientemente bueno para obtener constantes de unión grandes con aniones, ya que en el reconocimiento de aniones aparentemente, lo que se necesita es solamente introducir una molécula que tenga una afinidad intrínseca por una especie con carga negativa, por

lo que un simple catión metálico, como  $\text{Na}^+$  puede ser adecuado para un proceso asociativo uno a uno con un anión como cloruro. Insertando la carga y el radio iónico en la ecuación de Coulomb, nos da una constante de asociación  $>10^{300} \text{ M}^{-1}$ , sin embargo, esto sucedería sólo en el espacio libre.<sup>13</sup> Este ejemplo demuestra claramente, que la atracción entre una carga positiva y una negativa por si misma no representa un problema central; lo que representa un problema es el medio en el que estas cargas se encuentren, como el disolvente, o la estructura tanto del receptor como del huésped, que hace que el diseño de receptores para aniones sea un reto.

En contraste al modo de unión de los cationes, el cual usualmente envuelve enlaces fuertemente coordinados, la unión de los aniones es significativamente débil. Los aniones presentan propiedades características que deben ser tomadas en cuenta. Primero, los aniones son grandes en comparación con a algunos cationes como los iones metálicos. Por ejemplo, el ion  $\text{F}^-$  el cual es el anión más pequeño tiene un radio iónico ( $r_{\text{F}^-} = 135 \text{ pm}$ ) parecido al del potasio ( $r_{\text{K}^+} = 133 \text{ pm}$ ), el cual es considerado como un catión de tamaño medio.

El segundo aspecto concierne a la variedad de formas que los aniones tienen, como esférica ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc.), triangular ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , etc.), tetraédrica ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{ReO}_4^-$ ), plano cuadrado ( $\text{PdCl}_4^{2-}$ ,  $[\text{Pt}(\text{CN})_4]^{2-}$ ), octaédrico ( $\text{PF}_6^-$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) o incluso formas más complejas que adoptan muchas moléculas de relevancia biológica como nucleótidos (AMP, ADP, y ATP), dinucleótidos ( $\text{NAD}^+$ , NADH) y los policarboxilatos (citrato, malonato, succinato, etc.).

La tercera particularidad de los aniones, son sus altas energías de hidratación en comparación con los cationes, la cual está relacionada con su habilidad de formar enlaces de hidrógeno, por lo que la complejación con un receptor en agua es menor en relación a los cationes. Otra característica frecuentemente ignorada es el limitado intervalo de pH de existencia de muchos aniones en forma totalmente desprotonada. Si

los aniones son bases conjugadas de varios ácidos, llevarán a cabo un proceso de protonación y su grado de protonación dependerá de sus constantes de basicidad.<sup>14</sup>

Una característica más, es que los aniones son especies electrónicamente saturadas, por lo que interacciones carga – carga o fuerzas intermoleculares más débiles como el enlace de hidrógeno, el apilamiento  $\pi - \pi$  o efectos hidrofóbicos y enlaces de coordinación, pueden ser usados para su reconocimiento. Debido a la naturaleza no direccional y no selectiva de las interacciones electrostáticas, a los receptores catiónicos generalmente se les adicionan grupos que sean capaces de formar enlaces de hidrógeno, como  $-NH_2$  o  $-OH$ . Los receptores cargados deben también tener un contraión asociado, por lo que existe una competencia entre el contraión y el huésped por los sitios de unión del receptor, por tal motivo, los sitios de unión del receptor deben estar dirigidos para situarse a favor de la formación del complejo anfitrión – huésped.<sup>15</sup> Aquí, el factor más importante para determinar la estabilidad del complejo aniónico, es la presencia de atracciones iónicas fuertes, las cuales, son aproximadamente del 80% para la mayor parte de los complejos estables. Por este motivo, las interacciones débiles involucradas predominantemente en la complejación de aniones, el medio seleccionado (agua o un disolvente orgánico) también jugará un papel decisivo en la influencia del comportamiento de la complejación.<sup>16</sup>

Aunque no son tan fuertes como las interacciones de coordinación, el enlace de hidrógeno es la interacción no covalente más importante en la formación de complejos anfitrión - huésped, por su fuerza y su alta direccionalidad, por lo que las interacciones direccionales bien posicionadas son esenciales para la selectividad en la mayoría de sistemas. De éstas, un efecto acumulativo se puede obtener al conducirse por fuerzas de unión comparables con las que fueron obtenidas por receptores de cationes. Este efecto ocurre naturalmente en sistemas con guanidina, urea y amidas.<sup>15</sup>



### *3.2.2. Reconocimiento de carboxilatos*

Una parte importante de la química de coordinación de aniones es la complejación selectiva de aniones carboxilato por anfitriones naturales y sintéticos, los cuales tienen interés para la química bioorgánica porque estas especies están involucradas en muchos fenómenos de reconocimiento celular de interés biológico. Por ejemplo, el reconocimiento de carboxilatos juega un papel importante para determinar la actividad biológica de la vancomicina. Por otra parte, el reconocimiento molecular de los ácidos policarboxílicos en solución acuosa, es importante por la relevancia biológica de los estudios en este disolvente y ha recibido mucha atención en los últimos años. En medio acuoso, las interacciones disolvente – huésped compiten eficientemente con el proceso de reconocimiento selectivo. Así, sólo se ha conseguido una complejación selectiva de este tipo de huéspedes en disolventes no polares; mientras que en disolventes polares y especialmente en agua, han sido encontradas selectividades moderadas o bajas.

Durante el proceso de unión, el anfitrión experimenta un reajuste conformacional para arreglar sus sitios de enlace de la forma más complementaria para el huésped y al mismo tiempo minimizar interacciones desfavorables entre el sitio de enlace y el anfitrión. Sin embargo, en algunos casos, cuando factores como el efecto de apilamiento  $\pi$  modulan la interacción anfitrión – huésped, se pueden obtener la unión de aniones en grandes proporciones. La mayoría de los anfitriones rígidamente preorganizados como los criptandos, frecuentemente tienen una energía de activación de complejación alta y tienden a exhibir cinéticas lentas de unión con los huéspedes. Por lo que receptores que cuentan con sitios de enlace bien preorganizados, se han empleado con este propósito, ya que la preorganización representa una contribución mayor a la energía libre promedio de complejación del huésped. En contraste, los anfitriones conformacionalmente móviles son más usados en aplicaciones de reconocimiento por sus rápidos tiempos de respuesta, su unión reversible y por la posibilidad de detectar

enlace por medio de conformaciones alteradas, <sup>15</sup> ya que son capaces de ajustarse rápidamente para cambiar las condiciones de complejación y descomplejación. Aunque generalmente tienen menos afinidad intrínseca por su huésped que las moléculas conformacionalmente rígidas.

### **3. 3. Reconocimiento de carboxilatos por grupos amonio**

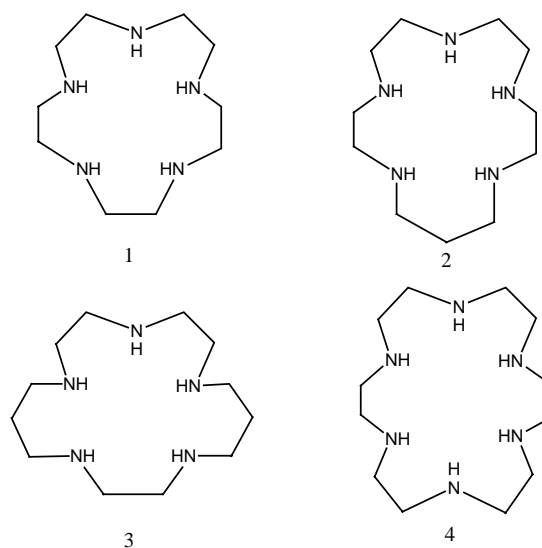
#### *3.3.1 Macrociclos*

Para el reconocimiento de aniones carboxilato se ha empleado un gran número de moléculas como posibles receptores. Los receptores sintéticos y semisintéticos de reconocimiento de aniones carboxilato están usualmente basados en grupos neutros donadores de hidrógeno como las amidas, ureas, tioureas y pirroles y aminoácidos naturales (receptores biomiméticos), <sup>17</sup> o bien, en grupos cargados guanidino o amonio.

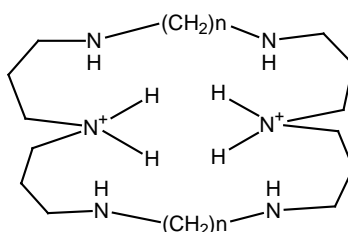
La interacción entre un carboxilato y una amina protonada representa el método más simple para la unión de un anión carboxilato. Macrociclos simples con grupos poliamonio, son considerados como receptores pobremente organizados y que cuentan con una selectividad moderada para cadenas largas de  $\alpha,\omega$  - dicarboxilatos para obtener grandes selectividades en la unión de  $\alpha,\omega$ -dicarboxilatos, debido a que representan una gran libertad conformacional. <sup>18</sup>

El uso de sales de amonio en el reconocimiento de carboxilatos empezó con los estudios realizados por Kimura y Lehn. Kimura produjo series de pentaaminas 1-3 y hexaaminas macrocíclicas 4, observando la formación de complejos fuertes con tricarboxilatos como el citrato ( $K_a = 55 - 1000 \text{ M}^{-1}$ ). Estos macrociclos protonados

también se unen con dicarboxilatos que tienen pequeñas separaciones entre los dos carboxilatos (succinato, malato y malonato) en una estequiometría 1:1; pero, dicarboxilatos con una separación mayor entre carboxilatos (fumarato, glutarato o aspartato), no forman complejos con los macrociclos; mientras que con monocarboxilatos no se observó unión al receptor macrocíclico.<sup>19, 20</sup>

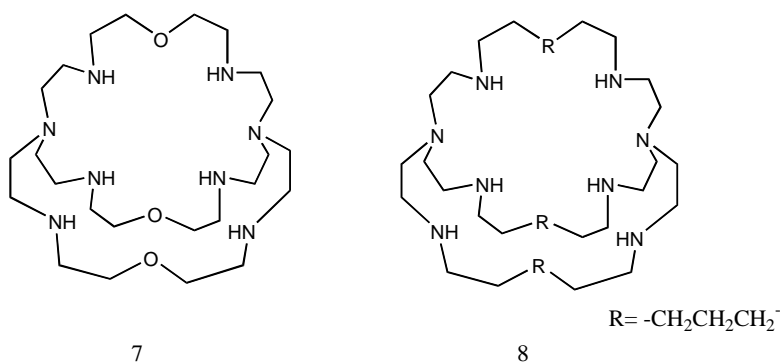


Por otro lado, el grupo de Lehn sintetizó las hexaaminas cíclicas 5 y 6 para reconocer aniones de ácidos dicarboxílicos; el análisis de las estabildades de los complejos con series de dicarboxilatos con cadenas de tamaño creciente, reveló un máximo de interacción con huéspedes de tamaño intermedio.<sup>21</sup>

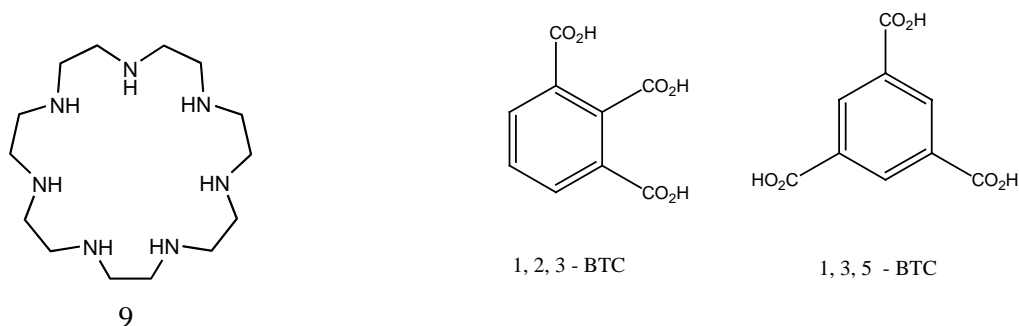


5 n= 7  
6 n= 10

Así también, se sintetizaron los criptandos bicíclicos 7 y 8, los cuales requieren valores de pH bajos para formar las especies penta- o hexaprotonadas. En este estado, obtuvieron especies estables con una variedad de incluso aniones bien solvatados como oxalato, malonato, sulfato en solución acuosa.<sup>21</sup>

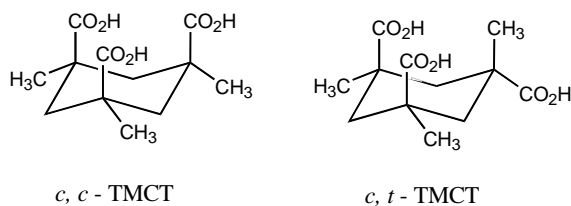


Otra aproximación a este tema, fue considerar las interacciones del macrociclo 9 con el ácido cítrico y con el ácido 1,2,3 – bencentricarboxílico (1,2,3 – BTC), considerado este último como un buen modelo de anión rígido que tiene una forma bien definida en términos de densidad de carga y de enlaces de hidrógeno en su forma protonada. Los resultados, tabla 3, mostraron que existe una clara preferencia por el tricarboxilato aromático sobre el citrato en todo el intervalo de pH de complejación.<sup>22</sup> Las constantes de complejación para 1,2,3- BTC son tres órdenes de magnitud mayores que las del citrato.<sup>14, 22</sup> Esto se debe a que el tricarboxilato aromático tiene una rigidez mayor que en consecuencia da una localización mejor de la carga en el anión. El estudio calorimétrico de complejos de estos tricarboxilatos demostró que son en general estabilizados por contribuciones entrópicas favorables cuando los sustratos están completamente desprotonados y por contribuciones entálpicas para sustratos protonados.<sup>14</sup>

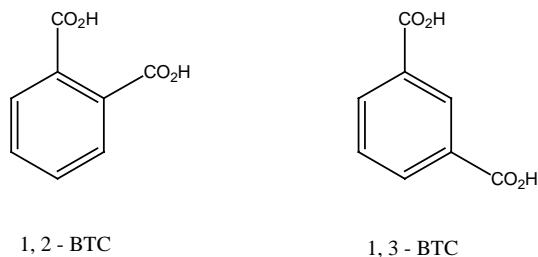


Si los factores electrostáticos fueran los que gobiernan la formación del complejo entre el receptor 9 y los tricarboxilatos 1, 2, 3 – BTC (1, 2, 3 – bencentricarboxilato) y 1, 3, 5 – BTC (1, 3, 5 – bencentricarboxilato), no habría diferencias substanciales en las constantes de estabilidad. Sin embargo, el complejo formado entre el 1, 3, 5 – BTC y el receptor 9 en su forma protonada, tiene un valor de  $K_{assn}$  mayor que el complejo formado entre el 1, 2, 3 – BTC y el receptor 9. Los estudios de modelado molecular mostraron que la formación del complejo entre 9 y 1, 2, 3 – BTC<sup>20</sup>, requiere de un plegamiento del receptor, que resulta ser desfavorable, dando como resultado una buena complementariedad entre el 1, 3, 5 – BTC y el receptor 9, debido a un mejor acomodo estructural de las cargas en 1, 3, 5 – BTC.

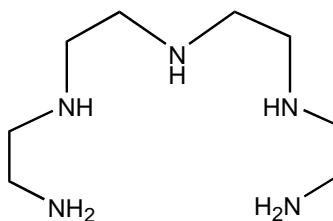
Con los huéspedes *c, c* – TMCT (*c, c* – trimetilcarboxilato) y *c, t* – TMCT (*c, t* – trimetilcarboxilato)<sup>23</sup>, que son menos rígidos que 1, 2, 3 – BTC y 1,3, 5 – BTC, se observó una clara preferencia del receptor 9 por el *c, c* – TMCT, presentando constantes de estabilidad mayores ( $\log K_{c,c-TMCT} = 15.7$   $\log K_{c,t-TMCT} = 11.7$ ), tabla 3. Esto se debe a que los carboxilatos de este trianión se encuentran en posiciones axiales, mientras que en el *c,t* – TMCT uno de los carboxilatos se encuentra en posición ecuatorial, lo cual le confiere al *c,c* – TMCT una mejor organización de sus cargas negativas, que hacen que tenga una mejor interacción con el receptor 9.



Para los dicarboxilatos 1, 2 – BDC (1, 2 – bencendicarboxilato) y 1, 3 – BDC (1, 3 – bencendicarboxilato), se observó que estos dianiones forman complejos más estables que el trianión citrato (tabla 3), a pesar de que tienen una carga total menor. Este comportamiento se debe a que el anfitrión con grupos amonio se comporta como una superficie de carga plana, que coincide con los grupos carboxilato de los aniones aromáticos rígidos.



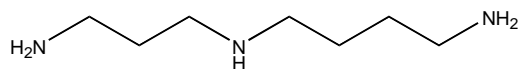
Por otro lado, el receptor acíclico 10 mostró ser un receptor pobre formando complejos con citrato ( $K_{\text{assn}} = 30 \text{ M}^{-1}$ ), tabla 3. Los aniones que se complejan más fuerte son usualmente los pequeños, con selectividad de unión para dicarboxilatos como los oxalatos > malonato > succinato > malato > fumarato, mostrando que aunque las sales cuaternarias de amonio tienen selectividad geométrica para algunos fragmentos, aunque es menos pronunciada comparada con los macrociclos.<sup>19, 20</sup>



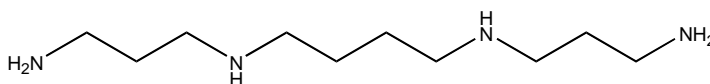
10

Otro grupo de poliaminas alifáticas que se han sido estudiadas por De Robertis et. al., en donde hace un estudio detallado de la formación de los complejos de poliaminas alifáticas como la espermidina (*spd*), 11, y la espermina (*sper*), 12, con diferentes

aniones inorgánicos y aniones orgánicos como malato, malonato, oxalato y citrato, entre otros.<sup>7</sup> Se observó que las constantes de estabilidad de los complejos formados incrementaban su valor conforme al grado de protonación de los grupos amino del anfitrión aumentaba, tabla 3. También se observó, que los valores de las constantes de estabilidad para los complejos formados con aniones inorgánicos son mayores que los formados con aniones orgánicos. Por otro lado, la estabilidad de especies ternarias para los sistemas 12 – *tartrato*, 12 – *malato* y 12 – *citrato* es alta y alcanza su máximo cuando los receptores se encuentran completamente protonados; además, la estabilidad se incrementa con el aumento de la carga del anión. Cabe destacar, que en todos los casos, los valores de las constantes de asociación de los aniones orgánicos con los receptores 11 y 12, son menores a los valores de las constantes de asociación de los aniones inorgánicos con la misma carga.<sup>7</sup>

N - (3-aminopropil)-1, 4-daminobutano (espermidina, *spd*)

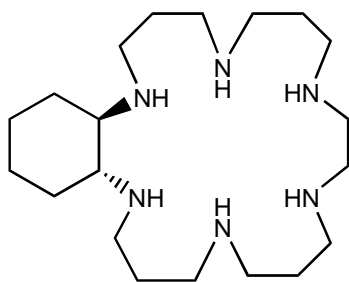
11

N, N'-bis(3-aminopropil)-1, 4-diaminobutano (espermina, *sper*)

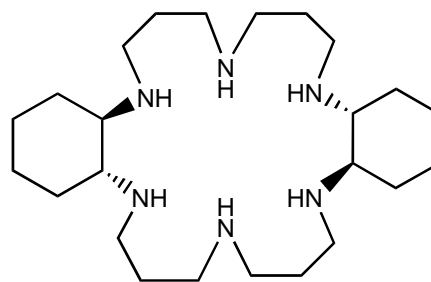
12

A pesar de la importancia de la quiralidad en los organismos vivos, los ligantes que complejen selectivamente aniones quirales son escasos; por ejemplo, las ciclodextrinas han mostrado por si mismas ser excelentes ligantes para el reconocimiento quiral, pero sólo presentan selectividades discretas, mientras que las safirinas han sido usadas exitosamente para el reconocimiento y transporte de aspartato y derivados de glutamato.

Por otro lado, Lehn et. al. muestran que los azamacrociclos 13 y 14 son capaces de formar complejos estables con diferentes dicarboxilatos quirales. El receptor 14 forma complejos más estables que 13 con huéspedes como  $D$  - malato y  $D$  - tartrato que con sus correspondientes isómeros  $L$ , tabla 3. Asimismo, se observó que la selectividad enantiomérica depende del grado de protonación de los receptores, formándose complejos más estables conforme el grado de protonación del receptor aumenta. La estequiometría de estos complejos puede ser 1:1 ó 1:2 dependiendo del número de protones y del enantiómero aniónico.<sup>24</sup>



13



14



**Tabla 3.** Constantes de estabilidad de complejos de carboxilatos con receptores con grupos amonio en agua a 25°C.

Receptor (R)	Carboxilato (L)	log K, M <sup>-1</sup>	Fuerza iónica (I), M	Receptor (R)	Carboxilato (L)	log K, M <sup>-1</sup>	Fuerza iónica (I), M
R= 1 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= cit L <sup>3-</sup>	1.74	0.2				
R= 2 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= cit L <sup>3-</sup>	2.4	0.2	R= 2 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= suc L <sup>2-</sup>	2.08	0.2
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= maln L <sup>2-</sup>	1.82	0.2	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= mal L <sup>2-</sup>	1.82	0.2
R= 2 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= malt L <sup>2-</sup>	1.88	0.2				
R= 3 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L=cit L <sup>3-</sup>	3	0.2	R= 3 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= suc L <sup>2-</sup>	1.96	0.2
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= maln L <sup>2-</sup>	1.4	0.2	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= mal L <sup>2-</sup>	1.41	
R= 4 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= cit L <sup>3-</sup>	2.38	0.2	R= 4 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= suc L <sup>2-</sup>	1.25	0.2
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= maln L <sup>2-</sup>	1.52	0.2	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= mal L <sup>2-</sup>	1.77	0.2
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L= malt L <sup>2-</sup>	1.46	0.2				
R= 5 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= mal L <sup>2-</sup>	3.8		H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= suc L <sup>2-</sup>	4.3	
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= glu L <sup>2-</sup>	4.4					
R= 6 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= mal L <sup>2-</sup>	4.05		H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L=suc L <sup>2-</sup>	3.15	
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L=glu L <sup>2-</sup>	3.3					
R= 7 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= ox L <sup>2-</sup>	4.95	NaOTos 0.1	R= 7 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= maln L <sup>2-</sup>	3.10	NaOTos 0.1
R=8 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= ox L <sup>2-</sup>	4.50	NaOTos 0.1	R= 8 H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L= maln L <sup>2-</sup>	2.85	NaOTos 0.1
R= 9 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup> H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup> H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup> H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup> H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L= 1, 3, 5 - BTC <sup>a</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup>	3.1 4.6 6.2 8.0 10.0	NaClO <sub>4</sub> 0.15 0.15 0.15 0.15	R= 9 H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup> H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup> H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup> H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup> H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L= 1, 2, 3 - BTC <sup>a</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup> L <sup>3-</sup>	3.2 5.2 8.2 11.0 12.7	NaClO <sub>4</sub> 0.15 0.15 0.15 0.15

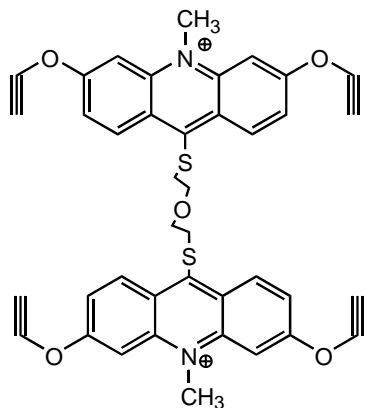
	<b>L= c, c -</b> <b>TMCT<sup>a</sup></b>		NaClO <sub>4</sub>		<b>L= c, t -</b> <b>TMCT<sup>a</sup></b>		NaClO <sub>4</sub>
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	3.4	0.15	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	2.5	0.15
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	5.2	0.15	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	4.0	0.15
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>3-</sup>	8.6	0.15	H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>3-</sup>	6.6	0.15
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>3-</sup>	12.9	0.15	H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>3-</sup>	9.7	0.15
H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L <sup>3-</sup>	15.7	0.15	H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L <sup>3-</sup>	11.7	0.15
	<b>L= 1, 2 -</b> <b>DBC<sup>a</sup></b>		NaClO <sub>4</sub>		<b>L= 1, 3 -</b> <b>DBC<sup>a</sup></b>		NaClO <sub>4</sub>
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	3.1	0.15	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	3.0	0.15
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	4.5	0.15	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	3.9	0.15
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>3-</sup>	6.2	0.15	H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>3-</sup>	5.1	0.15
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>3-</sup>	8.2	0.15	H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>3-</sup>	6.8	0.15
H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L <sup>3-</sup>	9.5	0.15	H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L <sup>3-</sup>	8.4	0.15
	<b>L= cit</b>		NaClO <sub>4</sub>				
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>						
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	2.7	0.15				
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>3-</sup>	4.6	0.15				
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>3-</sup>	6.6	0.15				
H <sub>7</sub> R <sup>7+</sup>	L <sup>3-</sup>	8.1	0.15				
<b>R= 10</b>	<b>L=cit</b>						
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	1.48	0.2				
<b>R= 11</b>	<b>L= tar</b>			<b>R= 11</b>	<b>L= mal</b>		
HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.35	0	HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.1	0
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.1	0	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.7	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.9	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.7	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>-</sup>	1.3	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>-</sup>	1.2	0
	<b>L= glu</b>				<b>L= cit</b>		
HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.3	0	HR <sup>+</sup>	L <sup>3-</sup>	1.3	0
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.0	0	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>3-</sup>	2.6	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>-</sup>	1.3	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	4.1	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>-</sup>	1.6	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>2-</sup>	2.7	0
				H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	H <sub>2</sub> L <sup>-</sup>	1.2	0
<b>R= 12</b>	<b>L= tar</b>			<b>R= 12</b>	<b>L= mal</b>		
HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.9	0	HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.6	0
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.8	0	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.5	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.6	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.25	0
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.3	0	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.0	0
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>-</sup>	2.9	0	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>-</sup>	2.4	0
RLH <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.2	0	RLH <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.1	0
	<b>L= cit</b>						
HR <sup>+</sup>	L <sup>3-</sup>	2.4	0				
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>3-</sup>	3.5	0				
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>3-</sup>	4.7	0				
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>3-</sup>	5.9	0				
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>2-</sup>	4.1	0				
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	H <sub>2</sub> L <sup>-</sup>	2.6	0				
RLH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	L <sup>3-</sup>	2.4	0				
<b>R= 13</b>	<b>L= D - tar</b>		<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>	<b>R= 13</b>	<b>L= L - tar</b>		<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.49	0.1	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.01	0.1
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.92	0.1	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.33	0.1
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.34	0.1	H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.71	0.1
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.10	0.1	H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.49	0.1
	<b>L= D - mal</b>		<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>		<b>L= L - mal</b>		<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>			H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>		
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.71	0.1	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.92	0.1

H <sub>3</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.64	0.1	H <sub>3</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.79	0.1
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.5	0.1	H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.47	0.1
<b>R= 14</b>							
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.29	0.1	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.09	0.1
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.89	0.1	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.71	0.1
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.6	0.1	H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.49	0.1
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.27	0.1	H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.08	0.1
<b>L= <i>D</i> - tar<sup>2-</sup></b>				<b>L= <i>L</i> - tar<sup>2-</sup></b>			
<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>				<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>			
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	1.57	0.1	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.09	0.1
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.23	0.1	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.53	0.1
H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	5.38	0.1	H <sub>5</sub> R <sup>5+</sup>	L <sup>2-</sup>	5.32	0.1
H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>			H <sub>6</sub> R <sup>6+</sup>	L <sup>2-</sup>		
<b>L= <i>D</i> - mal<sup>2-</sup></b>				<b>L= <i>L</i> - mal<sup>2-</sup></b>			
<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>				<b>Me<sub>4</sub>NCl</b>			

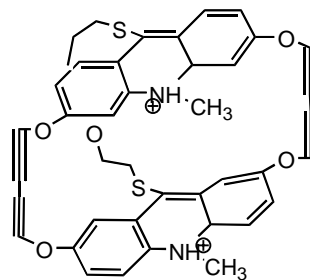
<sup>a</sup> 1,3,5-BTC (1,3,5-bencentricarboxilato); 1,2,3-BTC (1,2,3-bencentricarboxilato); 1,2-DBC (1,2-bencildicarboxilato); 1,3-DBC (1,3-bencendicarboxilato); *c,c*-TMCT (*c,c*-trimetilcarboxilato); *c,t*-TMCT (*c,t*-trimetilcarboxilato)

### 3. 3. 2. Heterociclos catiónicos

Se han preparado una gran variedad de ciclofanos para la unión de diferentes huéspedes aniónicos en agua por medio de una superposición del efecto hidrofóbico y atracciones electrostáticas. Los aniones carboxilato no han sido una excepción, un ejemplo es el huésped ciclofano acridinio 15<sup>25</sup>, preparado a partir del compuesto 15', el cual se compleja con varios carboxilatos aromáticos en agua, con valores de log  $K_{\text{assn}}$  que van desde 4 hasta 7, tabla 4.<sup>21, 25, 26</sup>



15'

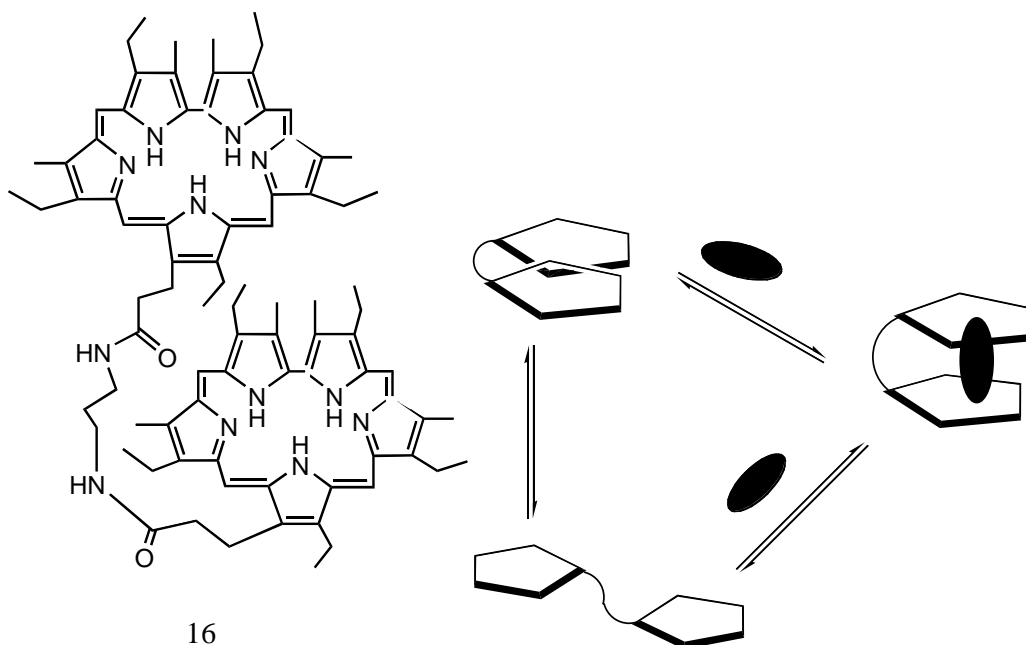


15

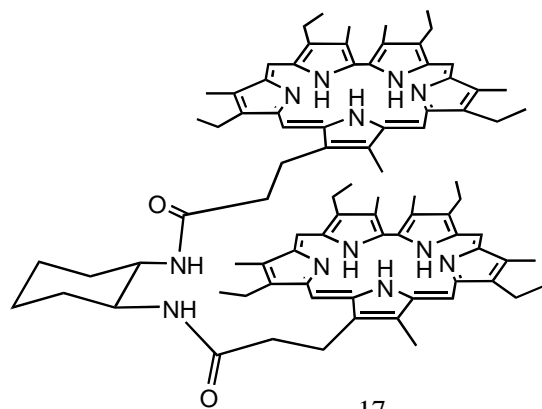
En estos complejos, el huésped se encuentra complejado en un tipo sandwich entre las paredes aromáticas del anfitrión. Las constantes de unión casi no se ven afectadas por el tamaño de la carga negativa del huésped, porque está estabilizado por las interacciones hidrofóbicas y el apilamiento  $\pi$  en esta clase de anfitriones. Sin embargo, los ciclofanos de cadena abierta, no tienen la afinidad por los policarboxilatos aniónicos como sus congéneres cíclicos.

### *3. 3. 3. Receptores derivados de oligopirroles*

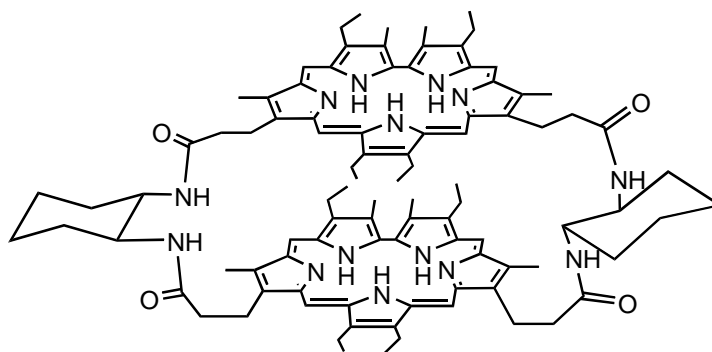
La expansión de la cavidad de la porfirina por la incorporación de más grupos pirroles u otras especies espaciadoras aparenta ser un remedio para aumentar la afinidad de estas moléculas para unir aniones. Siguiendo esta línea, el grupo de Sessler preparó una gran variedad de porfirinas de anillo extendido, a las que llamó safirinas, las cuales mostraron tener propiedades para unir aniones. Las safirinas constan de dos unidades macrocíclicas formando un dímero. El compuesto 16 presenta afinidad por aniones dicarboxilatos, tabla 4, en disolventes próticos polares como metanol.<sup>21, 27</sup> Este anfitrión interactúa con los dicarboxilatos *via* la formación de un complejo tipo “sandwich”, en el que los dicarboxilatos están entre los dos macrociclos de safirina. Asimismo, se observó que el receptor 16 tiene una preferencia mayor por los dicarboxilatos aromáticos que por los lineales; atribuido a una estabilización extra derivada de la interacción  $\pi - \pi$  y del enlace de hidrógeno  $C - H \cdots \pi$  y  $C - H \cdots N$  que existe entre los anillos de la safirina y el dicarboxilato aromático para formar un complejo safirina – dicarboxilato muy estable.<sup>27</sup>



En los complejos de safirinas con dicarboxilatos, la estructura cristalina revela que justo un oxígeno del anión carboxilato tiene interacción con un hidrógeno de un grupo aminonio de la safirina.<sup>20</sup> Esta interacción, se ha usado para el ensamble del complejo carboxilato – safirina, en una estequiometría 1:1, ( $K_{assn} = 2.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) en  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ . A su vez, los dímeros 17 y 18 se unieron fuertemente a un número modesto de dicarboxilatos, presentando también un modelo de unión tipo “sandwich” y además mostraron una modesta enantioselectividad con *N* – Cbz aspartato como huésped en una solución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con 5% de metanol.<sup>20, 27</sup>



17



18

**Tabla 4.** Constantes de estabilidad de complejos de carboxilatos con receptores derivados de heterociclos catiónicos y oligopirroles a 25°C.

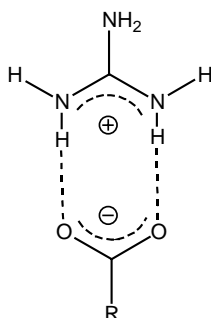
Receptor (R)	Carboxilato (L)	log K, M <sup>-1</sup>	Disolvente	Receptor (R)	Carboxilato (L)	log K, M <sup>-1</sup>	Disolvente
R= 15' (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= tereftal L <sup>2-</sup>	4.70		R= 15' (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L=2,6-NDC <sup>c</sup> L <sup>2-</sup>	5.21	
R= 15 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= ftal L <sup>2-</sup>	3.28		R= 15 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= isoftal L <sup>2-</sup>	3.75	
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= tereftal L <sup>2-</sup>	4.00		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= 2,6-NDC <sup>c</sup> L <sup>2-</sup>	4.59	
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= 1,3,5-BTC L <sup>2-</sup>	3.5		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= bz L <sup>2-</sup>	3.45	
R= 16 H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= ftal L <sup>2-</sup>	K <sub>1</sub> = 2.49 K <sub>2</sub> = 2.45	Metanol	R= 16 H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= tereftal L <sup>2-</sup>	3.66	Metanol
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= isoftal L <sup>2-</sup>	K <sub>1</sub> = 3.38 K <sub>2</sub> = 3.40	Metanol	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L= bz L <sup>2-</sup>	K <sub>1</sub> = 3.14 K <sub>2</sub> = 3.18	Metanol
	L= ox				L= maln		

H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.41	Metanol	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.65	Metanol
<b>R= 17</b>	<b>L= N-Cbz-L- Asp<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>			<b>R= 17<sup>b</sup></b>	<b>L= N-Cbz-D- Asp<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>		
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>		4.65	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>		4.59	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	<b>L= N-Cbz-L- Glu<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>	5.05		H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	<b>L= N-Cbz-D- Glu<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>	5.08	
<b>R= 18</b>	<b>L= N-Cbz-L- Asp<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>			<b>R= 18</b>	<b>L= N-Cbz-D- Asp<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>		
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>		4.22	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>		3.99	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	<b>L= N-Cbz-L- Glu<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>	3.58	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	<b>L= N-Cbz-D- Glu<sup>a</sup> L<sup>2-</sup></b>	4.21	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 5% metanol

<sup>a</sup> 2,6-NDC (2,6-naftalen dicarboxilato); N-Cbz-L-Asp (N-carbobenziloxi-L-aspartato); N-Cbz-D-Asp (N-carbobenziloxi-D-aspartato); N-Cbz-L-Glu (N-carbobenziloxi-L-glutamato); N-Cbz-D-Glu (N-carbobenziloxi-D-glutamato)

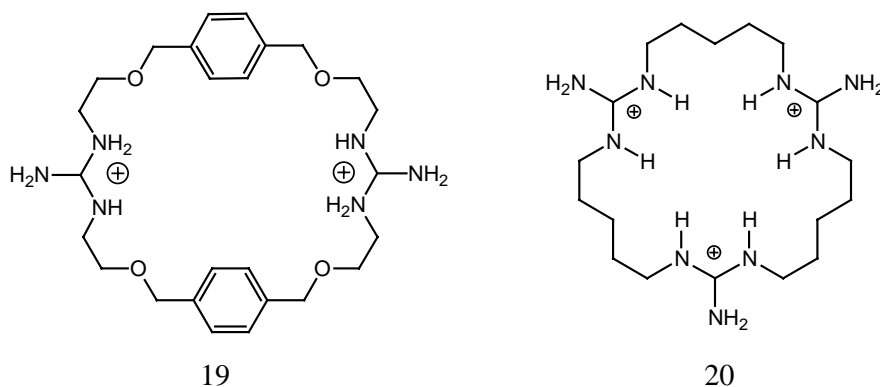
### 3. 3. 4. Receptores con grupos guanidinio

Las razones de la interacción fuerte entre el grupo guanidinio y los aniones con geometría tetraédrica está en el peculiar patrón de unión del grupo guanidinio, en el que los dos hidrógenos de las aminas se encuentran paralelos lo que permite que exista una atracción electrostática fuerte entre el receptor y el huésped; figura 2. De hecho, este patrón se encuentra en muchas estructuras cristalinas de complejos de enzimas (que tienen un grupo guanidinio) con sustratos aniónicos. Otra característica que hace al guanidinio un buen grupo para el diseño de receptores artificiales es que la guanidina tiene un valor de basicidad alto ( $pK_a = 13.5$ ), lo que garantiza la protonación en un intervalo amplio de pH. Sin embargo, el grupo guanidinio presenta una baja densidad de carga comparado con otras bases de amonio usadas como receptores, además de que se solvata efectivamente en agua.<sup>20</sup>



**Figura 2.** Modo de enlace de los carboxilatos a los grupos guanidinio que han sido observadas en diferentes estructuras de rayos X.

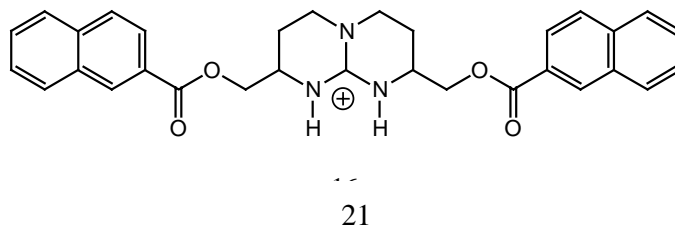
Los primeros ejemplos fueron los informados por Lehn, quien sintetizó los compuestos 19 y 20 que mostraron una complejación débil con el ion  $\text{PO}_4^{3-}$  en la mezcla metanol/agua, la cual se pensó que estaba gobernada por interacciones electrostáticas. Esto fue confirmado al observar que la selectividad del huésped era dependiente de la densidad de carga de los aniones y que la unión de fosfatos y carboxilatos estaba influenciada por el macrociclo así como por el efecto quelato.<sup>21, 28</sup>



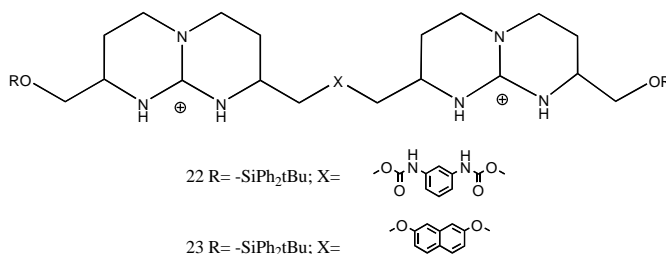
Más tarde, la introducción de guanidinas bicíclicas dió pie a la explotación de sus propiedades quirales para el reconocimiento enantioselectivo. Uno de los primeros en informar estas propiedades fue Mendoza, quien agregó sustituyentes aromáticos a una guanidina bicíclica para dar el receptor 21 en disolventes más competitivos como agua. El receptor 21 extrajo dicarboxilatos como succinato o fumarato, pero no monocarboxilatos, en fase orgánica.<sup>29</sup> Los huéspedes carboxílicos pueden interactuar en dos diferentes sitios de reconocimiento, encontrándose que las interacciones que



gobiernan la formación del complejo era la formación del par iónico guanidinio – carboxilato y el apilamiento aromático  $\pi$ .<sup>21</sup>



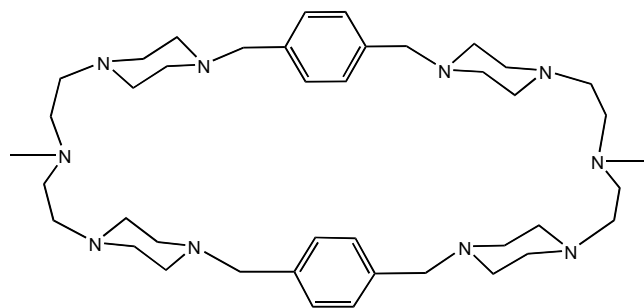
Con el éxito del grupo guanidinio bicíclico en el reconocimiento de aniones, se vislumbró la posibilidad de sintetizar receptores más poderosos, aprovechando la quiralidad de las partes guanidinio que pudieran asociarse a moléculas huéspedes tetraédricas en disolventes más competitivos como agua. El receptor 22, el cual extrae dicarboxilatos como succinato o fumarato, pero no monocarboxilatos en fase orgánica. En series de dicarboxilatos con variación en la longitud de la cadena, 23 mostró una preferencia marcada para enlazar malonato sobre análogos más cortos o más largos. En este caso, el malonato permite la orientación óptima de los dos sitios de reconocimiento y causa una selectividad geométrica no esperada. Sin embargo, al examinar la influencia del espaciador entre las guanidinas bicíclicas, se observó que la flexibilidad del espaciador no tiene un papel importante en el enlace del huésped.



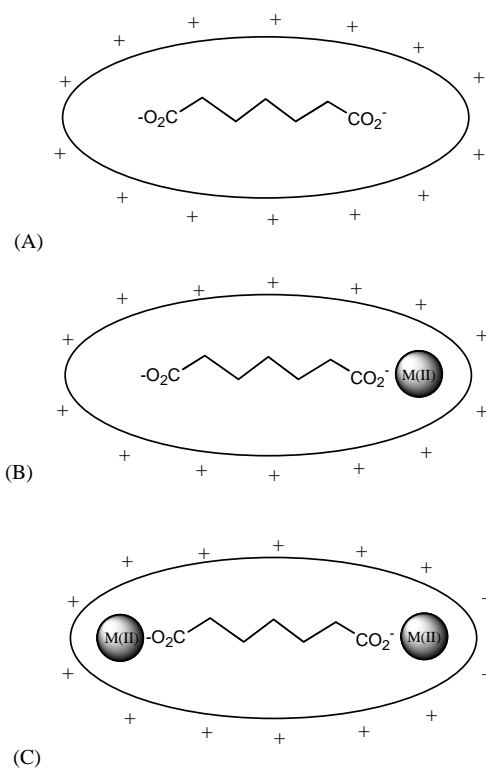
### *3. 3. 5. Complejos metálicos como receptores de dicarboxilatos*

Los complejos metálicos presentan características de ácidos de Lewis si son coordinativamente insaturados o si tienen posiciones ocupadas por ligantes lábiles que puedan ser reemplazados fácilmente. Si esto ocurre, los complejos metálicos son capaces de interactuar con bases de Lewis como los aniones. Esta estrategia ha sido usada por la naturaleza en las metaloenzimas para la fijación y activación de varios sustratos.

Un ejemplo de complejos metálicos, sintetizados por García – España, que se han usado como receptores de aniones dicarboxilato es el complejo dinuclear de  $\text{Cu}^{2+}$  coordinado al ligante  $\text{Ph}_2\text{Pip}_4\text{Me}_2\text{N}_{10}$ , 24.<sup>14, 30</sup> El macrociclo  $\text{Ph}_2\text{Pip}_4\text{Me}_2\text{N}_{10}$  tiene la cualidad de ser un receptor rígido con centros de coordinación a distancias específicas. Esta cualidad hace que este receptor sea bueno para distinguir entre diferentes  $\alpha,\omega$  - dicarboxilatos, tanto coordinado a uno o dos cationes metálicos, como solo. Utilizando el ácido pimélico, García – España observó que cuando el dicarboxilato interactuaba con el receptor sin metales, la interacción anión – macrociclo protonado es electrostática (modo A, figura 3); por otro lado, cuando el receptor tiene coordinado dos iones  $\text{Cu}^{2+}$  las interacciones que gobiernan al complejo son de coordinación (modo C, figura 3); mientras que cuando el complejo sólo tiene un ion  $\text{Cu}^{2+}$ , las interacciones que predominan son una mezcla entre interacciones electrostáticas y de coordinación (modo B, figura 3).<sup>14</sup>



24



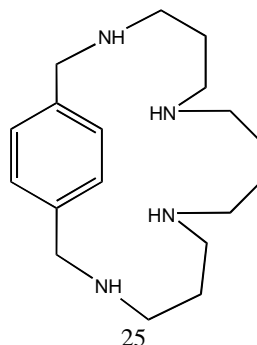
**Figura 3.** Esquema de los modos de interacción del receptor  $\text{Ph}_2\text{Pip}_4\text{Me}_2\text{N}_{10}$  con aniones dicarboxilatos.

### **3. 4. Reconocimiento de fosfatos por grupos amonio**

Los fosfatos son de interés especial debido a su extensa participación en sistemas biológicos.<sup>14</sup> Un ejemplo es la proteína periplasmática PBP, que transporta ortofosfato a través de la membrana celular de algunas bacterias. En esta proteína, el  $\text{HPO}_4^{2-}$  se encuentra desprotonado y protegido por la enzima mediante enlaces de hidrógeno.

Se han informado algunos ejemplos de la formación de complejos con los fosfatos por receptores con grupos amonio en medios acuosos<sup>8, 14, 26</sup>. La mayoría de los receptores usados en solución acuosa, son macrociclos con grupos amonio y polaminas acíclicas, en donde se ha observado que forman complejos con estequiometría 1:1.

El receptor 25 se ha utilizado para formar complejos con fosfatos y pirofosfato, en donde su estabilidad decrece conforme se incrementa la carga del receptor. La estabilidad de estos complejos no está estrictamente regida por interacciones electrostáticas, sino por la cantidad de enlaces de hidrógeno que puedan formar, debido a la habilidad particular de estos aniones para comportarse como donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno. De hecho, los espectros de resonancia magnética nuclear  $\text{H}^1$  y  $\text{C}^{13}$  a varios valores de pH muestran que la formación de complejos con fosfatos y pirofosfatos no altera los patrones de protonación ni la topología de los grupos cargados de los ligantes, y tampoco se modifica la conformación de los receptores protonados.<sup>14</sup> Sólo se observa un desplazamiento modesto debido al incremento de la basicidad del ligante. Esto indica que las partes que intervienen en la formación de complejos son los enlaces de hidrógeno, ya que son enlaces favorables.



La estabilidad de los complejos con fosfatos se debe a que muchas de estas reacciones de complejación son promovidas por contribuciones entrópicas ( $T \Delta S^{\circ} > 0$ ). En los complejos fosfato – receptor poliamonio se presenta la formación de muchos enlaces de hidrógeno, en donde tanto los aniones como los receptores pueden funcionar como aceptores o donadores. El enlace de hidrógeno está determinado por atracciones electrostáticas, aunque una contribución significativa es también debida a transferencias de carga, fuerzas dispersivas y covalentes. En este caso, las contribuciones de transferencia de protones (transferencia de carga) del donador al aceptor puede ser de considerable importancia. Tomando en cuenta que la desprotonación del grupo amonio es una reacción fuertemente endotérmica y la protonación del grupo fosfato es a térmica, la transferencia parcial de protón de la amina al protón involucra contribuciones entálpicas desfavorables ( $\Delta H^{\circ} > 0$ ).

Otros ejemplos informados son con los receptores 11 y 12 y los aniones hidrogenofosfato y pirofosfato, en donde la estabilidad de las especies se incrementa conforme la carga del anión y del receptor aumentan, y por los enlaces de hidrógeno que forman con los receptores, tabla 5.<sup>8</sup>

**Tabla 5.** Constantes de estabilidad de los complejos de hidrogenofosfato y pirofosfato y los receptores 11 y 12, en medios acuosos y a 25°C.

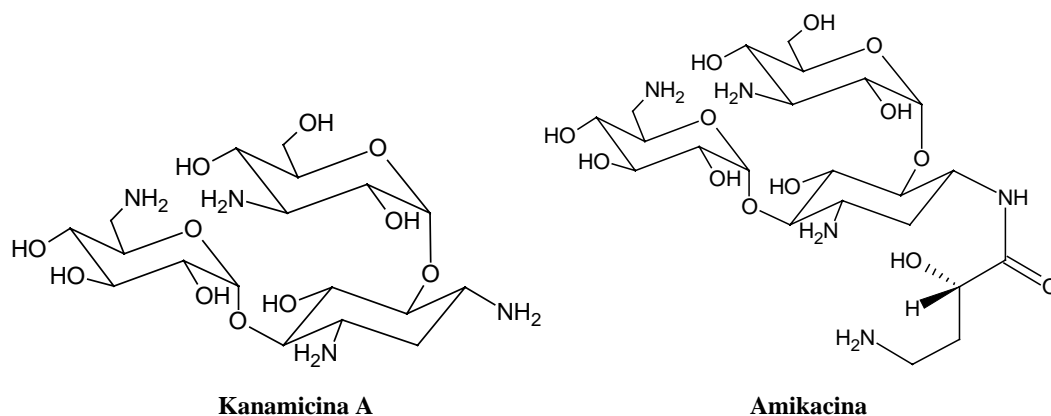
Receptor (R)	Carboxilato (L)	K, M <sup>-1</sup>	Fuerza iónica (I), M	Receptor (R)	Carboxilato (L)	K, M <sup>-1</sup>	Fuerza iónica (I), M
R= 11	L = HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			R= 11	L= P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup>		
HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.3	0	HR <sup>+</sup>	L <sup>4-</sup>	3.4	0
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.4	0	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>4-</sup>	5.3	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.3	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>4-</sup>	7.1	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>-</sup>	1.3	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>3-</sup>	7.0	0
				H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	H <sub>2</sub> L <sup>2-</sup>	4.6	
R= 12	L = HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			R= 12	L= P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup>		
HR <sup>+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.0	0	HR <sup>+</sup>	L <sup>4-</sup>	3.4	0
H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>2-</sup>	2.8	0	H <sub>2</sub> R <sup>2+</sup>	L <sup>4-</sup>	5.3	0
H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>2-</sup>	3.6	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	L <sup>4-</sup>	7.1	0
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	L <sup>2-</sup>	4.5	0	H <sub>3</sub> R <sup>3+</sup>	HL <sup>3-</sup>	7.1	0
H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>-</sup>	2.7	0	H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>3-</sup>	7.4	0
				H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	HL <sup>2-</sup>	6.2	0
				H <sub>4</sub> R <sup>4+</sup>	H <sub>3</sub> L <sup>-</sup>	5.3	0

Sin embargo, hasta el momento no hay ejemplos de complejos con aniones como fenilfosfato y muy pocos con nucleótidos. Uno de los receptores utilizados para el reconocimiento de los nucleótidos es el receptor 15 que forma complejos estables en medios acuosos con GMP (log  $K_{assn}$ =4.09), TMP (log  $K_{assn}$ = 4.05), ADP (log  $K_{assn}$ =3.84) y ATP (log  $K_{assn}$ = 3.91), en donde no se observa la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato y el grupo amonio del receptor debido a que el nitrógeno cargado es una amina que está metilada.

### 3. 5. Amikacina

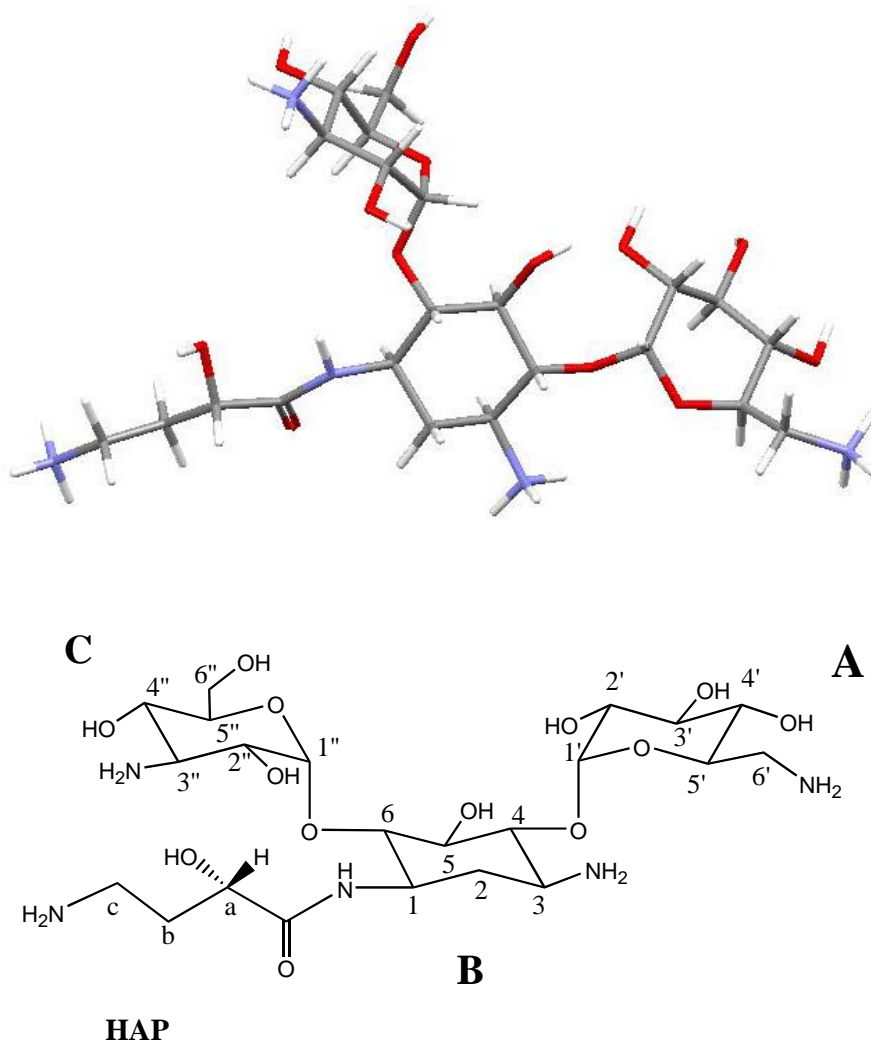
Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos que se unen a los grupos fosfato del ARN. <sup>31</sup> La acción antibiótica de estas moléculas es inhibir el paso de translación en la síntesis de la proteína microbial y subsecuentemente dañar la membrana citoplasmática. En virus, la amikacina inhibe la ruptura del sustrato por medio de la obstrucción de los ribosomas, bloqueando la unión de ciertas proteínas e impidiendo el reconocimiento del ARN viral. <sup>31</sup>

La amikacina es un aminoglucósido derivado de la kanamicina A; figura 4. La cual consta de tres anillos de seis miembros (A, B y C), y el sustituyente hidroxiaminobutiril (HAP); figura 5. La amikacina ha sido investigada por diversas técnicas como RMN y rayos X.



**Figura 4.** Estructuras de aminoglucósidos.

La estructura cristalina de la amikacina muestra que la molécula existe en una conformación extendida, en donde los tres anillos de seis miembros se encuentran en una conformación de silla y están conectados por enlaces  $\alpha$  - glucósidos. La orientación entre los anillos A, B y C de la molécula es mantenida por enlaces intramoleculares de hidrógeno, en los que interviene el oxígeno del grupo hidroxilo del anillo C y el NH del grupo amida. Las conformaciones de los anillos A/B de la amikacina y la torsión de los ángulos alrededor del puente C1' - Oa - C4 son virtualmente idénticos a la kanamicina A; mientras que la unión de los anillos B/C y los ángulos de torsión del puente C y C1'' son significativamente diferentes entre las dos moléculas, lo que sugiere que el reemplazo del grupo  $\text{NH}_2$  por el hidroxiaminobutiril ha modificado los ángulos conformacionales alrededor de la unión del anillo B/C produciendo cambios substanciales.<sup>33</sup>



**Figura 5.** Estructura de rayos X de la molécula de amikacina.

Esta molécula es particularmente usada para combatir cepas resistentes a otros antibióticos. Las propiedades electrostáticas de la amikacina son de particular interés, puesto que la carga de este aminoglucósido influye en su permeabilidad a través de la membrana celular, estableciendo interacciones iónicas entre las cargas positivas de los grupos amonio de la amikacina y las cargas negativas de los grupos fosfato del ARN. La polifuncionalidad de la amikacina radica en ser muy soluble en soluciones acuosas (ya que cuenta con grupos hidrofílicos) y en unirse a diversas moléculas hidrofóbicas facilitando el transporte de éstas en medios acuosos.<sup>32</sup>



Jezowska et. al. al determinó las constantes de protonación de los cuatro grupos amino de la molécula de amikacina, figura 5, por medio de titulaciones potenciométricas. <sup>34</sup>, tabla 6. También demostró, que los grupos amonio de las aminohexosas pueden coordinarse a iones Cu(II) a valores de pH levemente ácidos o neutros, y que la efectividad de la unión, depende de la formación de un anillo quelato de cinco o seis miembros entre el oxígeno del C5 del anillo B, los grupos amonio y el ion metálico que forman complejos a pH 7.

**Tabla 6.** Constantes de protonación de amikacina <sup>34</sup>

Especies	$\log\beta^a$	pK	Localización del grupo amino
H <sub>4</sub> A	33.43 (2)	6.83	Anillo B
H <sub>3</sub> A	26.60 (2)	7.81	Anillo C
H <sub>2</sub> A	18.79 (2)	8.89	Anillo A
HA	9.90 (2)	9.90	Cadena Hidroxiaminobutiril

$$^a \beta(H_xA) = [H_xA]/[A][H]^x$$

Debido a la afinidad biológica que presenta la amikacina por aniones con geometría tetraédrica (como los iones fosfato) y por iones metálicos como Cu(II), así como su conformación semirígida que le da una forma específica y su alta solubilidad en agua, es factible que este aminoglucósido pueda reconocer polianiones como dicarboxilatos. Por lo que en este trabajo se hace el estudio del reconocimiento molecular de fosfatos y carboxilatos utilizando amikacina.

## **4. Objetivos**

### **Objetivo General**

Realizar estudios de reconocimiento molecular entre el anfitrión semisintético amikacina y diferentes carboxilatos y fosfatos, para determinar los factores estructurales responsables de dicha asociación.

### **Objetivos Específicos**

- ❖ Determinar las constantes de protonación de la amikacina y los huéspedes empleados.
- ❖ Determinar las constantes de asociación entre amikacina y los huéspedes carboxilatos y fosfatos, mediante el uso de técnicas potenciométricas.
- ❖ Elucidar las especies presentes en el reconocimiento y la estructura de los complejos formados.
- ❖ Comprender los factores estructurales responsables del reconocimiento molecular de la molécula anfitrión con los huéspedes seleccionados.

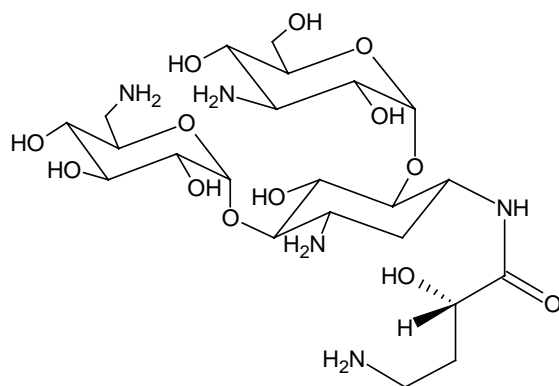
## **5. Procedimiento experimental**

### **5. 1. Sustancias empleadas, reactivos y programas**

#### *5. 1. 1. Reactivos*

##### *Anfitrión*

Se empleó como anfitrión amikacina dihidratada Fluka, 98% de pureza. Las disoluciones del anfitrión fueron preparadas a partir de disoluciones estándar independientes de amikacina 0.05M, que fueron preparadas pesando la cantidad calculada para obtener dicha concentración y después disolviendo en agua desionizada y aforando en un matraz volumétrico de 25mL. Las soluciones que se utilizaron para las titulaciones fueron preparadas y valoradas por métodos estándares y bajo burbujeo de N<sub>2</sub>: con dos equivalentes de amikacina, ocho equivalentes de HCl y usando NaOH como solución valoradora a una fuerza iónica constante de 0.1 M de NaCl.



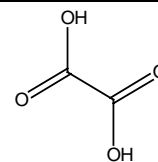
**Amikacina**

Huéspedes

Las disoluciones estándar de los huéspedes, tabla 7, fueron preparadas disolviendo el ácido o bien la sal de sodio (para estos casos se agregaron dos equivalentes de HCl para obtener la forma protonada) en agua pura, manteniendo una fuerza iónica constante de 0.1M con NaCl. Las disoluciones de los huéspedes fueron valoradas por métodos estándares, bajo burbujeo de N<sub>2</sub> con NaOH, con el fin de obtener los valores de p*K*<sub>a</sub> de cada uno de los huéspedes a las condiciones de temperatura y fuerza iónica de esta tesis.

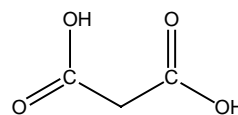
**Tabla 7.** Huéspedes empleados.

Ácido Oxálico, dihidratado  
J. T. Baker 99.9%  
Peso molecular 126.07 g/mol



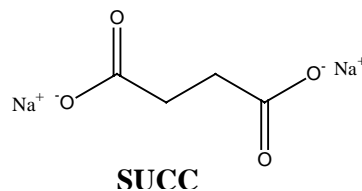
**OXAL**

Ácido Malónico  
Aldrich 99%  
Peso molecular 104.06 g/mol

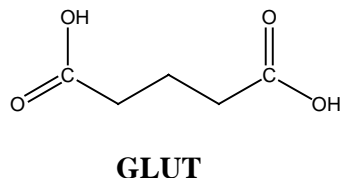


**MALN**

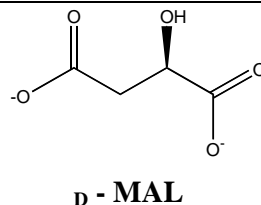
Succinato, sal de sodio  
Aldrich 99%  
Peso molecular



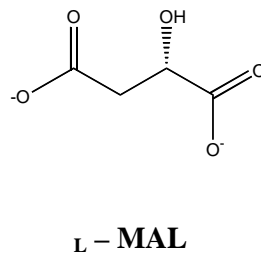
Ácido Glutámico  
Aldrich 99%  
Peso molecular 132.12 g/mol



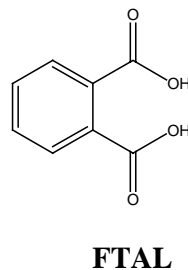
D (+) málico, Ácido<sub>D</sub> –  
Hidroxibutanodiónico  
Aldrich 98 – 100%  
Peso molecular 134.1 g/mol



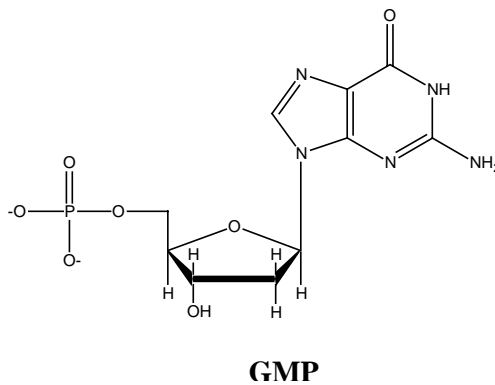
L (-) málico, Ácido<sub>L</sub> –  
Hidroxibutanodiónico  
Fluka >99.5 %  
Peso molecular 134.1 g/mol



Ácido Ftálico  
Merck 99.5%  
Peso molecular 166.13 g/mol

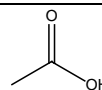


Guanosina 5' – monofosfato, sal de sodio  
Fluka, >99%  
Peso molecular 407.18 g/mol



---

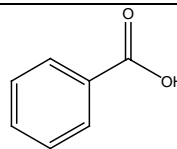
Ácido Acético Glacial  
Mallinckrodt



**AcOH**

---

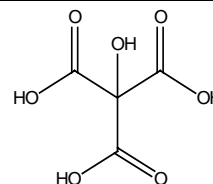
Ácido Benzoico  
Recristalizado  
Peso molecular 122.05 g/mol



**Bz**

---

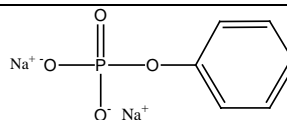
Ácido Cítrico  
PQF 99.5%  
Peso molecular 192.13 g/mol



**CIT**

---

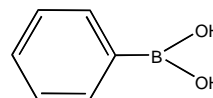
Fenilfosfato, sal de sodio  
Merck, 99.3%  
Peso molecular 254.09 g/mol



**PhP**

---

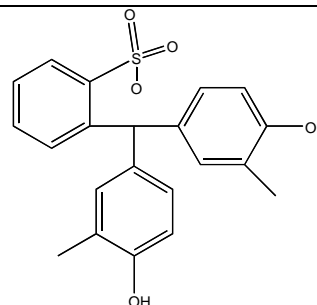
Ácido fenilborónico,  
Aldrich  
Peso molecular 121.9 g/mol



**PhB**

---

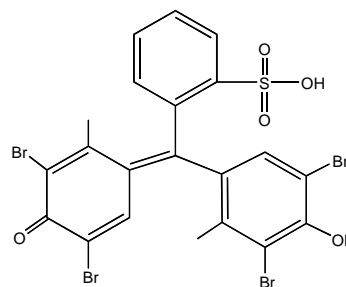
Cresol Rojo  
Aldrich, Grado indicador  
Peso molecular 382.43 g/mol



**CR**

---

Bromocresol verde  
Aldrich, Grado reactivo  
Peso molecular 698.04 g/mol



**BCG**

---

Los huéspedes utilizados en los estudios espectrofotométricos por UV/Vis, con el fin de saber si era posible formación de complejos con amikacina feron: bromocresol verde (**BCG**) y fenol rojo (**PhR**), los cuales tienen una carga negativa deslocalizada en los centros aromáticos.

### H<sub>2</sub>O

En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada, con una resistividad de  $18.2 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\text{cm}$ , obtenida mediante el sistema Barnstead Nanopure.

#### *5. 1. 2. Equipo*

Las mediciones de pH se hicieron con un potenciómetro digital Orion Model 710 – A (con precisión de  $\pm 0.005$  unidades de pH), utilizando un electrodo de vidrio Orion ROSS™ pH Electrode. Las mediciones de pD en los experimentos de titulaciones por resonancia magnética nuclear se utilizó un semi – microelectrodo Orion ROSS™ y un potenciómetro Orion Model 420 A (con una precisión de  $\pm 0.01$  unidades de pH). La temperatura de las disoluciones se verificó con un termómetro digital Digi – Thermo ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). Para la calibración de los potenciómetros se utilizaron amortiguadores de referencia a  $25^\circ\text{C}$ , pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión  $\pm 0.01$ ). Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura utilizando un baño de recirculación de agua Fisher Scientific Isotemp 1016S ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ).

Los experimentos de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  se realizaron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz de la Unidad de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM; y en el espectrómetro Varian UNITY INOVA de 400 MHz del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Por último, las mediciones espectrofotométricas en el visible, se realizaron en un equipo Hewlett Packard 8453 (ventana espectral 190 – 1100 nm y resolución de 1nm de una precisión de longitud de onda de  $<\pm 0.005 \text{ \AA}$  a  $1 \text{ \AA}$ ), con arreglo de diodos y equipado con un compartimiento termostataado con sistema Peltier HP 89090 ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y volumen de 3 mL.

### *5. 1. 3. Programas*

Para los ajustes por regresión lineal y no lineal por el método de mínimos cuadrados se empleó el programa Microcal™ Origin™ versión 5.0 de Microcal Software, Inc. Las constantes de equilibrio fueron calculadas utilizando el programa Hyperquad 2000 versión 2.1 NT. Los diagramas de distribución de especies fueron generados usando las constantes determinadas en el programa Hyss Academic Software 1999 K. J. Powell. Los estudios de modelado molecular de la interacción de los carboxilatos y fosfatos con amikacina fueron realizados mediante el programa GAUSSIAN 03, utilizando el método semiempírico PM3 para la optimización de la geometría del receptor, de los huéspedes y de los complejos.



## **5. 2. Técnicas empleadas**

### *5. 2. 1. Estandarización de las disoluciones*

En los experimentos de titulaciones potenciométricas se utilizaron disoluciones de hidróxido de sodio libre de carbonatos. Lo mismo ocurrió para la solución de deuteróxido de sodio utilizada para las titulaciones en RMN  $^1\text{H}$ . La concentración de la solución titulante fue determinada valorando con HCl 0.0936M, previamente estandarizado por triplicado con tetraborato de sodio decahidratado. Para cada disolución, se hicieron al menos tres determinaciones utilizando un potenciómetro y un electrodo de vidrio para conocer el punto de equivalencia.

### *5. 2. 2. Estudio potenciométrico*

Todas las titulaciones potenciométricas se hicieron en una celda de vidrio de 25mL, termostatada a 25 °C y con burbujeo constante de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de CO<sub>2</sub> en la disolución, ya que la presencia de carbonatos dificultaba el alcance del equilibrio en el electrodo después de cada adición del titulante. Se prepararon disoluciones de concentraciones conocidas de amikacina (2mM) y anión (2mM ó 4mM), manteniendo una fuerza iónica de 0.1M con NaCl y se tituló agregando cantidades de 30, 50 ó 80 µL de NaOH con una pipeta Eppendorf Research 2000. Las titulaciones se realizaron desde valores de pH de 2.5 hasta 11.

El potenciómetro se calibró usando soluciones amortiguadoras de referencia a 25 °C, pH 4.00, 7.00 y 10.00 en agua. Sin embargo, las soluciones utilizadas para la calibración de los electrodos crean una escala de pH que no mide ni la actividad, ni la concentración, sino una combinación de ambas, o sea, las constantes determinadas directamente de los valores de mediciones potenciométricas son constantes mixtas, que toman en cuenta actividades (para protones) y concentraciones (para las otras especies), por lo que los valores de diferencia de potencial obtenidos en las celdas electroquímicas, dependen de la actividad y no de la concentración de los protones. Debido a esto, el uso de la concentración de H<sup>+</sup> en potenciometría es más conveniente. Primero, porque es la concentración en lugar de la actividad lo que aparece en las ecuaciones de balance de masa para el cálculo de las constantes de equilibrio, por lo que se necesita conocer la concentración y no la actividad de los protones. Segundo, porque la actividad de una especie iónica no es un parámetro determinable experimentalmente.

La ecuación (7), representa una titulación de un ácido fuerte con una base fuerte, y la relación entre variables involucradas es:<sup>35</sup>

$$V + (V_0 + V)[H']f / C_B - (V_0 + V)K_w / (C_B[H']f) - V_e = 0 \quad (7)$$

donde V es el volumen de titulante de concentración C<sub>B</sub> molar, V<sub>0</sub> es el volumen inicial de la muestra, K<sub>w</sub> es el producto iónico del agua, V<sub>e</sub> es el volumen de equivalencia, [H'] es la concentración de H<sup>+</sup> no corregida - tomada directamente de las mediciones de pH - ([H'] = 10<sup>pH</sup>) y f es el factor de corrección, que es una función de los coeficientes de actividad y del potencial de unión líquida (junction potential).

En nuestras condiciones experimentales, la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH para cada adición eran conocidos, por lo que fue posible calcular el valor de pK<sub>w</sub> y de f. Este factor f incluye, el cambio en los coeficientes de actividad y el error asociado a la variación del potencial de unión líquida.

La calibración rutinaria del electrodo, se llevó a acabo titulando una solución de HCl 0.002 M, a fuerza iónica de 0.1 M con NaCl; haciendo pequeñas adiciones de NaOH aproximadamente 0.1M (previamente estandarizado), permitiendo que la disolución se equilibrase y registrando el valor de pH instrumental. Utilizando la ecuación (7) y despejándola en términos de volumen para obtener la ecuación (8), se ajustaron las curvas de titulación obtenidas, mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados, para así obtener los valores de  $pK_w$  y  $f$ .

$$V = \frac{V_e \times C_B + \frac{V_0 \times K_w}{[H^+]} - V_0 \times [H^+] \times f}{C_B + [H^+] \times f - \frac{K_w}{[H^+]}} \quad (8)$$

Cabe destacar que la influencia de los coeficientes de actividad y el error asociado a la variación de potencial de unión líquida, se manifiestan como el factor  $f$  en la expresión de la concentración de  $H^+$ .

Para la ecuación de ajuste en el programa Origin se hicieron  $V_e = P1$ ,  $K_w = P2$ ,  $f = P3$ ,  $pH = X$ , ecuación (9)

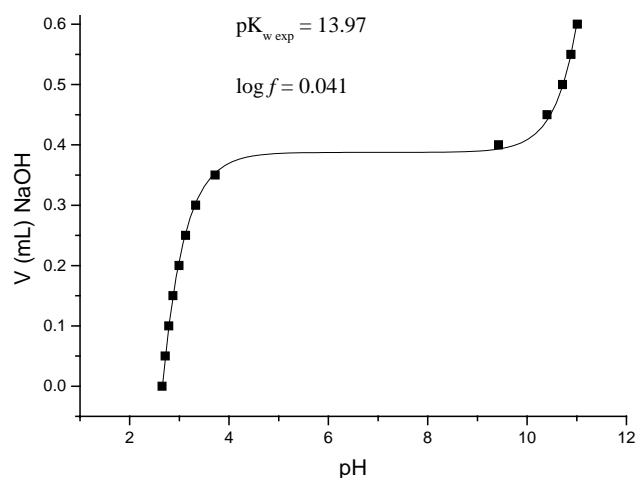
$$V = (P1 * C_B + V_0 * P2 * 10^X - V_0 * P3 / 10^X) / (C_B + P3 / 10^X - P2 * 10^X) \quad (9)$$

donde P1 – P3 son parámetros de ajuste.

En las condiciones experimentales de esta tesis se determinó un valor promedio de  $pK_w$  de 14 como uno de los parámetros y  $f$  se determinó antes de cada titulación como otro parámetro de ajuste. El valor informado en la literatura para el  $pK_w$  a fuerza iónica  $I = 0.1$  M y  $25$  °C es de 13.891<sup>36</sup> que es igual, dentro de los límites de error, al valor encontrado, figura 6. De este ajuste se obtuvo el valor de  $f$ , con el cual se corrigió la escala del potenciómetro. La manera en la que se corrigió la escala, fue restando el logaritmo de  $f$  a los valores de pH observados y así obtener datos en términos de la

concentración de protones ( $-\log[H^+] = \text{pH} - \log f$ ), con ésto, se consiguió calibrar el electrodo en términos de la concentración de protones.

$$\text{pH} = \text{pH}_{\text{obs}} - \log f$$



**Figura 6.** Calibración del electrodo en agua, utilizando HCl 2mM en 25mL de disolución titulándolo con NaOH 0.1M y con 0.1M de NaCl como electrolito soporte.

Las muestras a titular se prepararon añadiendo 2mM de amikacina, de 4 a 8 mM de HCl (según fuera el caso), con el fin de comenzar las titulaciones con todas las especies protonadas. Las sales o los ácidos de los huéspedes a titular se prepararon a una concentración de 2 y 4 mM, utilizando como electrolito soporte 0.1 M de NaCl. Una titulación típica se efectuó agregando pequeñas cantidades, 50 y 80 $\mu$ L, de NaOH aproximadamente 0.1M y registrando los valores de pH obtenidos, teniendo cuidado de que estos valores fueran estables.

### *5. 2. 3. Titulaciones por RMN <sup>1</sup>H*

Debido a que la amikacina es un aminoglucósido que consta de tres anillos alifáticos, el estudio de titulaciones con dicarboxilatos alifáticos por RMN <sup>1</sup>H no fue posible, ya que las señales se traslaparían con de la amikacina, siendo imposible el reconocimiento de algún desplazamiento químico. Por lo que estos experimentos se llevaron a cabo sólo con el anión ftalato. Éste huésped tiene un anillo aromático que presenta señales a campo bajo, lo cual hace que sea un poco más sencillo detectar cuándo las señales de amikacina se modifican debido a la interacción con el anión.

Las disoluciones se prepararon disolviendo amikacina en agua deuterada para obtener una solución estándar de concentración de 7mM de amikacina; así mismo, se preparó la solución de ftalato en una concentración 7mM. Las soluciones a medir en el espectrómetro se prepararon con una concentración de 4mM de amikacina, 16mM de DCl, 0.1M de NaCl y concentraciones variables de anión ftalato de 0, 1, 2, 3 y 4mM, para obtener valores de pD de 3, 6 y 9 para cada una de las concentraciones. Para ajustar los valores de pD, se utilizaron disoluciones de NaOD. Los tubos de resonancia fueron de la marca Aldrich de 5mm. Como referencia interna se tomó la señal del agua en 4.68 ppm. Para realizar las mediciones de pD se utilizó un potenciómetro ORION pH meter modelo 420A y un semi - microelectrodo combinado ORION Ross™ con el cual se midió el valor de pD de cada disolución antes de correr los experimentos de resonancia magnética nuclear.

En cuanto a los estudios de complejación, el método de estudio consistió en obtener los espectros del anfitrión y del huésped en forma independiente, y después del complejo formado a una concentración fija del anfitrión y a diferentes concentraciones del huésped para cubrir un intervalo de complejación de 4:1, 3:1, 2:1 y 1:1 anfitrión – huésped respectivamente. Aquellos protones que presentaron el cambio más grande de

desplazamiento químico, se emplearon para determinar las partes del anfitrión que tienen interacción con el fatlato.

#### *5. 2. 4. Titulaciones por espectrofotometría*

Las titulaciones por espectrofotometría se realizaron agregando cantidades de 80  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M a una solución de  $5 \times 10^{-6}$  M de indicador, 1mM de amikacina y 4mM de HCl. Las mediciones espectrofotométricas para cada valor de pH se realizaron en una celda de cuarzo de 1cm. Los huéspedes utilizados fueron los indicadores bromocresol verde (**BCG**) y fenol rojo (**PhR**). Estos aniones fueron empleados ya que que al asociarse con la amikacina, la distribución de la densidad electrónica del anión se modificaría, por lo que se observaría un desplazamiento en su máximo de absorbancia. Adicionalmente, presentan cambios de color en un intervalo de pH específico.

## 6. Resultados y Discusión

### 6. 1. Potenciometría

#### 6. 1. 1 Determinación de las constantes de protonación del aminoglucósido amikacina y de aniones empleados como huéspedes.

Los equilibrios de protonación de amikacina fueron estudiados a una concentración de 2mM a 25°C en presencia de NaCl 0.1 M por medio de titulaciones potenciométricas. Los datos obtenidos fueron introducidos al programa HYPERQUAD 2000. Los ajustes realizados por el programa a las curvas de titulación, dieron las constantes de protonación de la amikacina a las condiciones de trabajo de esta tesis, y se compararon con las informadas anteriormente por Jezowska <sup>34</sup>, tabla 8. El diagrama de distribución de especies en solución en función del pH para el sistema A/H<sup>+</sup> se presenta en la figura 8; en donde es evidente que este aminoglucósido se comporta como un ácido tetraprótico en un intervalo de pH de 3 hasta 11.

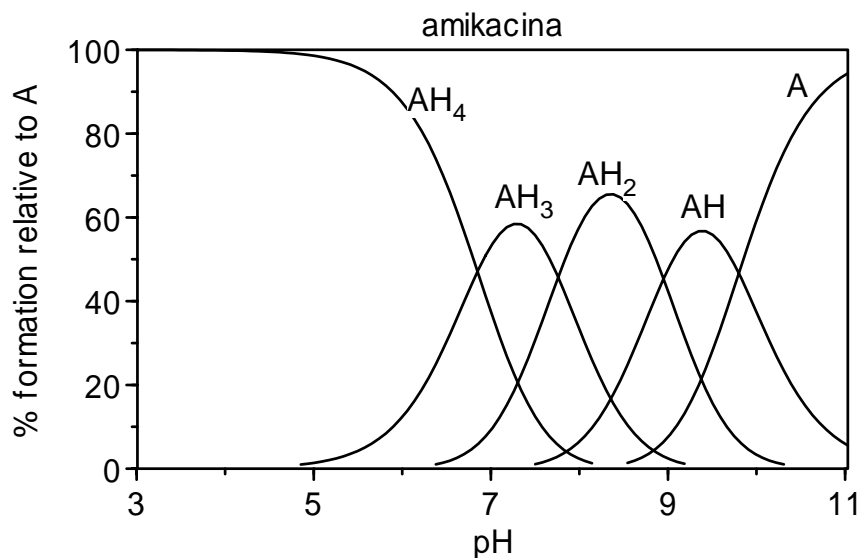
**Tabla 8.** Constantes de protonación de amikacina.

Especies	log $\beta^{a,c}$	log $K^a$	log $\beta^b$	log $K^b$
H <sub>4</sub> A	33.36	6.85	33.43	6.83
H <sub>3</sub> A	26.51	7.76	26.60	7.81
H <sub>2</sub> A	18.75	8.95	18.79	8.89
HA	9.80	9.80	9.90	9.90

<sup>a</sup> log  $\beta$  y log  $K$  a 25°C y  $I=0.1M$ .

<sup>b</sup> log  $\beta$  y log  $K$  informadas por Jezowska et al. <sup>34</sup>

<sup>c</sup>  $\beta = [H_xA] / [A][H]^x$ ,  $K = [H_xA] / [H_{x-1}A][H]$



**Figura 7.** Diagrama de distribución para amikacina ( $[A] = 2\text{mM}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )

Los equilibrios de protonación de los huéspedes empleados, fueron estudiados a una concentración de  $2\text{mM}$  a  $25^\circ\text{C}$  en presencia de  $\text{NaCl } 0.1\text{ M}$  por medio de titulaciones potenciométricas. Los valores obtenidos de las titulaciones potenciométricas fueron introducidos al programa Hyperquad 2000 y los ajustes realizados por el programa a las curvas de titulación dieron las constantes de protonación de los huéspedes que se presentan en la tabla 9, junto con las informadas anteriormente.

**Tabla 9.** Constantes de protonación de aniones empleados como huéspedes.

Especies <sup>c</sup>	$\log \beta^a$	$\log K^a$	Especies <sup>c</sup>	$\log \beta^b$	$\log K^b$
<i>L= acet</i>			<i>L= acet<sup>e</sup></i>		
HL	4.65 (0.003)	4.65		4.76 (0.01)	4.76
<i>L= ben</i>			<i>L= ben<sup>g</sup></i>		
HL	4.16 (0.008)	4.16		4.21	4.21
<i>L= ox</i>			<i>L= ox<sup>g</sup></i>		
H <sub>2</sub> L				5.55	1.27
HL	3.92 (0.002)	3.92		4.28	4.28



<b><i>L= maln</i></b>			<b><i>L= maln<sup>g</sup></i></b>		
H <sub>2</sub> L	8.15 (0.018)	2.75	8.55		2.85
HL	5.40 (0.008)	5.40	5.70		5.70
<b><i>L= succ</i></b>			<b><i>L= succ<sup>d</sup></i></b>		
H <sub>2</sub> L	8.87 (0.018)	3.67	9.84 (0.01)		4.20
HL	5.25 (0.013)	5.25	5.64		5.64
<b><i>L= glut</i></b>			<b><i>L= glut<sup>d</sup></i></b>		
H <sub>2</sub> L	9.44 (0.013)	4.25	9.80 (0.03)		6.47
HL	5.19 (0.008)	5.19	5.41		7.22
<b><i>L= D-mal</i> <i>L-mal</i></b>			<b><i>L= D-mal<sup>g</sup></i> <i>L-mal</i></b>		
H <sub>2</sub> L	8.11 (0.015)	2.75	8.54		3.40
HL	4.80 (0.012)	5.40	5.14		5.14
<b><i>L= ftaI</i></b>			<b><i>L= ftaI<sup>g</sup></i></b>		
H <sub>2</sub> L	8.11 (0.023)	2.92	8.36		2.95
HL	5.19 (0.009)	5.19	5.41		5.41
<b><i>L= PhB</i></b>			<b><i>L= PhB<sup>g</sup></i></b>		
HL	8.85 (0.005)	8.85	8.67		8.67
<b><i>L= PhP</i></b>			<b><i>L= PhP<sup>f</sup></i></b>		
H <sub>2</sub> L					
HL	5.95 (0.038)	5.95	5.85		5.85
<b><i>L= GMP</i></b>			<b><i>L= GMP<sup>f</sup></i></b>		
H <sub>3</sub> L			18.01 (0.03)		2.37
H <sub>2</sub> L	15.96 (0.03)	6.30	15.64 (0.03)		6.24
HL	9.66 (0.02)	9.66	9.4		9.4
<b><i>L= cit</i></b>			<b><i>L= cit<sup>g</sup></i></b>		
H <sub>3</sub> L	13.4 (0.037)	3.15	12.95		2.89
H <sub>2</sub> L	10.25 (0.03)	4.46	10.06 (0.01)		4.38
HL	5.79 (0.026)	5.79	5.68 (0.02)		5.68

<sup>a</sup> log  $\beta$  y log  $K$  a nuestras condiciones de trabajo.

<sup>b</sup> log  $\beta$  y log  $K$  informadas por ref. <sup>37-54</sup>

<sup>c</sup>  $\beta = [\text{H}_x\text{A}] / [\text{A}][\text{H}]^x$ ,  $K = [\text{H}_x\text{A}] / [\text{H}_{x-1}\text{A}][\text{H}]$

<sup>d</sup> fuerza iónica desconocida (I= ?)

<sup>e</sup> I= 0.05

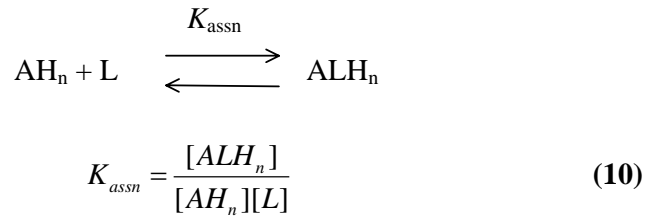
<sup>f</sup> I= 0.1

<sup>g</sup> I= 0

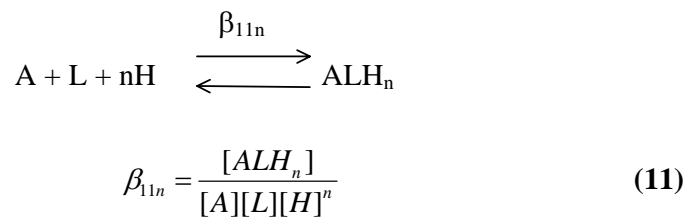
6. 1. 2. Estudio por potenciometría de las interacciones amikacina – carboxilatos

La protonación de la amikacina da como resultado una especie cargada, la cual puede ser capaz de formar complejos estables con especies aniónicas como los iones carboxilatos en solución acuosa. La formación de dichas especies es estrictamente dependiente del pH y los equilibrios relevantes pueden ser estudiados por titulaciones pH - métricas.

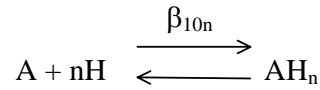
La formación de un complejo amikacina – huésped para cada forma protonada de amikacina  $AH_n$  es descrita por una constante de asociación,  $K_{assn}$ , ecuación (10)



Las constantes de formación de los complejos amikacina – huésped, también se pueden expresar como constantes acumulativas,  $\beta_{pqn}$ , ecuación (11), en donde los subíndices p y q tienen valor de uno, y n tiene valores de 1 hasta 5, (estas últimas constantes son las que calcula el programa *HYPERQUAD 2000*).



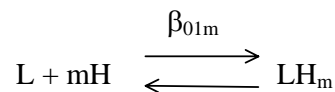
Tomando en cuenta la definición de las constantes de protonación de amikacina,  $\beta_{10n}$ , ecuación (12), llegamos a la ecuación (13) para calcular las constantes de asociación a partir de las constantes experimentales  $\beta_{11n}$ .



$$\beta_{10n} = \frac{[AH_n]}{[A][H]^n} \quad (12)$$

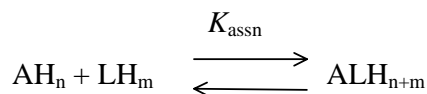
$$\log K_{assn} = \log \beta_{11n} + \log \beta_{10n} \quad (13)$$

Debido a que en el caso general las reacciones de complejación amikacina – huésped son dependientes del grado de protonación del receptor, (12) y del huésped (14), la formación de complejos ocurre en pasos, que constan de un número determinado de reacciones sucesivas expresadas por una constante de asociación acumulativa,  $\beta_{11n}$ , ecuación (11).



$$\beta_{01m} = \frac{[LH_m]}{[L][H]^m} \quad (14)$$

Si el ligante es un monocarboxilato, su protonación lo convierte en una especie neutra, que ya no puede formar complejos con amikacina protonada. Sin embargo, para di- y tricarboxilatos, la protonación parcial del ligante le deja su carga negativa y entonces, aparte del equilibrio (10), que representa la complejación de la especie totalmente desprotonada, podemos esperar la formación de complejos entre formas parcialmente protonadas de amikacina y del huésped, (15).



$$K_{assn} = \frac{[ALH_{n+m}]}{[AH_n][LH_m]} \quad (15)$$

Siguiendo el procedimiento anterior, llegamos a la ecuación (16), para así obtener la constante de asociación en el caso general.

$$\log K_{assn} = \log \beta_{11(n+m)} - \log \beta_{10n} - \log \beta_{01m} \quad (16)$$

Al resumir, el programa *HYPERQUAD 2000* calcula los logaritmos de las constantes de formación acumulativas ( $\log \beta_{11(n+m)}$ ), para los complejos formados entre amikacina y los huéspedes aniónicos. Estas constantes acumulativas incluyen las constantes de protonación tanto del receptor como del huésped, por lo que para conocer las constantes de formación de los complejos,  $\log K_{assn}$ , hay que restar logaritmos de las constantes de protonación de amikacina y cuando los complejos se forman a valores de pH más bajos, también hay que restar las constantes de protonación de los huéspedes, para obtener los valores de  $\log K_{assn}$ , ecuación (16); en donde  $\log \beta_{10n}$  es la constante acumulativa de protonación de amikacina por n protones y  $\log \beta_{01m}$  es la constante acumulativa de protonación del huésped por m protones.

La tabla 10 que se presenta a continuación, muestra las constantes acumulativas que describen las interacciones amikacina – monocarboxilato como acetato que es alifático y benzoato que presenta un anillo aromático.

**Tabla 10.** Constantes acumulativas ( $\log \beta$ ) de formación de los complejos de monocarboxilatos (acetato y benzoato) con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log \beta^a$	Reacción	$\log \beta^a$
<i>L= AcO</i>		<i>L= Bz</i>	
A + H <sup>+</sup> + L <sup>-</sup> = HAL		A + H <sup>+</sup> + L <sup>2-</sup> = HAL	11.99 (0.086)
A + 2H <sup>+</sup> + L <sup>-</sup> = H <sub>2</sub> AL <sup>+</sup>		A + 2H <sup>+</sup> + L <sup>2-</sup> = H <sub>2</sub> AL <sup>+</sup>	21.24 (0.079)
A + 3H <sup>+</sup> + L <sup>-</sup> = H <sub>3</sub> AL <sup>2+</sup>	28.36 (0.086)	A + 3H <sup>+</sup> + L <sup>2-</sup> = H <sub>3</sub> AL <sup>2+</sup>	28.90 (0.053)
A + 4H <sup>+</sup> + L <sup>-</sup> = H <sub>4</sub> AL <sup>3+</sup>	35.63 (0.045)	A + 4H <sup>+</sup> + L <sup>2-</sup> = H <sub>4</sub> AL <sup>3+</sup>	35.89 (0.042)

$$^a\beta = [H_xA] / [A][H]^x$$

La formación del complejos amikacina – benzoato comienza a ser detectable para un mínimo de protonación de uno, formando el complejo HAL; no así para acetato, en donde únicamente se pueden detectar dos complejos amikacina - acetato, H<sub>3</sub>AL<sup>2+</sup> y

$H_4AL^{3+}$ , con constantes de estabilidad muy bajas de  $\log K_{assn} = 1.85$  y  $2.27$  respectivamente, tabla 11. Por lo que la interacción amikacina - benzoato resulta ser la más fuerte en comparación a amikacina –acetato para el mismo grado de protonación. Posiblemente, en la estabilidad de los complejos con benzoato interviene un efecto hidrofóbico entre la cavidad de la amikacina y el anillo aromático del ion benzoato. Esto es más notorio al hacer el cálculo de  $\log K_{assn}$  utilizando la ecuación empírica de Sammartano, (23), (ver la discusión más adelante), en donde para el complejo formado con amikacina tetraprotonada y benzoato, el valor de  $\log K_{assn}$  esperado es de 1.04, mientras que el valor experimental es de 2.53. Por otro lado, los valores de  $\log K_{assn}$  para los complejos amikacina – acetato experimentales son mayores por un orden de magnitud que los calculados por la ecuación (23).

**Tabla 11.** Constantes de estabilidad ( $\log K$ ) de los complejos de monocarboxilatos (acetato y benzoato) con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log K^b$	$\log K^a$	Reacción	$\log K^b$	$\log K^a$
<i>L= AcO</i>			<i>L= Bz</i>		
$AH^+ + L^- = HAL$		0.26	$AH^+ + L^- = HAL$	2.19	0.26
$AH_2^{2+} + L^- = H_2AL^+$		0.52	$AH_2^{2+} + L^- = H_2AL^+$	2.49	0.52
$AH_3^{3+} + L^- = H_3AL^{2+}$	1.85	0.78	$AH_3^{3+} + L^- = H_3AL^{2+}$	2.39	0.78
$AH_4^{4+} + L^- = H_4AL^{3+}$	2.27	1.04	$AH_4^{4+} + L^- = H_4AL^{3+}$	2.53	1.04

<sup>a</sup>  $\log K$  calculados mediante la ecuación (23)

<sup>b</sup>  $K = [AH_xL]/[AH_x][L]$

Como fue mencionado en el Capítulo 2, la asociación iónica entre especies que carecen de una estructura rígida y complementaridad exacta de la carga es poco específica, y las constantes de asociación pueden ser estimadas por una ecuación muy sencilla, (5), propuesta por Sammartano <sup>7, 8</sup> con un valor de  $a = 0.612 \pm 0.006$  para aniones inorgánicos y  $0.500 \pm 0.003$  para aniones orgánicos a la fuerza iónica cero.

Sin embargo, la interferencia de otros aniones y cationes debe ser considerada en los experimentos cuando un electrolito de soporte (por ejemplo NaCl) es añadido a las soluciones que se están estudiando. La presencia de una sal afecta la

formación de los complejos receptor – huésped, ya que por un efecto salino se cambian los coeficientes de actividad del huésped y del receptor, así que hay que hacer una corrección de la ecuación (5) a la fuerza iónica ( $I$ ) 0.1 M. Para ello se emplea la ecuación extendida de Debye – Hückel, ecuación (17), para el coeficiente de actividad  $\gamma_i$

$$\log \gamma_i = \frac{AZ_i^2(I)^{1/2}}{1 + Ba_i(I)^{1/2}} \quad (17)$$

donde  $Z_i$  es la carga del ion,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica,  $T$  es la temperatura,  $A = -1.82 \times 10^6 (\epsilon T)^{-3/2}$ ,  $B = 50.3 (\epsilon T)^{-1/2}$  y  $a_i$  es el tamaño del ion. En agua, a 298 K y asumiendo un valor constante del parámetro  $a_i$  de 3.5 Å, la ecuación tiene la forma

$$\log \gamma_i = \frac{-0.5Z_i^2(I)^{1/2}}{1 + (I)^{1/2}} \quad (18)$$

De esta manera, la formación del complejo receptor – huésped (RL) puede expresarse mediante una constante observada  $K_{RL}$ , ecuación (19)

$$K_{RL} = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (19)$$

O bien, mediante la constante de equilibrio en términos de actividades ( $K_{RL}^0$ ), ecuación (20)

$$K_{RL} = K_{RL}^0 \frac{\gamma_R \gamma_L}{\gamma_{RL}} \quad (20)$$

Así, a partir de las ecuaciones (18) y (20) se puede llegar a la siguiente expresión, que nos permite relacionar la constante de formación del complejo RL y la fuerza iónica de la disolución, ecuación (21).

$$\log K_{RL} = \log K_{RL}^0 + \frac{0.5I^{1/2}}{1 + I^{1/2}} (z_{RL}^2 - z_R^2 - z_L^2) \quad (21)$$

Por otro lado, si  $z_{RL} = z_L + z_R$ , entonces  $z_{RL}^2 = z_R^2 + 2z_R z_L + z_L^2$ ; por lo que al sustituir la expresión anterior en (21) obtenemos la ecuación (22)

$$\log K_{RL} = \log K_{RL}^0 + \frac{z_L z_R \cdot I^{1/2}}{1 + I^{1/2}} \quad (22)$$

Utilizando la ecuación (22) en la ecuación (5) con parámetros  $a$  dados arriba, y sustituyendo el valor de  $I= 0.1$  M (que fue la fuerza iónica de nuestras disoluciones), obtenemos la ecuación (23) para carboxilatos y (24) para aniones inorgánicos como los fosfatos.

$$\log K_{RL} = 0.26 z_R z_L \quad (23)$$

$$\log K_{RL} = 0.37 z_R z_L \quad (24)$$

La comparación de los valores de  $K_{\text{assn}}$  observados con los calculados mediante la ecuación (23), nos permite discernir si existe o no cierta pre-organización del receptor para reconocimiento molecular del anión. De ser así, la constante observada debe ser mayor que el valor calculado mediante la ecuación (23). Además, en los casos en los que, en la formación del complejo participa en algún tipo de interacción adicional de naturaleza no electrostática, se espera una desviación positiva para los valores observados

La tabla 12, contiene las constantes acumulativas para las especies formadas por amikacina con dicarboxilatos alifáticos como: oxalato, malonato, succinato y glutarato, (estos aniones tienen la característica de tener las cargas separadas por cero, uno, dos y tres carbonos respectivamente). Aunque la formación de complejos en condiciones 1:1 y 2:1 de anión – amikacina son observables, los datos obtenidos por el programa HYPERQUAD 2000 bajo nuestras condiciones experimentales, revelan predominantemente la estequiometría 1:1 para todas las especies detectadas.

**Tabla 12.** Constantes acumulativas ( $\log\beta$ ) de formación de los complejos de dicarboxilatos alifáticos con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log\beta^a$	Reacción	$\log\beta^a$
<i>L=ox</i>		<i>L= maln</i>	
$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	12.3 (0.06)	$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	11.35
$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	20.5 (0.06)	$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	20.75
$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	29.0 (0.07)	$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	
$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	36.25 (0.06)	$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	35.42 (0.14)
$A + 5H^+ + L^{2-} = H_5AL^{3+}$	39.7 (0.08)	$A + 5H^+ + L^{2-} = H_5AL^{3+}$	40.17
<i>L= succ</i>		<i>L= glut</i>	
$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	21.4 (0.07)	$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	
$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	29.66 (0.07)	$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	
$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	37.09 (0.05)	$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	
$A + 5H^+ + L^{2-} = H_5AL^{3+}$	42.92 (0.06)	$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	35.71 (0.05)
$A + 6H^+ + L^{2-} = H_6AL^{4+}$	47.29 (0.06)	$A + 5H^+ + L^{2-} = H_5AL^{3+}$	40.61 (0.07)
<i>L= cit</i>			
$A + 2H^+ + L^{3-} = H_2AL^{2-}$	20.63		
$A + 3H^+ + L^{3-} = H_3AL^-$	28.89 (0.1)		
$A + 4H^+ + L^{3-} = H_4AL$	36.42 (0.09)		
$A + 5H^+ + L^{3-} = H_5AL^{2+}$	41.91 (0.1)		
$A + 6H^+ + L^{3-} = H_6AL^{3+}$	46.47 (0.07)		

$$^a\beta = [H_xA] / [A][H]^x$$

Para todos los aniones estudiados, las interacciones con amikacina comienzan a ser detectables para un mínimo de protonación de uno, a excepción de los complejos formados con el ion succinato y glutarato, en donde las especies detectables son a partir de los complejos  $H_2AL$  y  $H_4AL$  respectivamente. Sin embargo, las constantes de estabilidad para la forma monoprotonada son poco confiables, ya que esta forma predomina a valores de pH altos (ver Figura 7), donde el error experimental es más grande. Otro intervalo de pH con un error significativo, corresponde a medios ácidos con pH alrededor o menores de 3. Probablemente, a este error se debe el “complejo” hexaprotonado con succinato (ver Apéndice), que no debe formarse, ya que corresponde a la protonación completa del anión y en consecuencia, pérdida de su carga negativa. Por estas razones, a continuación se presta la especial atención a las constantes de formación de complejos con formas di, tri y tetraprotonados de amikacina.

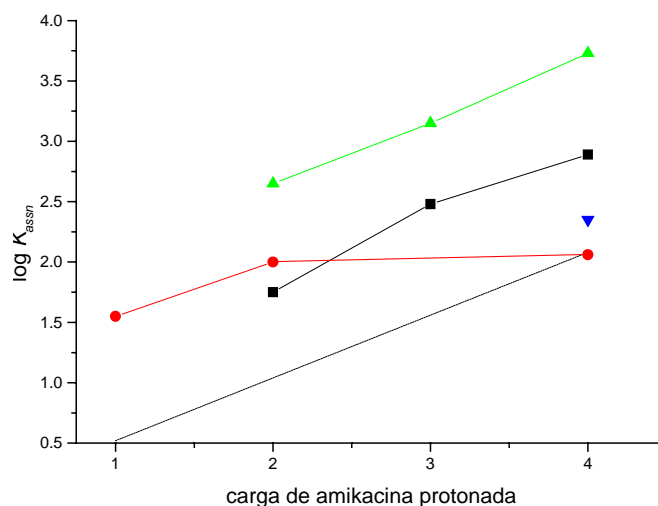


La tabla 13 contiene las constantes de asociación correspondientes a los complejos amikacina – policarboxilato; y la figura 8 muestra una gráfica de  $\log K_{\text{assn}}$  como función de la carga positiva total de las formas de amikacina y dicarboxilatos protonados involucrados en el equilibrio.

**Tabla 13.** Constantes de estabilidad ( $\log K$ ) de los complejos de dicarboxilatos alifáticos con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log K^a$	Reacción	$\log K^a$
<i>L= ox</i>		<i>L= maln</i>	
$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$		$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	1.55
$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	1.75	$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	2.00
$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	2.48	$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	
$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	2.89	$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	2.06
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	2.43	$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	1.41
<i>L= succ</i>		<i>L= glut</i>	
$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$		$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	
$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	2.65	$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	
$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	3.15	$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	
$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	3.73	$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	2.35
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	4.33	$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	2.06
<i>L= cit</i>			
$AH^+ + L^{3-} = ALH$			
$AH_2^{2+} + L^{3-} = ALH_2^-$	1.88		
$AH_3^{3+} + L^{3-} = ALH_3$	2.38		
$AH_4^{4+} + L^{3-} = ALH_3^+$	3.06		
$AH_4^{4+} + HL^{2-} = ALH_5^{2+}$	2.76		
$AH_4^{4+} + H_2L^- = ALH_6^{3+}$	2.86		

<sup>a</sup>  $K = [AH_xL] / [AH_x][L]$



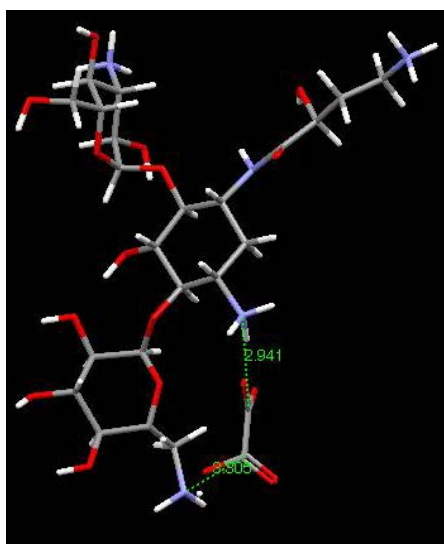
**Figura 8.**  $\log K$  vs el número de protonación amikacina (■ – oxalato, ● – malonato, ▲ – succinato, ▼ – glutarato, línea punteada – teórica).

La estabilidad de los complejos protón – amikacina – dicarboxilato depende de la carga de la poliamina, figura 8. Utilizando la ecuación (23), se calcularon los  $\log K_{assn}$  esperados para los complejos amikacina – dicarboxilatos para un caso hipotético, cuando amikacina interactúa con un catión sin estructura rígida (línea punteada, figura 8). Podemos observar que en general los aniones oxalato y succinato tienen la misma pendiente que la línea teórica, mientras que malonato presenta una desviación a pesar de que el valor de  $\log K_{assn}$  en el complejo  $ALH_4^{2+}$  se acerca más al calculado mediante la ecuación (23), ( $\log K_{teórico}=2.08$ ;  $\log K_{exp}= 2.06$ ), figura 8. Por otro lado, el succinato presenta valores mayores por casi dos órdenes de magnitud, por lo que podemos esperar que exista complementariedad de la distancia entre los carboxilatos del succinato con la distancia entre algún par de grupos amonio de amikacina y esto hace que los valores de  $\log K_{assn}$  sean mayores que los calculados, ( $\log K_{teórico}=2.08$ ;  $\log K_{exp}= 3.73$ ; para el complejo  $ALH_4^{2+}$ ).

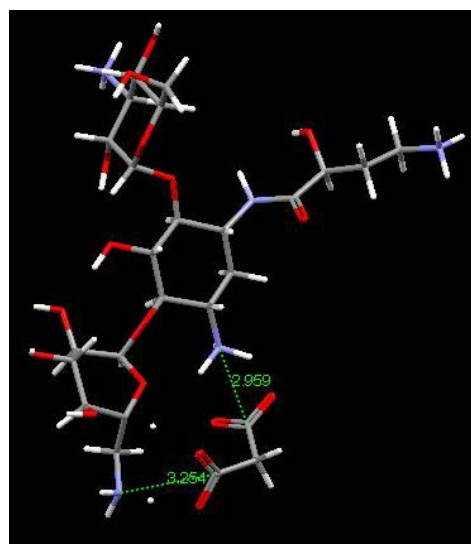
En el caso de la interacción de amikacina con el anión glutarato, sólo pueden ser detectados los complejos  $H_4AL^{2+}$  y  $H_5AL^{3+}$ . Por otro lado, las constantes de estabilidad para la interacción de los iones oxalato y malonato varían desde  $\log K_{assn} = 1.75$  y  $1.09$

para los complejos con amikacina diprotonada hasta  $\log K_{assn} = 2.89$  y  $2.06$ , para los complejos con amikacina tetraprotonada respectivamente. También, el incremento de la estabilidad está relacionado con el incremento del grado de protonación del receptor, ya que un incremento en la protonación de los grupos amino aumenta el número potencial de interacciones carga – carga.

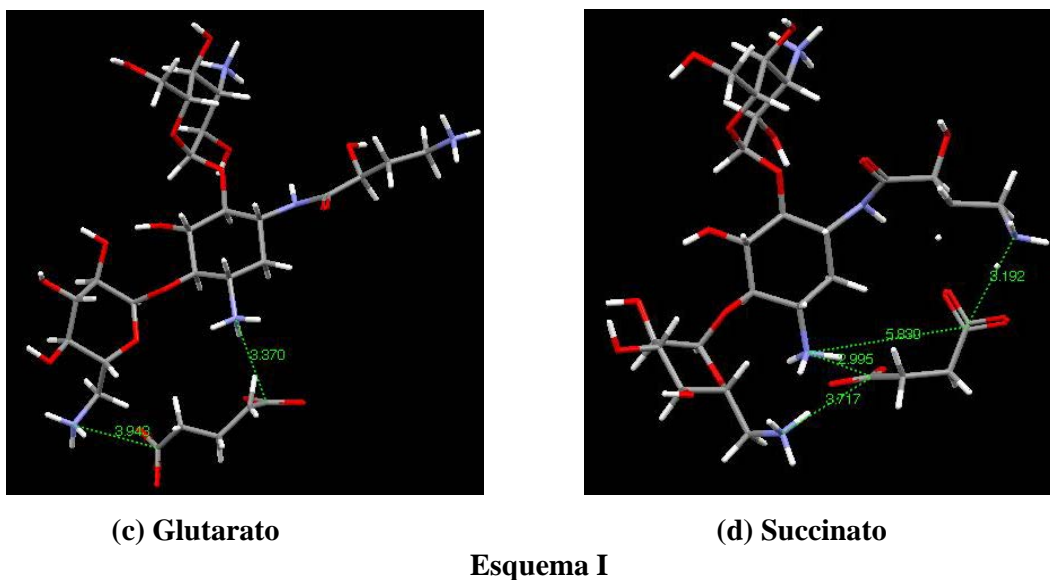
Con el fin de explicar las tendencias observadas en la serie de dicarboxilatos, se realizaron estudios de modelado molecular de la interacción de los dianiones con la forma tetraprotonada de la amikacina. En la primera etapa utilizamos las coordenadas atómicas de la estructura de rayos X para la molécula neutra, se añadieron 4 protones a los grupos amino y se realizó la minimización para la forma tetraprotonada. En la segunda etapa se minimizaron las estructuras de los dianiones de los dicarboxilatos. Finalmente, se minimizaron las estructuras de los complejos obtenidos entre el receptor y el dianión, juntando las estructuras minimizadas de ambos componentes. El esquema I muestra las estructuras obtenidas de los complejos.



**(a) Oxalato**



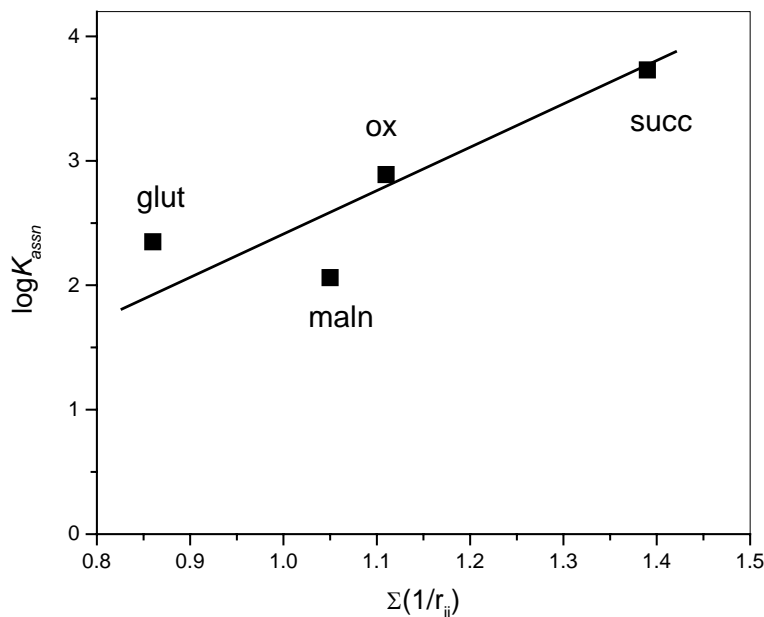
**(b) Malonato**



De las estructuras presentadas en el Esquema I se observa que todos los dicarboxilatos forman contactos directos con dos grupos amonio de los anillos A y B. Adicionalmente, el receptor y el huésped presentan un cambio conformacional al asociarse, los cuales tienen que doblarse para que succinato pueda interactuar eficientemente con tres grupos amonio de amikacina, esquema I (d). Esto de manera cualitativa explica la afinidad mayor para el succinato.

En una búsqueda de un enfoque más cuantitativo intentamos correlacionar las constantes de estabilidad de los complejos con la suma de los inversos de las distancias entre las cargas negativas y las positivas ( $\sum 1/r_{ij}$ ) calculadas de las estructuras I (a) – I (d) utilizando distancias entre centros de los grupos carboxilato y los átomos de nitrógeno de los grupos amonio como una aproximación.

La figura 9 muestra que hay una correlación entre  $\log K_{assn}$  y  $\sum 1/r_{ij}$  y la selectividad de amikacina por succinato se debe a un mejor ajuste del dianión y la especie tetraprotonada.



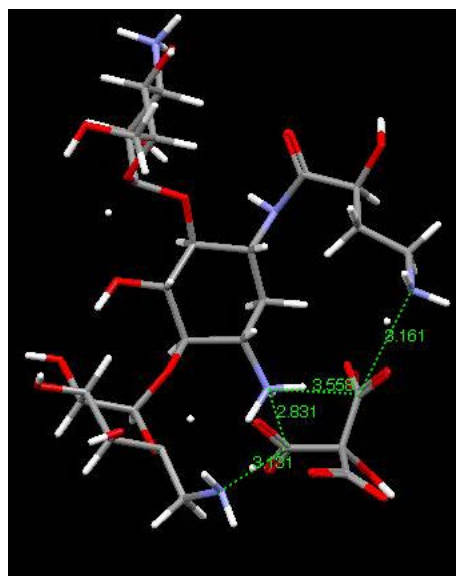
**Figura 9.** Correlación entre  $\log K_{assn}$  y la suma de las distancias inversas entre las cargas negativas y las positivas ( $\Sigma 1/r_{ij}$ ) en complejos dicarboxilato – amikacina tetraprotonada.

Comparando los valores de  $\log K_{assn}$  informados por Kimura<sup>19</sup> para los complejos formados con el succinato y los macrociclos 2, 3 y 4, (ver Capítulo 3), con el complejo de amikacina en su forma triprotonada, observamos que el complejo amikacina – succinato tiene un valor un orden de magnitud mayor con respecto al complejo con el receptor 2 y casi dos órdenes de magnitud para 3 y 4. Por otro lado, el macrociclo 5 informado por Lehn,<sup>21</sup> con carga total de 6+, presenta un valor de  $\log K_{assn}$  de la misma magnitud que la forma tetraprotonada de la amikacina. El complejo con el macrociclo 6 en su forma hexaprotonada, tiene un valor de  $\log K_{assn}$  de un orden de magnitud menor que para los aductos de amikacina  $H_4AL^{2+}$ , (ver tabla 3, Capítulo 3).

Al comparar las constantes de estabilidad del complejo de amikacina con un el trianión citrato de la tabla 13, se observa que la formación de complejos con este anión presenta valores de  $\log K_{assn}$  menores que succinato, y solamente comparables con los dicarboxilatos oxalato, malonato y glutarato. El valor de  $\log K_{assn}$  calculado mediante la ecuación (23) para trianión de citrato y tetracación de amikacina es 3.12, que

prácticamente coincide con el valor experimental,  $\log K_{\text{assn}} = 3.06$ , lo cual nos indica que la molécula de amikacina interactúa con citrato de manera no-selectiva y tiene selectividad para el anión succinato en comparación a otros carboxilatos alifáticos que tienen carga total mayor.

La suma de las distancias entre las cargas negativas y las positivas para citrato es de 1.56, esquema II, que es mayor que cualquiera de los dicarboxilatos utilizados (Figura 9). También, podemos observar que el grupo hidroxiaminobutiril de la amikacina en el complejo con citrato se mueve más significativamente que con succinato. Incluso, las distancias del grupo  $\text{NH}_3^+$  terminal de los grupos amonio de los anillos A y B en amikacina libre son 10.023 y 16.928 Å, las cuales se reducen a 5.304 y 7.808 Å, en el complejo con citrato. Probablemente esta aproximación de las cargas produce una energía repulsiva, que compensa la ganancia esperada para una carga mayor del citrato.



**Esquema II**

La molécula de amikacina también tiene la característica de poseer centros quirales, por lo cual se hicieron las titulaciones potenciométricas utilizando los aniones

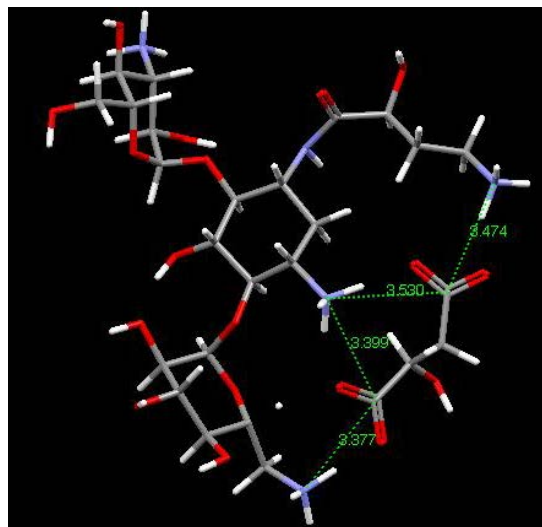
de los ácidos  $D$  - málico y  $L$  - málico. En la tabla 14 se presentan las constantes acumulativas para la interacción de los aniones anteriormente nombrados y amikacina.

**Tabla 14.** Constantes acumulativas ( $\log \beta$ ) de dicarboxilatos alifáticos quirales con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25 °C

Reacción	$\log \beta^a$	Reacción	$\log \beta^a$
	$L=$ <i>D-malato</i>		$L=$ <i>L-malato</i>
$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	12.56 (0.04)	$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	12.50 (0,08)
$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	21.46 (0.04)	$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	21.45 (0.08)
$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	29.47 (0.04)	$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	29.57 (0.07)
$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	36.30 (0.03)	$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	36.34 (0.06)
$A + 5H^+ + L^{2-} = H_4AL^{3+}$	40.57 (0.05)	$A + 5H^+ + L^{2-} = H_4AL^{3+}$	40.6 (0.1)

$$^a\beta = [H_xA] / [A][H]^x$$

En este estudio podemos observar que no hay discriminación de la molécula de amikacina entre los isómeros levógiro y dextrógiro, por lo que la molécula de amikacina no es selectiva para estas moléculas quirales. Por otro lado, las constantes de estabilidad de los complejos no muestran un aumento significativo en su valor conforme el grado de protonación de la amikacina aumenta y llaman la atención los valores altos de la constante de asociación de los complejos con amikacina monoprotónada (tabla 15). Incluso, aunque la molécula de amikacina se doble de la misma forma que con el succinato, las constantes de estabilidad no son mejores y el grupo hidroxilo de malato tampoco tiene intervención en la estabilidad del complejo, esquema III, de hecho, los valores de las constantes de estabilidad son comparables a las de oxalato; así como los valores de la suma de los inversos de las distancias de las cargas del receptor y el huésped son más parecidas a oxalato que a succinato ( $\Sigma 1/r_{\text{mal}} = 1.16$ ).



Esquema III

Al comparar los valores de  $\log K_{assn}$  de amikacina en su forma tetraprotonada con  $D$ -mal y  $L$ -mal observamos que con los macrociclos 13 y 14 son menores por aproximadamente un orden de magnitud ( $\log K_{D-mal} = 1.71$  y  $\log K_{D-mal} = 1.57$  respectivamente, (ver Capítulo 3);  $\log K_{L-mal} = 1.92$  y  $\log K_{L-mal} = 2.09$  respectivamente), por lo que amikacina forma complejos más estables con estos dicarboxilatos a pesar de no mostrar selectividad quiral.

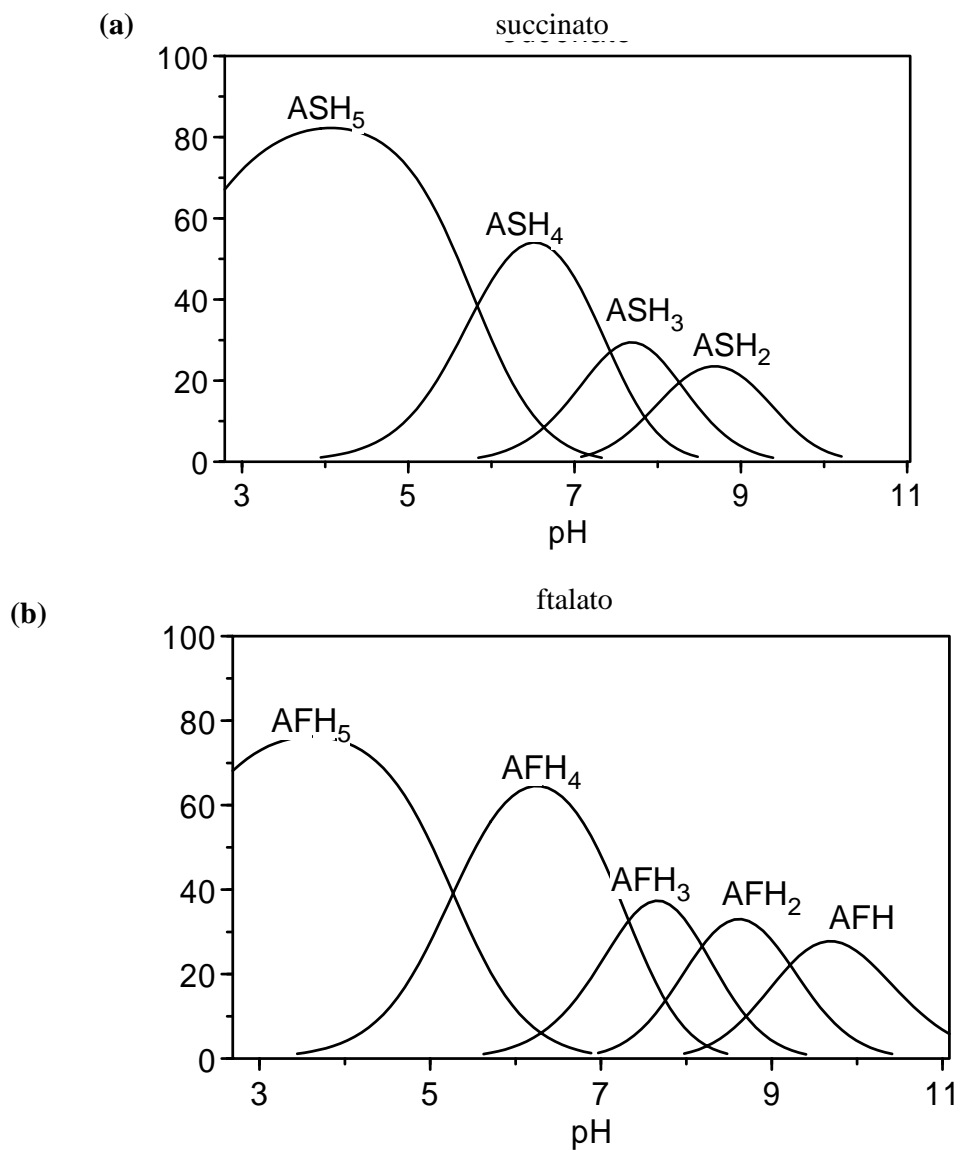
**Tabla 15.** Constantes de estabilidad ( $\log K$ ) de los complejos amikacina con  $D$ -malato y  $L$ -malato, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log K^a$	Reacción	$\log K^a$
<i>L= D-mal</i>		<i>L= L-mal</i>	
$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	2.68	$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	2.7
$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	2.71	$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	2.7
$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	2.96	$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	3.06
$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	2.94	$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	2.98
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	2.41	$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	2.44

$$^a K = [AH_xL]/[AH_x][L]$$



Cuando la formación de complejos entre un anfitrión como amikacina es con un anión que cuenta con una estructura más rígida entre las cargas como puede ser un anillo aromático, en este caso el ion ftalato, se observa una interacción de mayor magnitud. La comparación de la figura 10 muestra una interacción menor entre el anión succinato con amikacina con respecto a ftalato.



**Figura 10.** Diagramas de distribución para los sistemas (a) succ – A ([succ] = 2mM, [A]= 1mM a 25°C); (b) ftal – A ([ftal] = 2mM, [A] = 1mM a 25°C).

Los diagramas de distribución de especies para los sistemas succ – A y ftal – A muestran que para los sistemas succ – A y ftal – A en los complejos pentaprotonados, el sistema ftal – A tiene un porcentaje de especies complejadas del 80% en un intervalo de pH de 3.5 a 6, mientras que para el sistema succ – A el porcentaje es del 60% en un intervalo de pH de 4 a 6.

La comparación de los sistemas (a) y (b) también muestra una menor interacción del succinato con amikacina con respecto al ftalato. Como puede ser observado en la tabla 12, para el mismo grado de protonación, los complejos de amikacina con succinato presentan una menor estabilidad; este comportamiento puede deberse a que hay interacciones carga – carga más débiles, debido a la baja carga negativa en ese anión.

Como se puede ver de la tabla 16, para el mismo grado de protonación, los complejos de ftalato y amikacina presentan una estabilidad mayor en comparación con los aductos de succinato. Este comportamiento se parece a lo observado con el macrociclo 9 (ver Capítulo 3) y puede ser adjudicado a la rigidez del ion ftalato: la complejación del succinato está acompañada con “congelación” de rotación libre alrededor de enlaces C-C alifáticos, mientras que en ftalato esta rotación ya está “congelada” debido al anillo aromático.

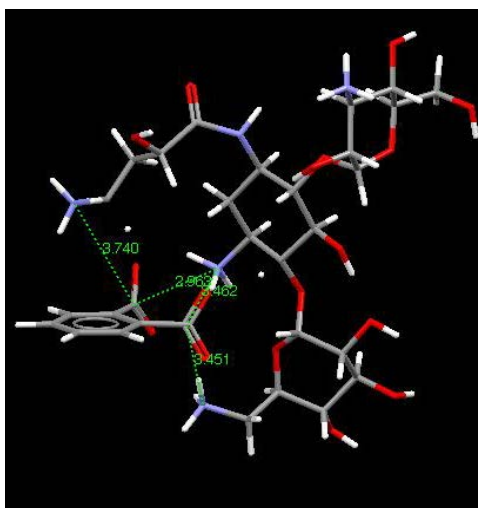
**Tabla 16.** Constantes acumulativas ( $\log\beta$ ) y de estabilidad ( $\log K$ ) del ftalato con amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log \beta^a$	Reacción	$\log K$
<i>L= ftal</i>		<i>L= ftal</i>	
$A + H^+ + L^{2-} = HAL^-$	12.57	$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	2.77
$A + 2H^+ + L^{2-} = H_2AL$	21.81	$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	3.06
$A + 3H^+ + L^{2-} = H_3AL^+$	30.01	$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	3.59
$A + 4H^+ + L^{2-} = H_4AL^{2+}$	37.7	$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	4.34
$A + 5H^+ + L^{2-} = H_5AL^{3+}$	42.62	$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	4.07

$$^a \beta = [ALH_x] / [A][L][H]^x$$

La mayor afinidad del ftalato también se manifiesta en el mejor ajuste de sus cargas negativas a las cargas positivas del receptor. El complejo formado entre amikacina y ftalato tiene un valor de  $\Sigma 1/r_{ij} = 1.62$  que es mayor que para succinato,  $\Sigma 1/r_{ij} = 1.4$ , por lo que la interacción de amikacina con el ion aromático ftalato es mayor

que con uno alifático como succinato; tal como se puede observar en el esquema IV, el grupo aromático del ftalato no tiene interacción con la molécula de amikacina. Estas observaciones experimentales sugieren que detrás de las interacciones electrostáticas entre los dicarboxilatos y los grupos amonio de la amikacina, otros efectos como la rigidez de los aniones o la distancia entre un carboxilato y otro en los extremos de la cadena alifática, pueden contribuir a la estabilidad de los complejos. Esto se traduce en términos termodinámicos en un incremento favorable de la entropía ( $T \Delta S^\circ > 0$ ), ya que una característica interesante de todos los complejos receptor con grupos amonio y anión, es que los parámetros de  $\Delta G^\circ$  y  $T \Delta S^\circ$  son estrictamente dependientes de la carga.



Esquema IV

Al comparar estos datos experimentales con los informados para el receptor **15**<sup>19, 25, 26</sup> para el mismo grado de protonación y el huésped ftalato, se observa que el valor del  $\log K_{assn}$  es ligeramente mayor que para amikacina ( $\log K_{assn} = 3.28$  y  $\log K_{assn} = 3.06$  respectivamente), lo cual indica que la estabilidad del complejo amikacina – ftalato es comparable con receptores tan rígidos como **15**. Con respecto al receptor **16** las constantes de estabilidad informadas por Sessler<sup>23, 27</sup> en metanol, (ver tabla 4), son menores que las obtenidas con amikacina en medio acuoso por casi un orden de magnitud por lo que amikacina es un mejor receptor que las safirina **16**.

## 6. 1. 3. Estudio por potenciometría de las interacciones amikacina – fosfatos.

Los fosfatos son moléculas que tienen un papel importante en la naturaleza y en la industria; por ejemplo forman parte de los nucleótidos, los monómeros en que se basa la composición del ADN, entre otras moléculas de gran relevancia como los fosfoglicéridos. En la agricultura es componente básico de abonos minerales y en la industria alimentaria se utiliza en la elaboración de quesos fundidos. Los fosfatos se basan en átomos de fósforo rodeados en una disposición tetraédrica por átomos de oxígeno, el miembro más pequeño de la familia es el anión simple  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Para el estudio potenciométrico de los fosfatos se utilizaron las especies fenilfosfato (**PhP**) y el nucleótido guanosina – 5' – monofosfato (**GMP**). En general la formación de los complejos amikacina – fosfato comienzan a ser detectables para un mínimo de protonación de uno, en la tabla 17 se presentan las constantes acumulativas ( $\log \beta$ ) secuenciales en donde observamos que el huésped **GMP** forma los complejos  $\text{H}_6\text{AL}^{4+}$  con una estequiometría 1:1.

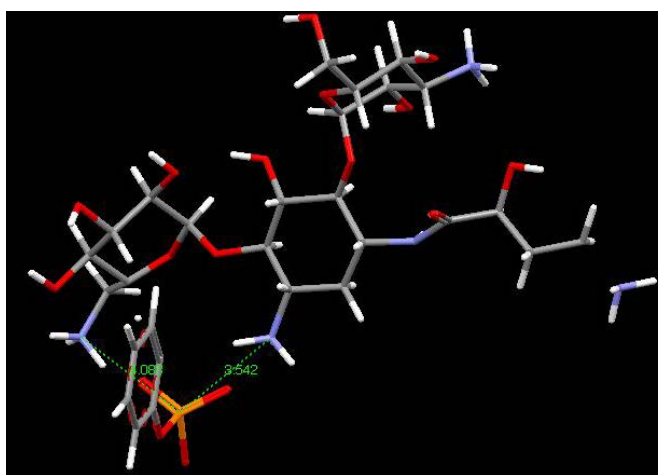
**Tabla 17.** Constantes acumulativas ( $\log\beta$ ) de los complejos formados con iones fosfato y amikacina, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M NaCl a 25°C.

Reacción	$\log \beta^a$	Reacción	$\log \beta^a$
<i>L= PhP</i>		<i>L= GMP</i>	
$\text{A} + \text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{HAL}^-$	12.61	$\text{A} + \text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{HAL}$	12.03
$\text{A} + 2\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_2\text{AL}$	21.91	$\text{A} + 2\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_2\text{AL}$	22.62
$\text{A} + 3\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_3\text{AL}^+$	30.1	$\text{A} + 3\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_3\text{AL}^+$	31.94
$\text{A} + 4\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_4\text{AL}^{2+}$	37.39	$\text{A} + 4\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_4\text{AL}^{2+}$	39.85
$\text{A} + 5\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_5\text{AL}^{3+}$	43.13	$\text{A} + 5\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_5\text{AL}^{3+}$	47.03
		$\text{A} + 6\text{H}^+ + \text{L}^{2-} = \text{H}_6\text{AL}^{4+}$	52.97

$$^a \beta = [\text{ALH}_x] / [\text{A}][\text{L}][\text{H}]^x$$

Los valores de la constante de estabilidad de los complejos con **PhP** y amikacina son mayores conforme el receptor se va protonando. De hecho el valor de  $\log K$  más grande es cuando la amikacina se encuentra tetraprotonada y el huésped se encuentra como dianión ( $\log K = 4.03$ ), tabla 18. Por otro lado, los valores de la suma de los

inversos de las distancias de las cargas del receptor y el huésped,  $\Sigma 1/r_{ij}$ , es de 0.527. Este valor es menor que el calculado para glutarato, sin embargo, las constantes de asociación son mayores, esto se debe posiblemente a las interacciones hidrofóbicas del anillo aromático del huésped con el receptor, ya que a diferencia de ftalato el grupo aromático del **PhP** se encuentra dirigido hacia las hexosas de amikacina, esquema V.



Esquema V

En cuanto al huésped **GMP**, los valores de  $\log K_{assn}$  aumentan conforme el grado de protonación de amikacina aumenta y se observa un valor máximo en la constante  $\log K_{assn}$  cuando el receptor se encuentra completamente protonado y el huésped está completamente desprotonado ( $\log K_{assn} = 6.49$ ), además, los valores de  $\log K_{assn}$  son superiores por alrededor de dos órdenes de magnitud que los valores de las constantes de estabilidad de los complejos con **PhP** para el mismo grado de protonación ( $\log K_{assn} = 4.03$  y  $6.49$ , para los complejos amikacina con **PhP** y **GMP** respectivamente). Así también, los valores de  $\log K_{assn}$  calculados por la ecuación de Sammartano (23) para los complejos de amikacina con **PhP** y **GMP** son menores por casi dos y cuatro órdenes de magnitud respectivamente en comparación con los valores de  $\log K_{assn}$  experimentales, lo cual indica que hay una afinidad importante por parte de amikacina por los aniones fosfato y que es capaz de formar complejos muy estables con

nucleótidos, posiblemente a que el grupo guanidinio del **GMP** estabiliza al complejo por su capacidad de formar mayor cantidad de enlaces de hidrógeno en comparación con el anillo aromático del **PhP**.

Comparando los  $\log K_{assn}$  con los informados anteriormente (ver Capítulo 2), para el mismo grado de protonación el complejo de **GMP** con el receptor 15 es ligeramente mayor que el complejo con la amikacina, posiblemente a que **GMP** adicionalmente el guanidinio forma enlaces de hidrógeno con los grupos – OH de la amikacina.

**Tabla 18.** Constantes de estabilidad ( $\log K$ ) de los complejos amikacina con PhP y GMP, determinadas por mediciones potenciométricas en 0.1M de NaCl a 25°C.

Reacción	$\log K^a$	$\log K^{a,b}$
<i>L= fenilfosfato</i>		
$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	2.81	0.74
$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	3.16	1.36
$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	3.59	2.22
$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	4.03	2.96
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	3.82	1.48
<i>L= GMP<sup>c</sup></i>		
$AH^+ + L^{2-} = ALH^-$	2.23	0.74
$AH_2^{2+} + L^{2-} = ALH_2$	3.87	1.36
$AH_3^{3+} + L^{2-} = ALH_3^+$	5.43	2.22
$AH_4^{4+} + L^{2-} = ALH_4^{2+}$	6.49	2.96
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	4.01	1.48
$AH_4^{4+} + HL^- = ALH_5^{3+}$	3.97	0

<sup>a</sup>  $K = [AH_xL]/[AH_x][L]$

<sup>b</sup>  $\log K$  calculados mediante la ecuación (20')

<sup>c</sup> GMP (Guanosina – 5' – monofosfato)

## **6. 2. Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$**

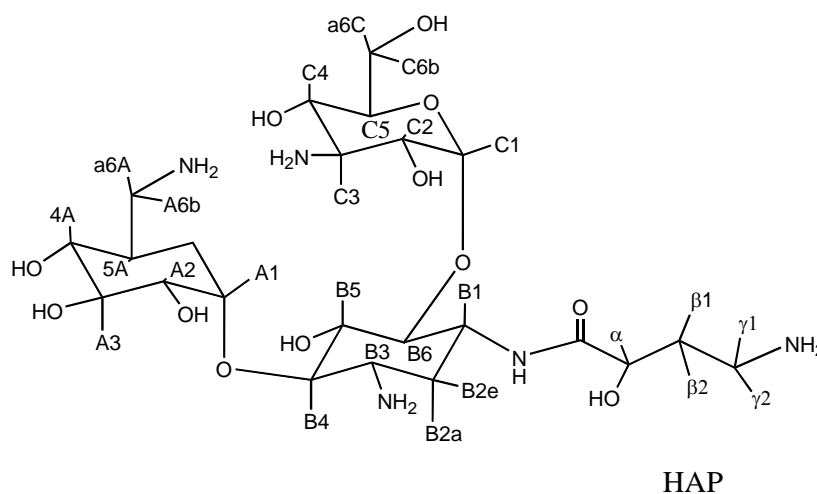
La evaluación de la formación de complejos por RMN fue informada por primera vez en 1955. El empleo de la técnica de RMN para el cálculo de las constantes de asociación se debe a que después de la formación de los complejos anfitrión – huésped, estos presentan cambios substanciales en el desplazamiento químico de sus correspondientes espectros (con la condición de que las especies involucradas estén en equilibrio rápido en la escala de tiempo de RMN). Además, los cambios de desplazamiento químico observados proveen al mismo tiempo información acerca de la conformación de los complejos formados.<sup>4</sup>

Las ventajas de este método sobre los de absorción y emisión electrónica, UV/Vis y fluorescencia son su disponibilidad y sensibilidad, además de la localización periférica los átomos de hidrógeno en una molécula, de tal manera que dichos átomos están más expuestos a interacciones intermoleculares. Por otro lado la técnica de RMN proporciona un gran número de señales independientes para la evaluación de los equilibrios supramoleculares; obteniéndose valores de constantes que difieren por menos de 10% y precisiones de  $\pm 1\%$ .

Bajo condiciones experimentales apropiadas y empleando instrumentos de campo alto se obtienen constantes de asociación confiables, aún si el cambio máximo de desplazamiento observado es  $<0.03$  ppm. De tal forma que el control constante de la temperatura, de pD, disolvente y condiciones salinas (fuerza iónica) son de gran importancia.

Para correlacionar los valores obtenidos por potenciometría, la resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  unidimensional es de gran utilidad; ya que los datos obtenidos nos permiten identificar y confirmar las señales antes informadas por Andersen<sup>55</sup> para los anillos A, B y C, así como el sustituyente HAP a diferentes valores de pH y en

nuestras condiciones de trabajo, figura 11; además permite estudiar de manera cualitativa si existe o no interacción del anillo aromático del ftalato con la molécula de amikacina, ya que al formar complejos con el ftalato estas señales se modificarían y se desplazarían a campos más bajos.



**Figura 11.** La molécula de amikacina en su forma completamente neutra.

En este trabajo, las titulaciones por RMN  $^1\text{H}$  fueron útiles para el estudio de la complejación de amikacina con el ion ftalato, debido a que este anión no es alifático, por lo que sus señales no se traslapan con las de amikacina. La metodología consistió primero, en preparar disoluciones del huésped a diferentes concentraciones (dejando al anfitrión a una concentración fija de 4mM) y a diferentes valores de pD, con el fin de analizar el desplazamiento de las señales de amikacina hacia campo bajo por la presencia del huésped. De las titulaciones por RMN  $^1\text{H}$  a diferentes valores de pD, sólo se observaron un par de señales que mostraban un cambio en el desplazamiento químico, ( $\delta$ ), a pD 9.2. Por este motivo, las titulaciones subsecuentes fueron a pD constante con concentraciones variables de huésped. Las señales que mostraron un cambio mayor en morfología y en desplazamiento químico fueron los dobletes de los protones A6 (ver figura 11), que se encontraban en 3.85 ppm para amikacina sola y que cambiaron a 3.91 ppm para una estequiometría amikacina – ftalato 1:1 y los



dobletes de los protones  $\gamma$  que se encontraban en 3.15 ppm para amikacina sola y que cambiaron a 3.24 ppm, tabla 19. Lo que indica que el ftalato tiene interacción con el grupo amino del sustituyente HAP que se encuentra protonado y con un hidrógeno A6 del anillo A de la amikacina que se encuentra en el mismo carbono que tiene al sustituyente  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ , que también se encuentra protonado.

Si la estabilidad de los complejos amikacina – ftalato es mayor por la interacción del anillo aromático del huésped con la amikacina, las señales correspondientes a los aromáticos se despazarían a campo alto y cambiarían de forma. Sin embargo, los espectros de resonancia magnética nuclear a pD 9.2 no muestran ningún cambio en la región de los aromáticos, por lo que se concluye que a pD 9.2, la nube  $\pi$  del anillo aromático no tiene interacción alguna con la molécula de amikacina y las interacciones que participan en la estabilidad del complejo son sólo las interacciones carga – carga.

**Tabla 19.** Desplazamientos químicos de los hidrógenos A6 y  $\gamma$ , a pD 9.2

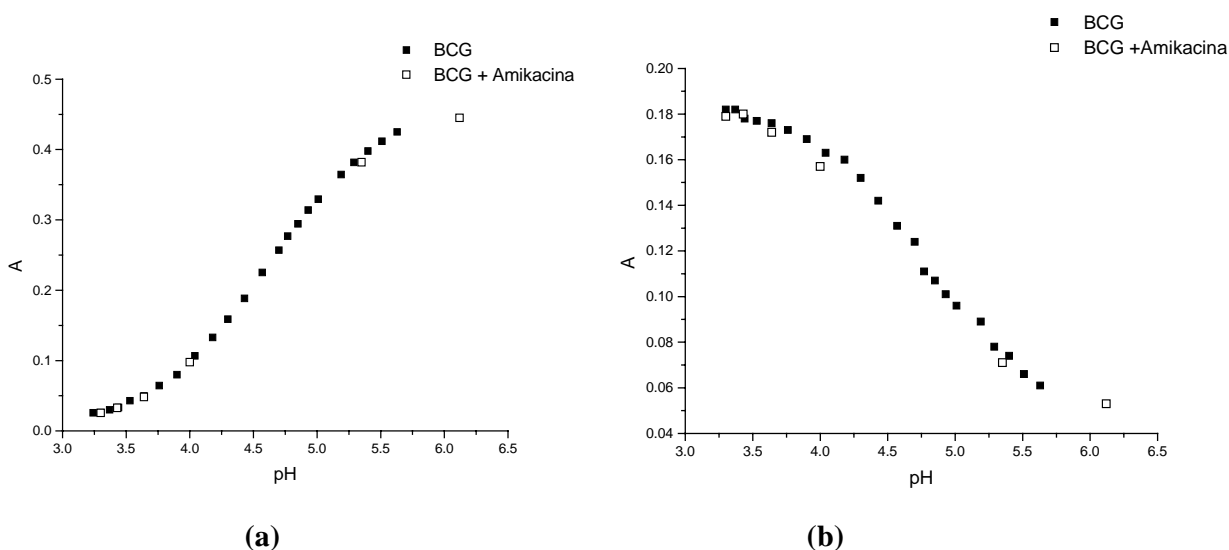
	$\delta$ (ppm)			
[Ftal], mM	0	1	2	4
A6	3.85	3.92	3.89	3.91
$\gamma$	3.13	3.23	3.21	3.24

La estabilización del complejo posiblemente se debe a la rigidez que le confiere el anillo aromático, que hace que las cargas negativas estén más dirigidas hacia los sitios con carga positiva de la amikacina y que a diferencia de los carboxilatos alifáticos que tienen más movilidad, puedan formar aductos más estables.

### 6. 3. Espectrofotetría

#### 6. 3. 1. Estudio por espectrofotetría de las interacciones amikacina – indicadores aniónicos.

Como se ha visto los complejos que presentan mayor estabilidad con amikacina son los que tienen cargas negativas y por lo menos un grupo aromático. Por tal motivo los aniones como fenol rojo (**PhR**) y bromocresol verde (**BCG**) son buenos huéspedes a estudiar por espectrofotetría UV/Vis, debido a que sus cambios en absorbancia de sus sustituyentes aromáticos pueden seguirse fácilmente.



**Figura 10.** Gráfica del cambio de absorbancia con respecto al pH del indicador bromocresol verde (**BCG**) solo (■) y con amikacina (□), (a) a 430 nm; (b) a 617nm.

Debido a que **PhR** y **BCG** son compuestos utilizados como indicadores de pH, se titularon primero los huéspedes solos, y posteriormente se titularon en presencia de amikacina. Los resultados de este estudio a 430nm y 617nm mostraron que no hay un cambio substancial en la absorbancia con respecto al pH cuando en la solución de

colorante se encuentra la amikacina; observándose sólo el cambio en absorbancia debido al aumento de pH, figura 10. Por lo que se concluye que no hay interacción detectable entre amikacina y los aniones **PhR** y **BCG**, posiblemente porque la carga negativa de estos aniones se encuentra deslocalizada en toda la molécula, que hace que la carga esté menos disponible para una interacción efectiva con amikacina.

## 7. Conclusiones

La molécula de amikacina protonada es capaz de asociarse en solución acuosa con aniones como carboxilatos y fosfatos en un intervalo de pH de 4.5 a 11.

La estequiometría de los complejos anfitrión - huésped fue de 1:1, con valores del logaritmo de las constantes de asociación que van de 2.1 a 4.3 para carboxilatos y de 4.3 a 6.5 para fosfatos.

La estabilidad de los complejos con amikacina depende de diferentes factores. El primero es que el anfitrión experimenta un reajuste conformacional para acomodar sus sitios de enlace de manera complementaria al huésped durante el proceso de unión, por lo que la estabilidad de los complejos depende generalmente de qué tanto el anfitrión se doble.

Segundo, que exista una complementariedad entre las cargas negativas del huésped con el anfitrión. En este sentido, la amikacina forma complejos más estables con succinato que con otros carboxilatos alifáticos, posiblemente porque existe complementariedad entre la distancia de los carboxilatos del succinato con la distancia entre los grupos amonio de los anillos A y B de la amikacina.

Con el ion malato, la amikacina no muestra selectividad quiral. Se observó que el grupo hidroxilo de malato no interviene en la estabilidad del complejo.

Tercero, la rigidez de los huéspedes incrementa la estabilidad de los complejos, debido a que existe un incremento favorable de la entropía ( $T \Delta S^\circ > 0$ ), ya que los parámetros de  $\Delta G^\circ$  y  $T \Delta S^\circ$  son estrictamente dependientes de la carga. Por lo que los complejos formados con carboxilatos que tengan un sustituyente aromático son los más estables,

posiblemente por efecto hidrofóbico en el caso de benzoato y por rigidez en el caso de ftalato.

Otra característica importante es la formación de enlaces de hidrógeno que estabilicen a los complejos, que se traduce en valores mayores de las constantes de estabilidad. Los complejos formados entre la amikacina y nucleobases como GMP son mayores que con cualquier otro anión estudiado; estas no pueden ser explicadas por interacciones carga – carga solamente, ya que el fragmento guanosina posiblemente esté formando enlaces de hidrógeno con otros grupos de amikacina.

Finalmente, la semirigidez del receptor tiene la ventaja de ser lo suficientemente móvil para cambiar de conformación y a su vez contar con una preorganización de sus grupos funcionales, con el fin de formar complejos más estables; por lo que se obtuvieron constantes de asociación de más de un orden de magnitud mayores o iguales con los mismos huéspedes para los complejos con amikacina, que con los macrociclos hexaaza con mayor organización, informados por Kimura y Lehn.

## BIBLIOGRAFÍA

1. a) Wolf K. L., Frahm H., Harás H., *Pys. Chem. Abt.*, **1937**, B37, 17.; b) Wolf K. L., Dunken H., Merkel K. Z., *Pys. Chem. Abt.*, **1940**, 46, 287; c) Wolf K. L., Wolf R., *Angew. Chem.*, **1949**, 61, 191.
2. Lehn J. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 27, 89.
3. Lindoy L. F., Atkinson I. M., *Self - assembly in Supramolecular Systems*, Monographs in supramolecular chemistry, 2000, RSC Cambridge University Press. UK.
4. Schneider H. J. y Yatsimirsky A., *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley and Sons, England, **2000**.
5. Schneider H. J. y Theis I., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 753.
6. Schneider H. J., *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 227.
7. De Robertis A., De Stefano C., Foti C., Giuffrè O., Sammartano S., *Talanta*, **2001**, 54, 1135.
8. Hossain M. A. y Schneider H. J., *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5(4), 1284.
9. Cascio S., De Robertis A., De Stefano C., Foti C., Gianguzza A., Sammartano S., *J. Chem. Eng. Data*, **2000**, 45, 717.
10. Moet – Ner M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4906.
11. Jeffrey G. A., *An introduction to hydrogen bonding*, 1997, Oxford University Press, N. Y.. EUA.
12. Lehn J. M., *Struct. Bonding (Berlin)*, **1973**, 16, 1.
13. Schmitdhen F. P., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 2918.
14. García – España E., Díaz P., Llinares J: M. and Bianchi A., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 2952.
15. Filby M. H. and Steed J. W., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3200.

16. Witchmann K., Antonioli A., Söhnel T., Wenzel M., Gloe K., Gloe K., Price J. R., Lindoy L. F., Blake A. J., Schröder M., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 2987.
17. Frontera A., Morey J., Oliver A., Piña N., Quiñonero D., Costa A., Ballester P., Deyá P. M.,† and Anslyn E. V., *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 7185.
18. Bencini A., Bianchi A., Burguete M. I., Dapporto P., Doménech A., García – España E., Luis S. V., Paoli P., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1994**, 569.
19. Kimura E., Sakonaka A., Yatsunami T. and Kodama M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 3041.
20. Fitzmaurice R. J., Kyne G. M., Douheret D. and Kilburn J. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **2002**, 841.
21. Franz Schmidtchen, Berger M., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1609.
22. Bencini A., Bianchi A., Burguete M. I., García – España E., Luis S. V., Ramírez J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1919.
23. Bencini A., Bianchi A., Burguete M. I., Dapporto P., Doménech A., García – España E., Luis S. V., Paoli P. y Ramírez J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1994**, 569.
24. Alfonso I., Dietrich B., Rebolledo F., Gotor V., Lehn J. M., *Helvetica Chimica Acta*, **2001**, 84, 280.
25. Claude S., Lehn J. M., Vigneron J. P., *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30, 941.
26. Claude S., Lehn J. M., Schmidt F. and Vigneron J. P., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1182.
27. Sessler J. L., Andrievsky A., Král V., Lynch V., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9385.
28. Dietrich B., Fyles D. L., Fyles T. M., Lehn J. M., *Helv. Chim. Acta*, **1979**, 62, 2763.
29. Galán A., Andreu D., Echavarren A. M., Prados P., De Mendoza J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1511.
30. Bazzicalpuli C., Bencini A., Bianchi A., Fusi V., García – España E., Giorgi C., Llinares J. M., Ramírez J. A., Valtancoli B., *Inorg Chem.*, **1999**, 38, 620.
31. Kane R. S., Glink P. T., Chapman R. G., McDonald J. C., Jensen P. K., Gao H., Paša-Tolić L., Smith R. D., and Whitesides G. M., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4028.

32. Andemen N. H., Eaton H. L., Nguyen K. T., Hartzell C., Nelson R. J., and Priest J. H., *Biochemisry*, **1988**, 27, 2782.
33. Bau R. and Tsyba I., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 14839.
34. Jezowska – Bojczuk M. y Wojciech B., *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **1998**, 153.
35. Johansson A. y Johansson S., *Analyst*, **1978**, 103, 305.
36. Papanastasiou G., Ziogos I., *Talanta*, **1995**, 42, 827.
37. Dahlgren G., Long F. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 1303.
38. King E. J., Prue J. E., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 245.
39. Pinching G. D., Bates R. G., *J. Res. NBS*, **1948**, 40, 405.
40. German W. L., Vogel A. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 1546.
41. Darken L. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 1007.
42. Hamer W. J., Burton J. O. Acree S. F., *J. Res. NBS*, **1940**, 24, 269.
43. German W. L., Vogel A. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 1546.
44. Larson E., *Z. Among und allg. Chem.*, **1926**, 155, 247.
45. Jones J., Soper F. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 133.
46. Speakman J. C., *J. Chem. Soc.*, **1940**, 855.
47. Duboux M., Tsamadas D., *Helv. Chim. Acta.*, **1924**, 7, 855.
48. Hamer W. J., Acree S. F., *J. Res. NBS*, **1945**, 35, 539.
49. Friedman S., Pace B. and Pizer R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 5381.
50. Stock J. y Vanden Driessche J., *Biochim. Biophys.*, **1963**, 72, 137.
51. Kapovits I., Ruff F., Kussman A., *Tetrahedron*, **1972**, 28, 4413.
52. Bjerrum N., Unmack A., *Kg 1. danske vid. saleskab Mat. – fys. medd*, **1929**, 9 No. 1.
53. Schwarzenbach G., Epprecht A., Erlenmeyer H., *Helv. Chim. Acta.*, **1926**, 9, 1292.



## *Bibliografía*

54. Edward J. T. Farrell P.G. Kirchnerova J., Halle J – C., Schaa I. R., *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 1899.
55. Andersen N. H., Eaton H. L., Nguyen K. T., Hartzell C., Nelson R. J. and Priest J. H., *Biochemistry*, **1988**, 27, 2782.

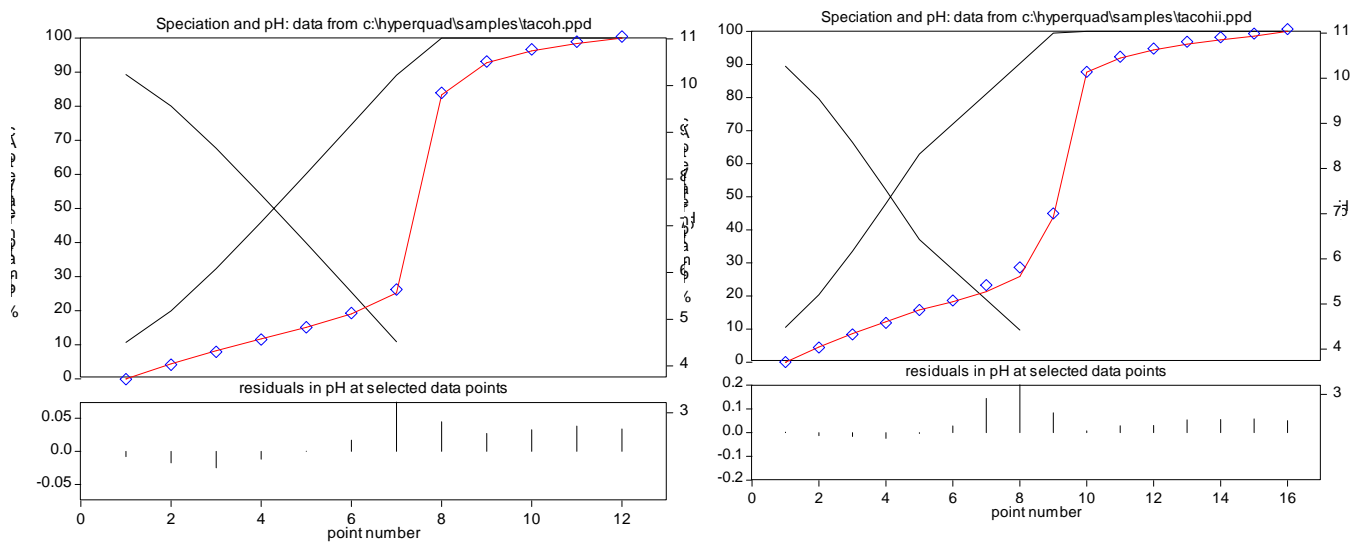
## Titulaciones Hyperquad

### Huéspedes

A continuación se presentan los ajustes que se realizaron a los huéspedes por medio del programa *HYPERQUAD 2000*.

#### Acetato

Ajuste de la titulación de acetato 0.0018M.



(a)

(b)

(a) 2 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.6602

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1047E-13		-13.9800		0 -1
Beta B refined	4.4509E 4	0.0071	4.6485	0.0031	1 1

(b) 1 iterations

Refinement successful

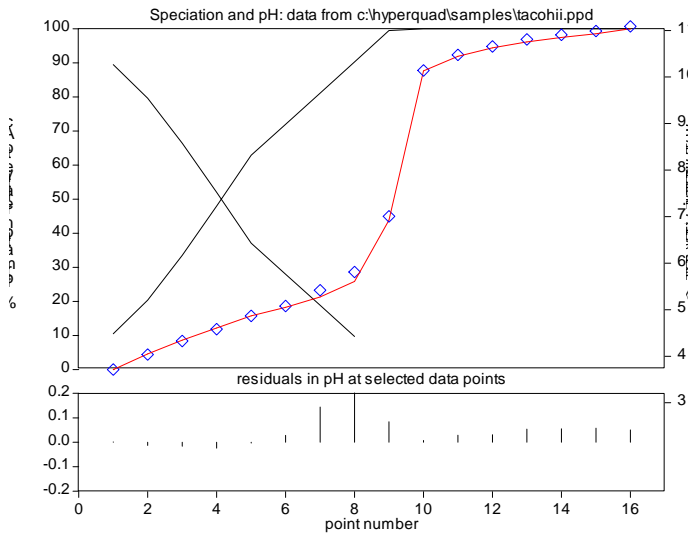
Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 1.2123

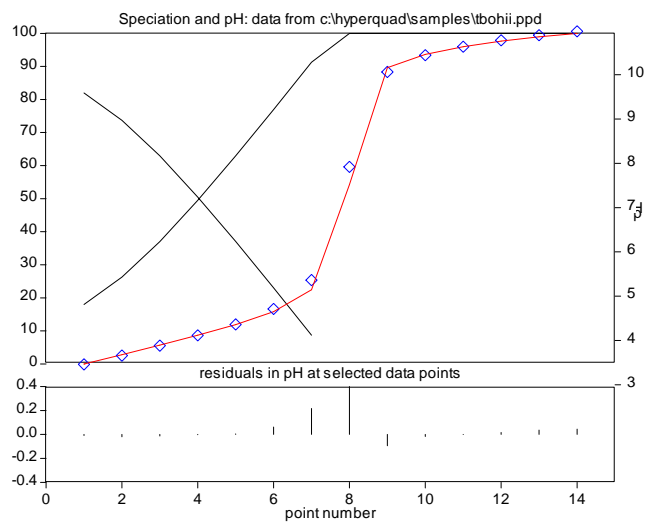
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1175E-13		-13.9300		0 -1
Beta B refined	4.3746 E 4	0.0773	4.6409	0.0336	1 1

Benzoato

Ajuste de la titulación de benzoato 0.0019M.



(a)



(b)

(a) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 1.5884

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1253E-13		-13.9022		0 -1
Beta B refined	1.5562E 4	0.0782	4.1921	0.0340	1 1

(b) 1 iterations

Refinement successful

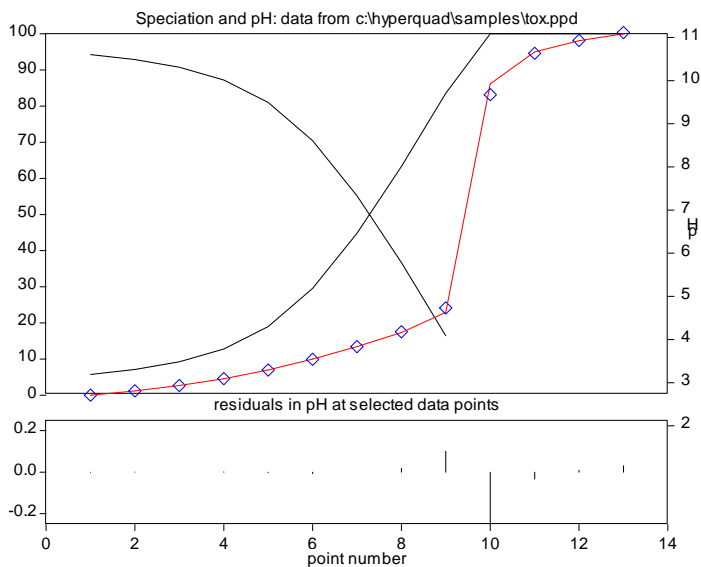
Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.4742

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1175E-13		-13.9300		0 -1
Beta B refined	1.3389E 4	0.0195	4.1267	0.0085	1 1

Oxalato

Ajuste de la titulación de oxalato 0.0018M.

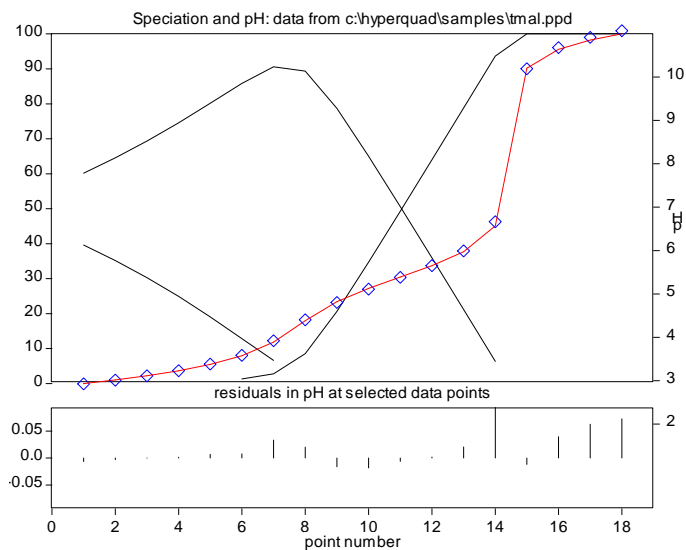


1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.2823

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1072E-13		-13.9700		0 -1
Beta B refined	8.4253E 3	0.0047	3.9256	0.0020	1 1

Malonato

Ajuste de la titulación de malonato 0.0019M.

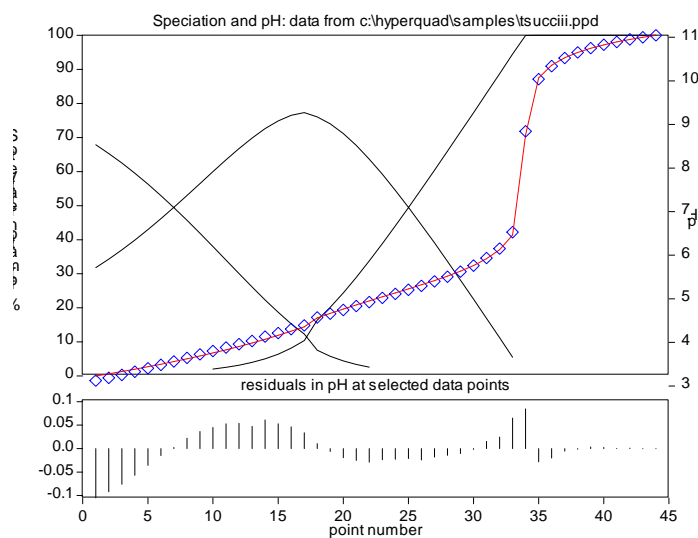


1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.5718

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 -1
Beta B refined	2.5201E 5	0.0196	5.4014	0.0085	1 1
Beta C refined	1.4272E 8	0.0420	8.1545	0.0183	1 2

Succinato

Ajuste de la titulación de succinato 0.002M.

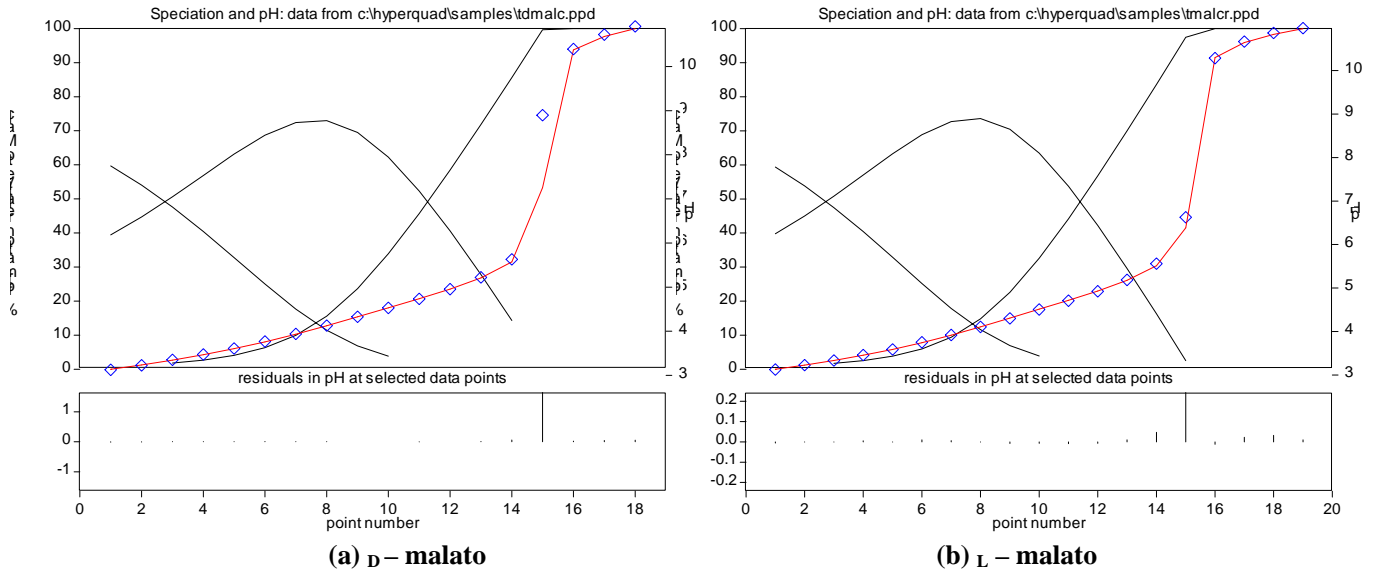


1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.5343

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 -1
Beta B refined	1.6948E 5	0.0293	5.2291	0.0127	1 1
Beta C refined	6.1472E 8	0.0425	8.7887	0.0185	1 2

*D*-malato y *L*-malato

Ajuste de la titulación de *D*-malato y *L*-malato 0.0018M.



(a) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.0462

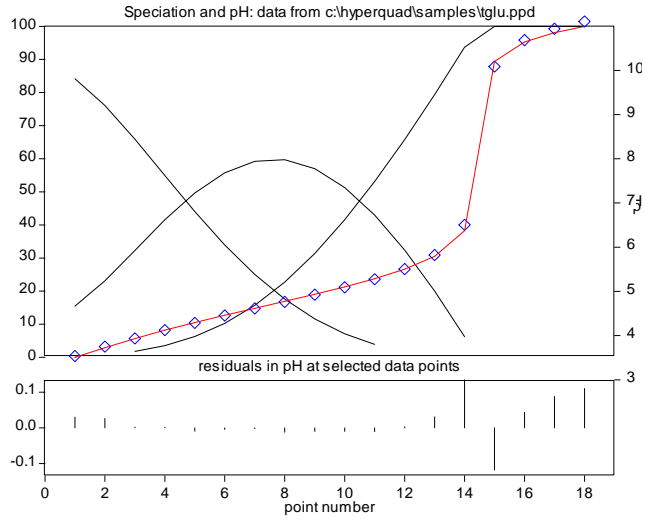
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 -1
Beta B refined	6.2460E 4	0.0042	4.7956	0.0018	1 1
Beta C refined	1.3045E 8	0.0471	8.1155	0.0204	1 2

(b) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.6223

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 -1
Beta B refined	6.3652E 4	0.0277	4.8038	0.0120	1 1
Beta C refined	1.2866E 8	0.0337	8.1094	0.0146	1 2

Glutarato

Ajuste de la titulación de glutarato 0.0019M.

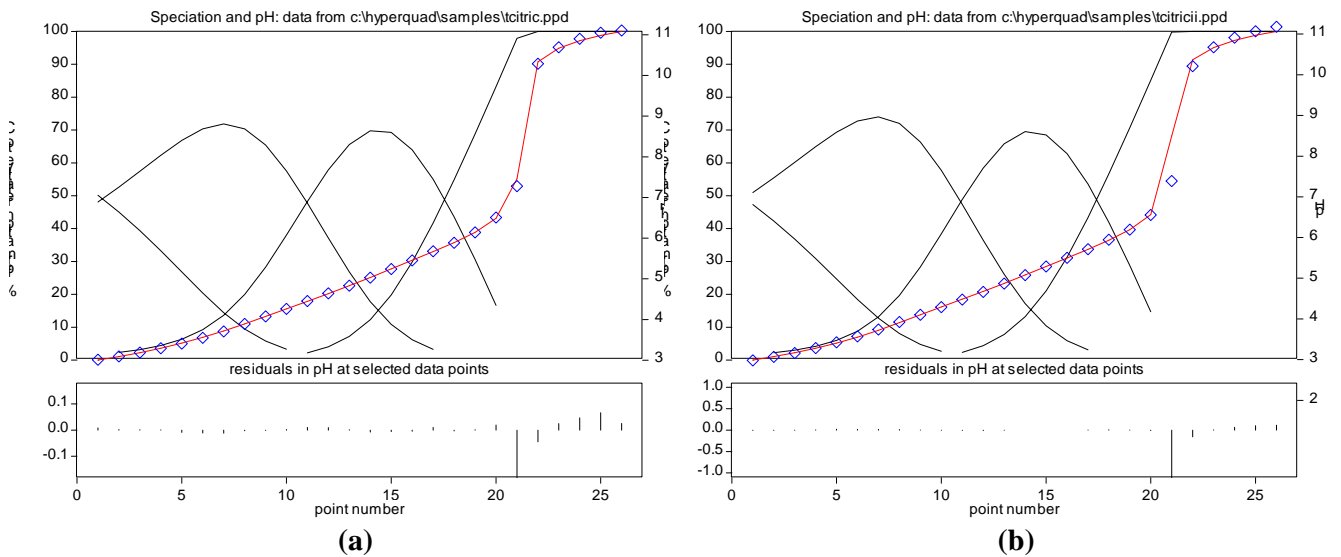


1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.7024

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 -1
Beta B refined	1.5635E 5	0.0186	5.1941	0.0081	1 1
Beta C refined	2.7435E 9	0.0303	9.4383	0.0132	1 2

Citrato

Ajuste de la titulación de glutarato 0.0018M



(a) 1 iterations

Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.2817

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1096E-13		-13.9600		0 -1
Beta B refined	6.1668E 5	0.0610	5.7901	0.0265	1 1
Beta C refined	1.7066E 10	0.0735	10.2321	0.0319	1 2
Beta D refined	1.7962E 13	0.0856	13.2543	0.0372	1 3

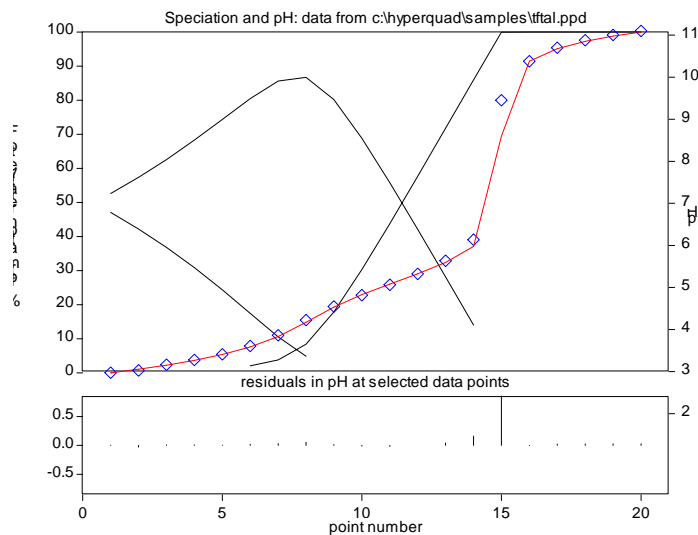
(b) 1 iterations

Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 8.9554

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1175E-13		-13.9300		0 -1
Beta B refined	6.3379E 5	0.4514	5.8019	EXCESSIVE	1 1
Beta C refined	1.8782E 10	0.5237	10.2738	EXCESSIVE	1 2
Beta D refined	1.7033E 13	0.6386	13.2313	EXCESSIVE	1 3

Ftalato

Ajuste de la titulación de ftalato 0.0019M.



1 iterations

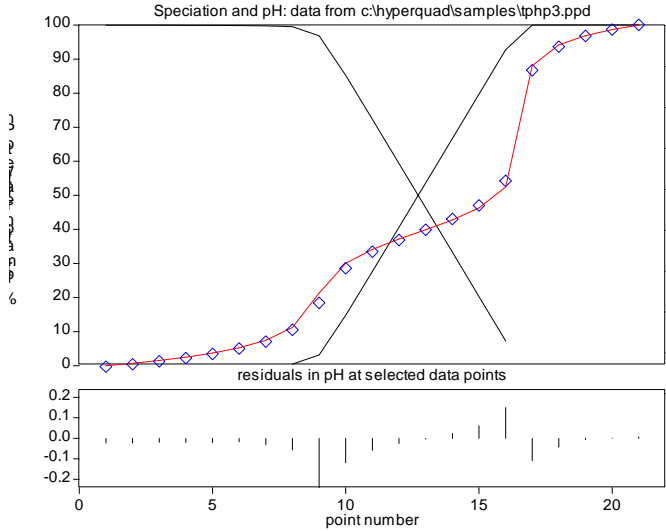
Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.8910

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1175E-13		-13.9300		0 -1
Beta B refined	1.5367E 5	0.0213	5.1866	0.0093	1 1
Beta C refined	1.2911E 8	0.0519	8.1109	0.0226	1 2



Fenilfosfato

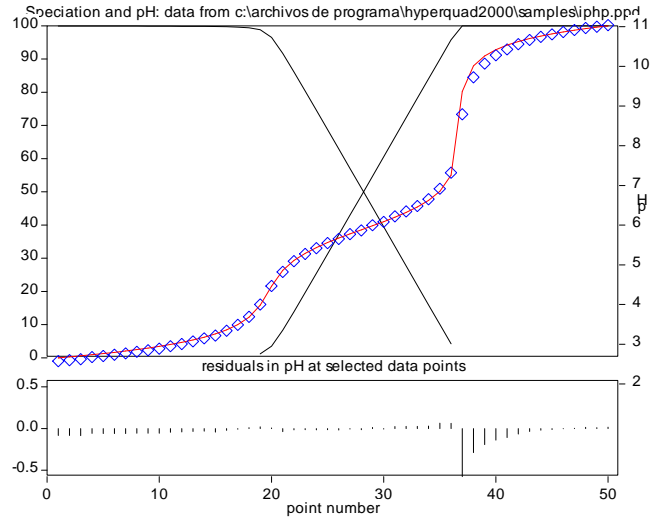
Ajuste de la titulación de fenilfosfato 0.002M.



(a)

(a) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.9782

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1072E 13		-13.9700		0 -1
Beta B refined	8.9249E 5	0.0443	5.9506	0.0193	1 1



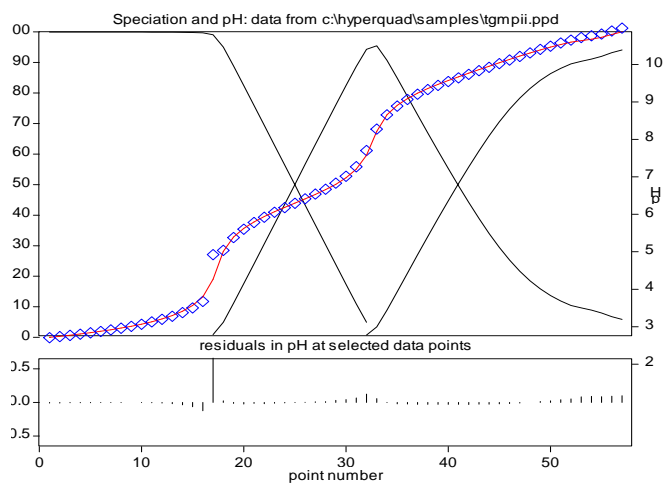
(b)

(b) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Chi-squared = 37.04  
 Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level  
 sigma = 3.3213

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1403E-13		-13.8531		0 -1
Beta B refined	7.9884E 5	0.0881	5.9025	0.0383	1 1

GMP

Ajuste de la titulación de GMP 0.0018M.

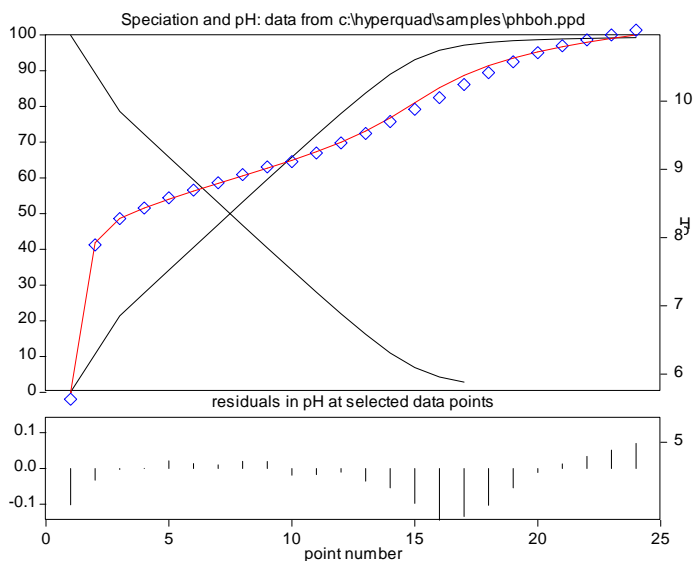


1 iterations  
 Refinement successful  
 Chi-squared = 65.25  
 Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level  
 sigma = 1.8642

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1585E-13		-13.8000		0 -1
Beta B refined	4.6171E 9	0.0501	9.6644	0.0217	1 1
Beta C refined	9.1347E 15	0.0763	15.9607	0.0332	1 2

Ácido fenilborónico

Ajuste de la titulación de ácido fenilborónico 0.0024M.



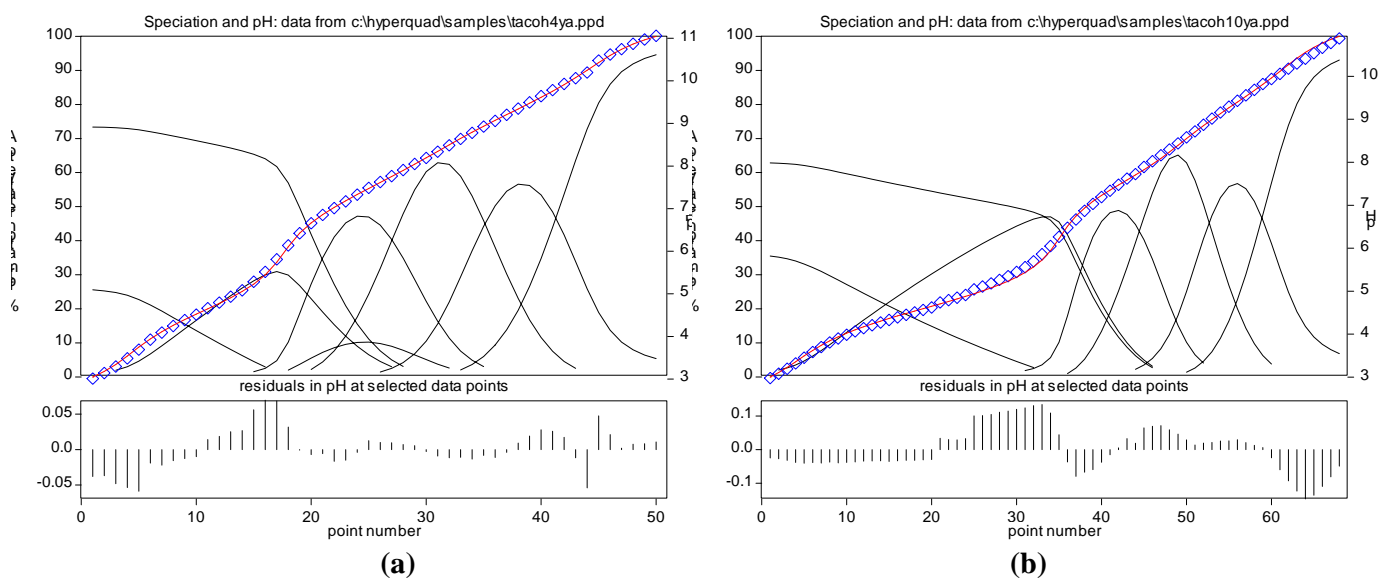
1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.2640

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1445E-13		-13.8400		0 -1
Beta B refined	7.0363E 8	0.0122	8.8473	0.0053	1 1

*Complejos amikacina – huésped*

Amikacina – acetato

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y acetato 0.0035 y 0.0081M según los esquemas (a) y (b).



(a) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Chi-squared = 13.68  
 Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level  
 sigma = 0.7891

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1122E-13		-13.9500		0 0 -1
Beta B constant	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C constant	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	4.4668E 4		4.6500		0 1 1
Beta G refined	2.2987E 28	0.1970	28.3615	0.0856	1 1 3
Beta H refined	4.3884E 35	0.1036	35.6423	0.0450	1 1 4
Beta I refined	1.2028E 40	0.1889	40.0802	0.0820	1 1 5

(b) 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 12.71

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

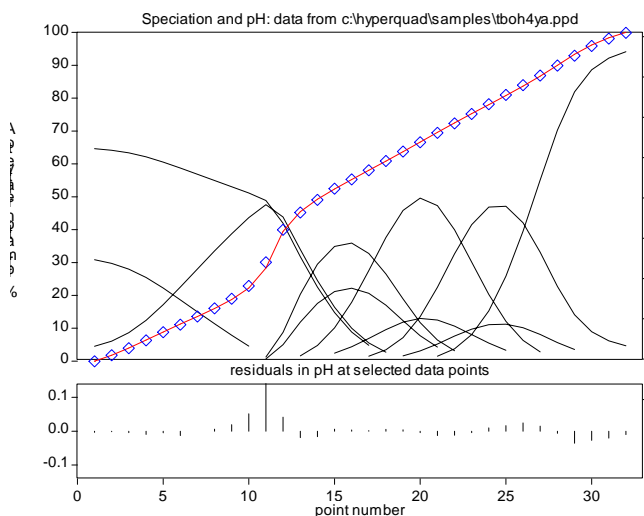
sigma = 3.0805

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant					0 0 -1
Beta B constant	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C constant	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	4.4668E 4		4.6500		0 1 1
Beta G refined	3.6334E 35	0.2433	35.5603	0.1057	1 1 4
Beta H refined	7.9806E 39	0.4306	39.9020	EXCESSIVE	1 1 5

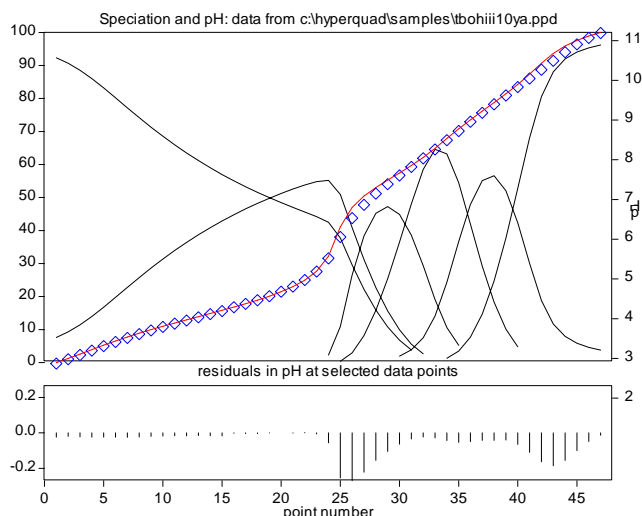
Amikacina – benzoato

Ajuste de la titulación amikacina 0.0018M y benzoato 0.0034 y 0.0085M según los esquemas

(c) y (d).



(c)



(d)

(e) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.6380

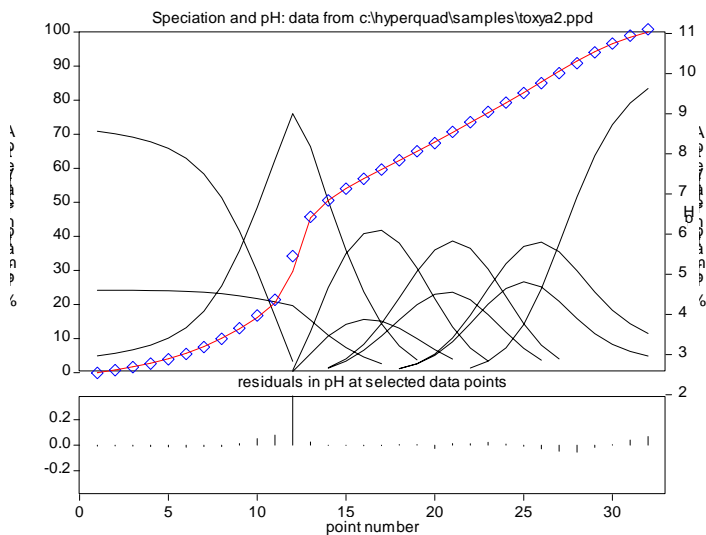
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B constant	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C constant	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.4454E 4		4.1600		0 1 1
Beta G refined	5.1725E 11	0.1975	11.7137	0.0858	1 1 1
Beta H refined	5.2745E 20	0.1822	20.7222	0.0791	1 1 2
Beta I refined	7.6386E 28	0.1229	28.8830	0.0534	1 1 3
Beta J refined	9.8978E 35	0.0978	35.9955	0.0425	1 1 4
Beta K refined	6.0570E 39	0.1770	39.7823	0.0768	1 1 5

(d) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 2.7466

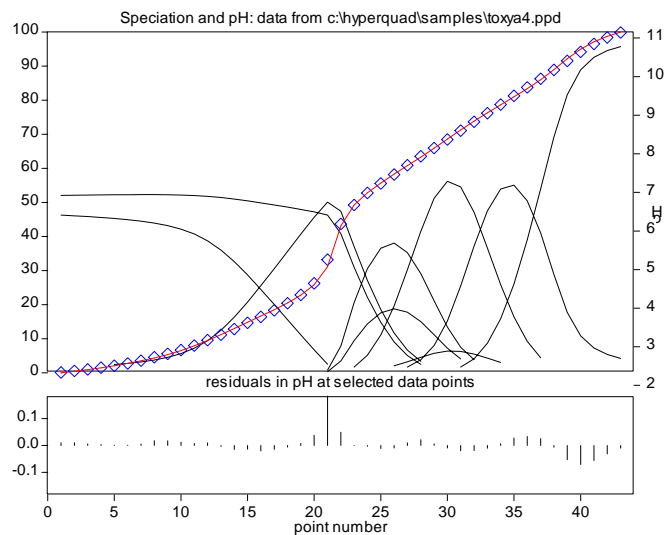
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.4454E 4		4.1600		0 1 1
Beta J refined	4.1392E 35	0.1381	35.6169	0.0600	1 1 4

Amikacina – oxalato

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y oxalato 0.0019 y 0.0038M según los esquemas (e) y (f).



(e)



(f)

(e) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.3385

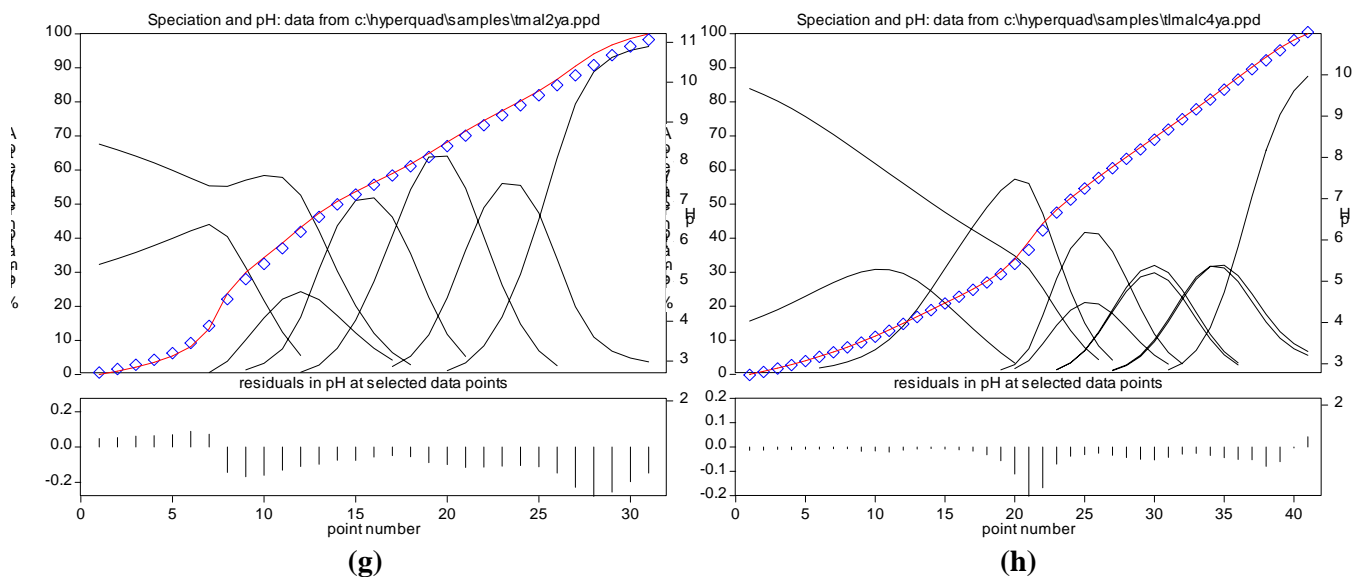
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	8.3176E 3		3.9200		0 1 1
Beta G refined	9.6497E 12	0.1455	12.9845	0.0632	1 1 1
Beta H refined	1.2513E 22	0.1411	22.0974	0.0613	1 1 2
Beta I refined	1.4839E 30	0.1445	30.1714	0.0628	1 1 3
Beta J refined	2.0822E 37	0.1352	37.3185	0.0587	1 1 4
Beta K refined	1.0638E 41	0.1773	41.0268	0.0770	1 1 5

(f) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.1128

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	8.3176E 3		3.9200		0 1 1
Beta G refined	1.9522E 20	0.5753	20.2905	EXCESSIVE	1 1 2
Beta H refined	5.3008E 28	0.2014	28.7243	0.0875	1 1 3
Beta I refined	9.7786E 35	0.1430	35.9903	0.0621	1 1 4
Beta J refined	5.8306E 39	0.1954	39.7657	0.0849	1 1 5

Amikacina – malonato

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y malonato 0.002 y 0.004M según los esquemas (g) y (h).



(g) 4 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 3.8664

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	2.5119E 5		5.4000		0 1 1
Beta G refined	1.4125E 8		8.1500		0 1 2
Beta H refined	2.5794E 35	1.3751	35.4115	EXCESSIVE	1 1 4
Beta I refined	1.5712E 40	4.2421	40.1962	EXCESSIVE	1 1 5

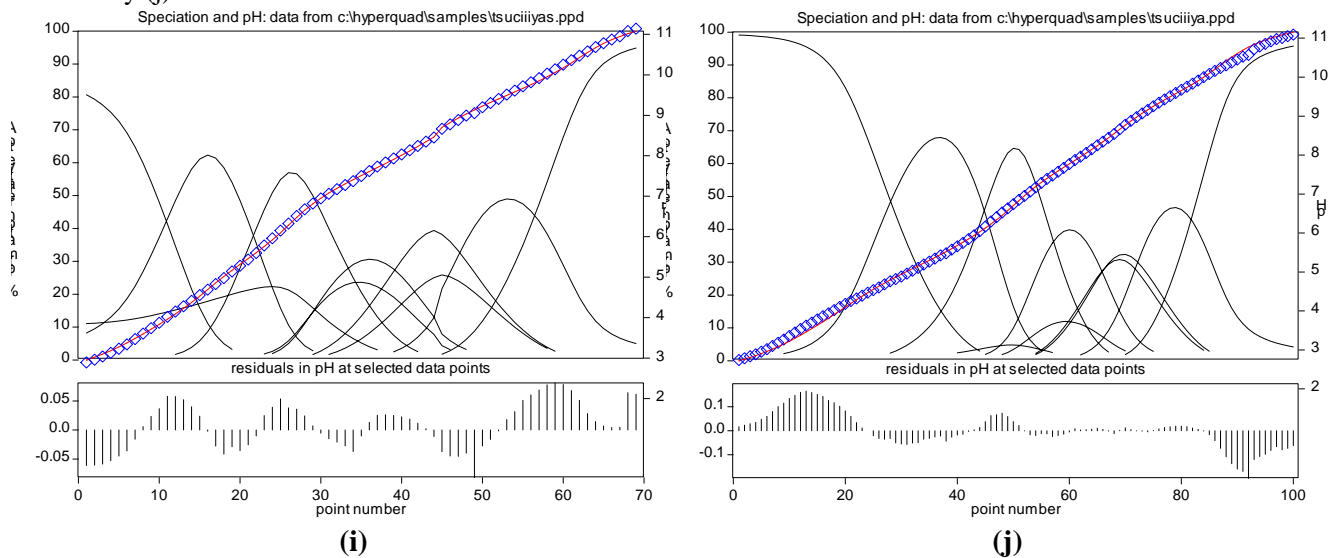
(h) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.6230

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.9772E-14		-14.0100		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	2.5119E 5		5.4000		0 1 1
Beta G refined	1.4125E 8		8.1500		0 1 2
Beta H refined	2.2664 E 11	0.7908	11.3553	EXCESSIVE	1 1 1
Beta I refined	7.0516E 19	2.1740	19.8483	EXCESSIVE	1 1 2
Beta J refined	2.7555E 35	0.3156	35.4402	0.1371	1 1 4
Beta K refined	1.3888E 40	0.7878	40.1426	EXCESSIVE	1 1 5

Amikacina – succinato

Para un mejor ajuste se incluyeron los complejos [ALH<sub>6</sub>]; en donde L= succinato.

Ajuste de la titulación de amikacina 0.002M y succinato 0.002 y 0.004M según los esquemas (i) y (j).



(i) 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 9.26

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.0007

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.6982E 5		5.2300		0 1 1
Beta G constant	6.1660E 8		8.7900		0 1 2
Beta H refined	2.9979E 21	0.1373	21.4768	0.0596	1 1 2
Beta I refined	4.5860E 29	0.1164	29.6614	0.0506	1 1 3
Beta J refined	1.0124E 37	0.0940	37.0054	0.0408	1 1 4
Beta K refined	3.6480E 42	0.1095	42.5621	0.0475	1 1 5
Beta L refined	3.2287E 46	0.1100	46.5090	0.0478	1 1 6

(j) 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 23.04

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

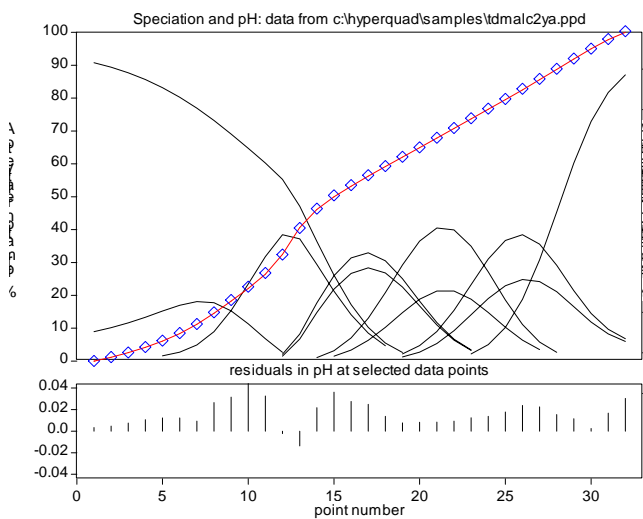
sigma = 4.7817

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1413E-13		-13.8500		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.6982E 5		5.2300		0 1 1
Beta G constant	6.1660E 8		8.7900		0 1 2
Beta H refined	2.1351E 21	0.2231	21.3294	0.0969	1 1 2
Beta I refined	4.5365E 29	0.1908	29.6567	0.0829	1 1 3
Beta J refined	1.4901E 37	0.1593	37.1732	0.0692	1 1 4
Beta K refined	1.9177E 43	0.1765	43.2828	0.0767	1 1 5
Beta L refined	1.2103E 48	0.1814	48.0829	0.0788	1 1 6

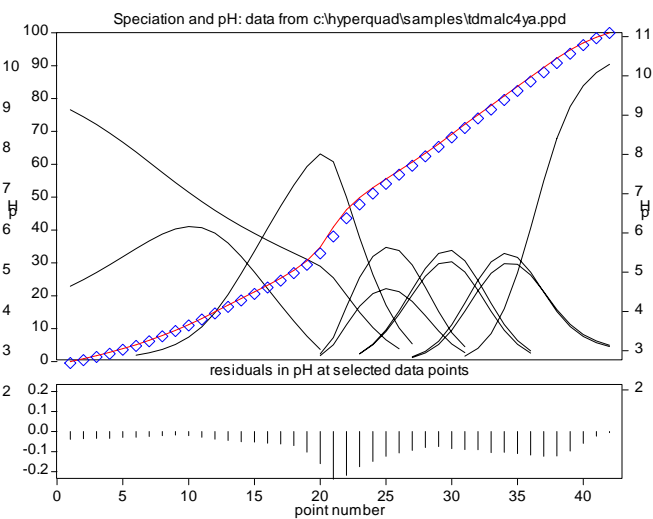


Amikacina – malato

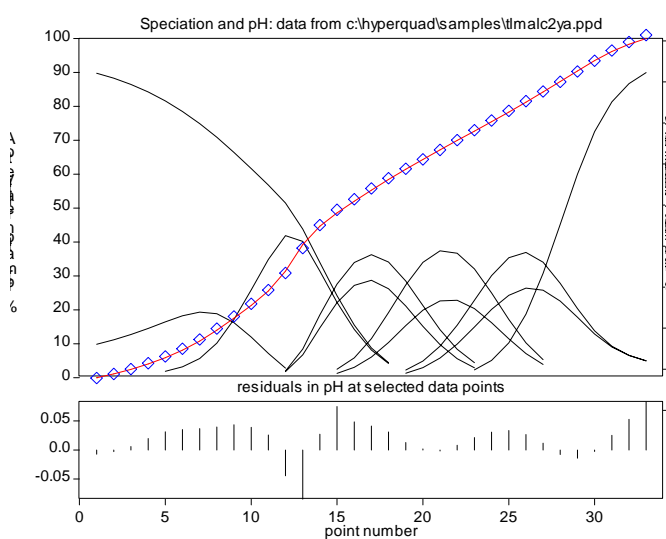
Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y D – malato y L – malato cada uno en concentraciones 0.0018 y 0.0036M según los esquemas (k), (l), (m) y (n).



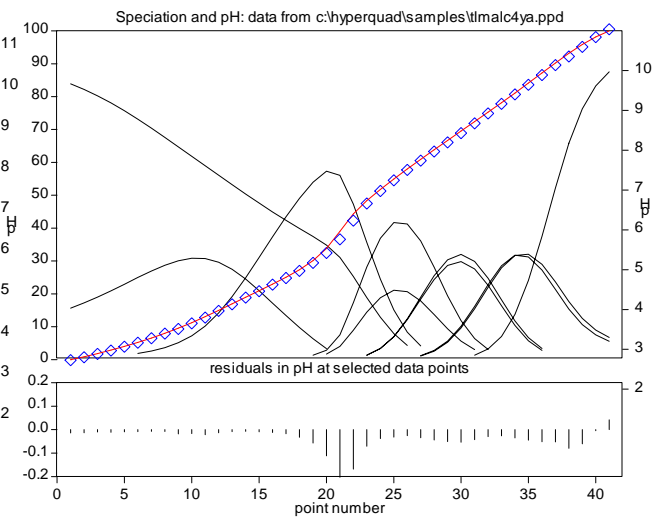
**(k)**



**(l)**



**(m)**



**(n)**

(k) 1 iterations

Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 0.6619

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.3096E 4		4.8000		0 1 1
Beta G refined	1.2882E 8		8.1100		0 1 2
Beta H refined	3.6226E 12	0.0941	12.5590	0.0409	1 1 1
Beta I refined	2.8728E 21	0.1012	21.4583	0.0439	1 1 2
Beta J refined	2.9449E 29	0.0915	29.4691	0.0397	1 1 3
Beta K refined	2.0149E 36	0.0757	36.3043	0.0329	1 1 4
Beta L refined	3.7664E 40	0.1245	40.5759	0.0541	1 1 5

(l) 1 iterations

Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 3.2926

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1072E-13		-13.9700		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.3096E 4		4.8000		0 1 1
Beta G refined	1.2882E 8		8.1100		0 1 2
Beta H refined	2.2448E 12	0.3667	12.3512	EXCESSIVE	1 1 1
Beta I refined	2.6176E 21	0.3116	21.4179	0.1353	1 1 2
Beta J refined	2.2368E 29	0.3476	29.3496	EXCESSIVE	1 1 3
Beta K refined	2.6234E 36	0.2021	36.4189	0.0878	1 1 4
Beta L refined	6.6977E 40	0.2506	40.8259	0.1088	1 1 5

(m) 1 iterations

Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.4145

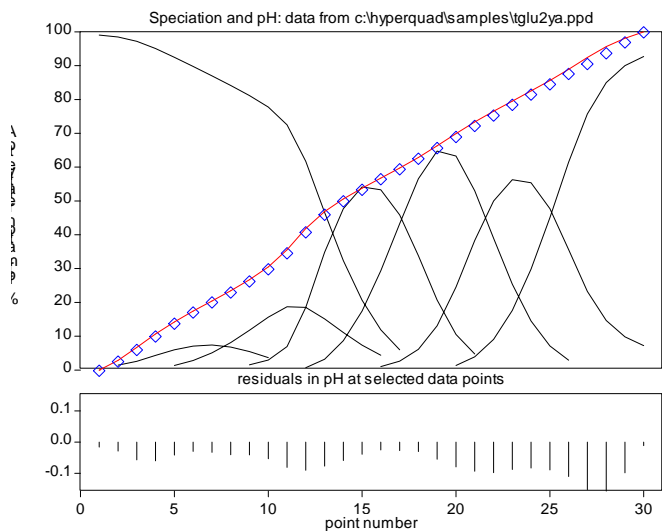
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.9772E-14		-14.0100		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.3096E 4		4.8000		0 1 1
Beta G refined	1.2882E 8		8.1100		0 1 2
Beta H refined	4.1660E 12	0.1903	12.6197	0.0826	1 1 1
Beta I refined	3.5971E 21	0.1969	21.5560	0.0855	1 1 2
Beta J refined	4.9677E 29	0.1599	29.6962	0.0695	1 1 3
Beta K refined	2.5848E 36	0.1484	36.4124	0.0644	1 1 4
Beta L refined	4.2839E 40	0.2567	40.6318	0.1115	1 1 5

(n) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.6230

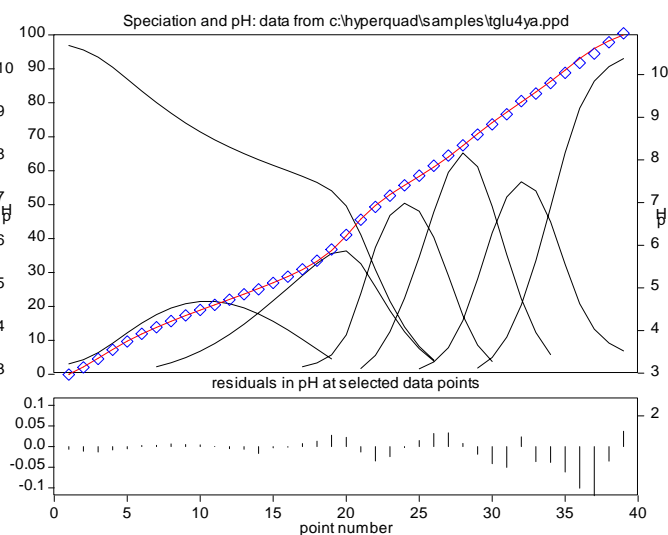
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.9772E-14		-14.0100		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	2.5119E 5		5.4000		0 1 1
Beta G refined	1.4125E 8		8.1500		0 1 2
Beta H refined	2.4738E 12	0.1740	12.3934	0.0756	1 1 1
Beta I refined	2.5055E 21	0.1610	21.3989	0.0699	1 1 2
Beta J refined	2.8192E 29	0.1485	29.4501	0.0645	1 1 3
Beta K refined	1.9312E 36	0.1054	36.2858	0.0458	1 1 4
Beta L refined	3.8412E 40	0.1504	40.5845	0.0653	1 1 5

Amikacina – glutarato

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y glutarato 0.002 y 0.004M según los esquemas (ñ) y (o).



(ñ)



(o)

(ñ) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 2.3795

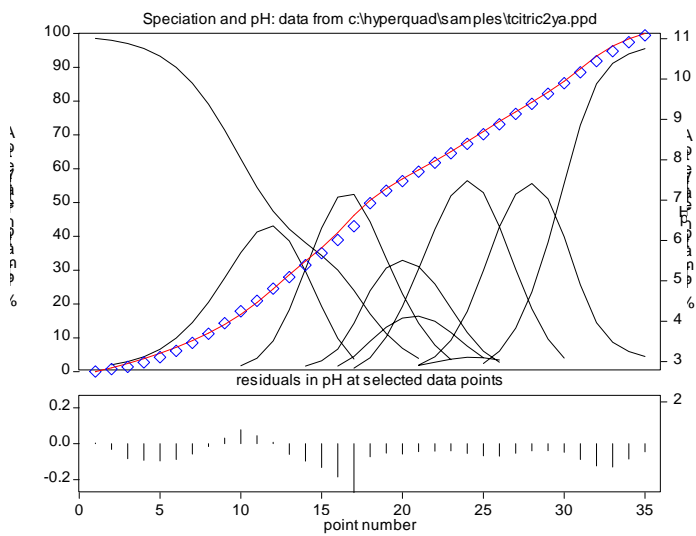
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1585E-13		-13.8000		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.5488E 5		5.1900		0 1 1
Beta G refined	2.7542E 9		9.4400		0 1 2
Beta H refined	4.6166E 35	0.4757	35.6643	EXCESSIVE	1 1 4
Beta I refined	2.9190E 40	1.2350	40.4652	EXCESSIVE	1 1 5

(o) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.1933

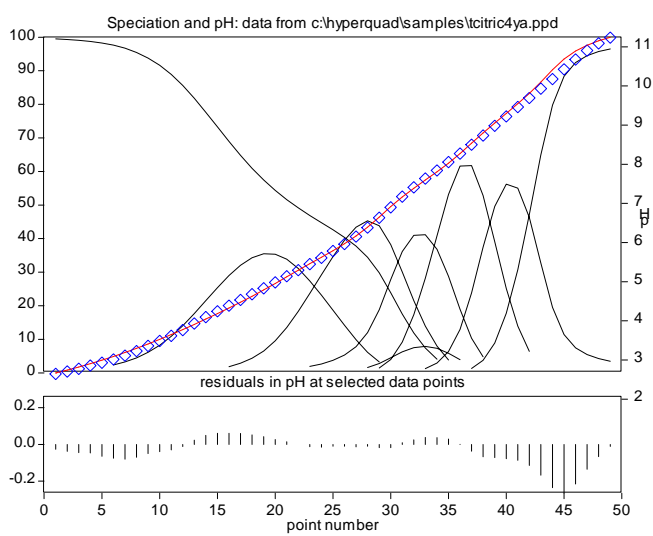
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1585E-13		-13.8000		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.5488E 5		5.1900		0 1 1
Beta G refined	2.7542E 9		9.4400		0 1 2
Beta H refined	5.8969E 35	0.1064	35.7706	0.0462	1 1 4
Beta I refined	5.6078E 40	0.1724	40.7488	0.0749	1 1 5

Amikacina – citrato

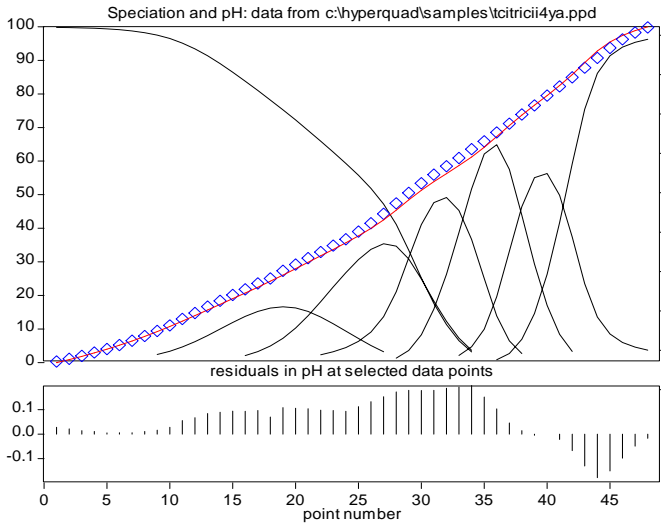
Ajuste de la titulación amikacina 0.0018M y citrato 0.0019 y 0.0038M según los esquemas (p), (q), (r), (s) y (t).



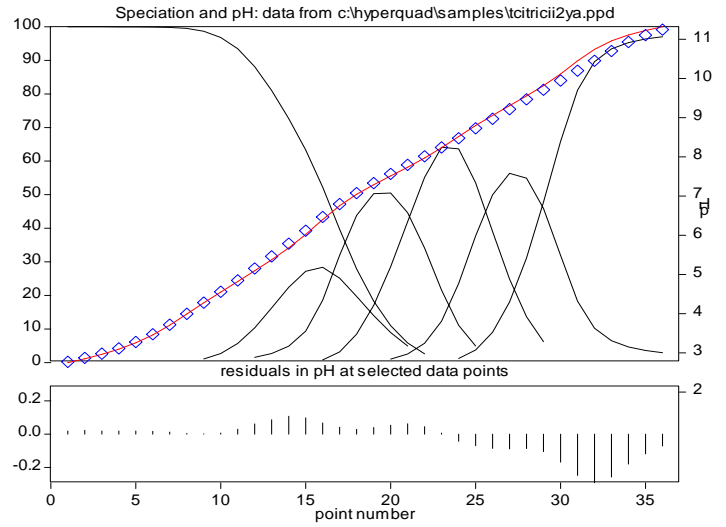
(p)



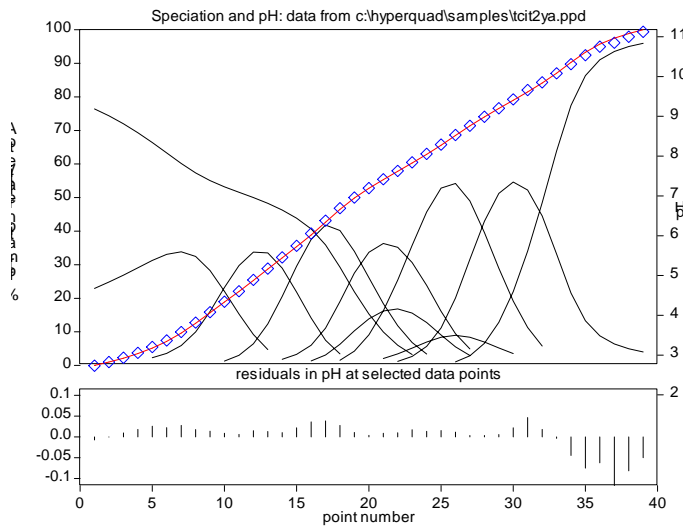
(q)



(r)



(s)



(t)

(p) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 3.2788

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1096E-13		-13.9600		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.1660E 5		5.7900		0 1 1
Beta G refined	1.7783E 10		10.2500		0 1 2
Beta H refined	2.5119E 13		13.4000		1 1 3
Beta I refined	2.5528E 20	2.7624	20.4070	EXCESSIVE	1 1 2
Beta K refined	1.2787E 29	0.7158	29.1068	EXCESSIVE	1 1 3
Beta L refined	6.2741E 36	0.2867	36.7976	0.1245	1 1 4
Beta M refined	1.8837E 42	0.3078	42.2750	0.1337	1 1 5

(q) 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 16.14

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 3.5997

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.1660E 5		5.7900		0 1 1
Beta G refined	1.7783E 10		10.2500		0 1 2
Beta H refined	2.5119E 13		13.4000		0 1 3
Beta I refined	1.9713E 28	1.4361	28.2947	EXCESSIVE	1 1 3
Beta J constant	1.3736E 36	0.2667	36.1378	0.1158	1 1 4
Beta K refined	4.5868E 41	0.3203	41.6615	0.1391	1 1 5

(r) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 4.2749

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.1660E 5		5.7900		0 1 1
Beta G refined	1.7783E 10		10.2500		0 1 2
Beta H refined	2.5119E 13		13.4000		0 1 3
Beta I refined	7.7605E 35	0.3856	35.8899	EXCESSIVE	1 1 4
Beta J refined	1.4543E 41	0.7675	41.1626	EXCESSIVE	1 1 5

(s) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 3.6095

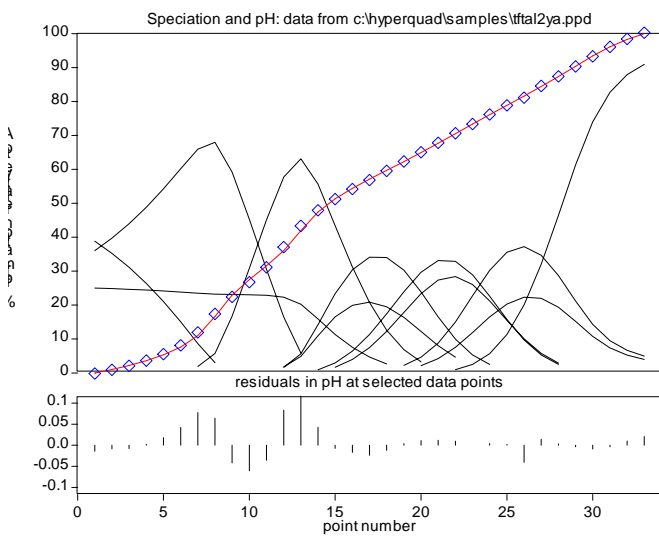
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.1660E 5		5.7900		0 1 1
Beta G refined	1.7783E 10		10.2500		0 1 2
Beta H refined	1.7378E 13		13.2400		0 1 3
Beta I refined	1.1416E 36	0.4757	36.0575	EXCESSIVE	1 1 4

(t) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Not enough data for meaningful chi-squared  
 sigma = 1.869

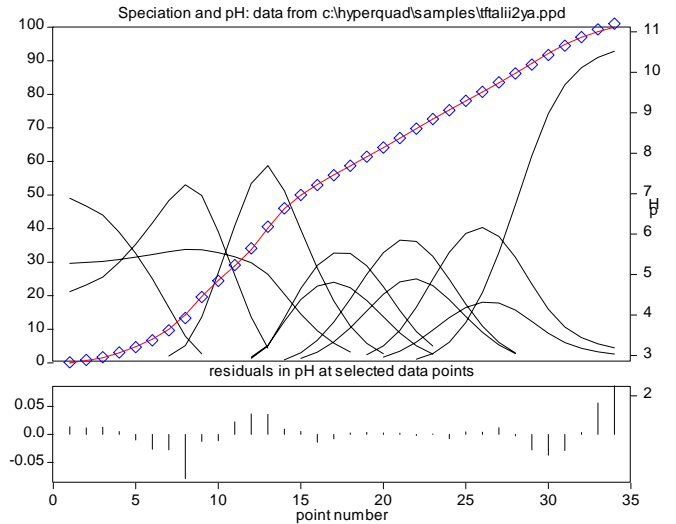
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1202E-13		-13.9200		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	6.1660E 5		5.7900		0 1 1
Beta G refined	1.7783E 10		10.2500		0 1 2
Beta H refined	2.5119E 13		13.4000		0 1 3
Beta I refined	6.1273E 20	0.6535	20.7873	EXCESSIVE	1 1 2
Beta J refined	1.2474E 29	0.3429	29.0960	EXCESSIVE	1 1 3
Beta K refined	3.6527E 36	0.1813	36.5626	0.0787	1 1 4
Beta L refined	1.4340E 42	0.2146	42.1566	0.0932	1 1 5
Beta M refined	2.9296E 46	0.2284	46.4668	0.0992	1 1 6

Amikacina – ftalato

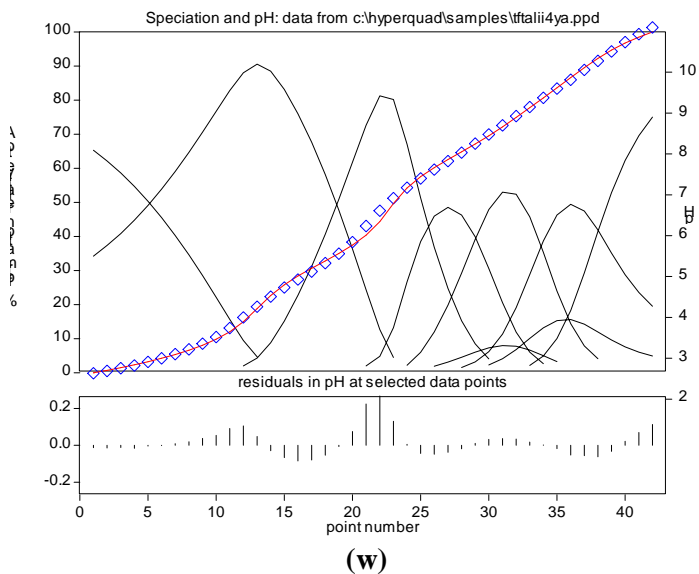
Ajuste de la titulación de amikacina 0.00185M y ftalato 0.002 y 0.004M según los esquemas (u), (v) y (w).



(u)



(v)



(u) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.9523

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.5382E 5		5.1870		0 1 1
Beta G refined	1.2912E 8		8.1110		0 1 2
Beta H refined	2.8857E 12	0.1553	12.4602	0.0674	1 1 1
Beta I refined	4.4237E 21	0.1247	21.6458	0.0542	1 1 2
Beta J refined	6.3154E 29	0.1151	29.8004	0.0500	1 1 3
Beta K refined	1.2056E 37	0.0936	37.0812	0.0407	1 1 4
Beta L refined	1.9139E 42	0.1234	42.2819	0.0536	1 1 5
Beta M refined	1.1499E 45	0.1457	45.0607	0.0633	1 1 6



(v) 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 1.3976

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.5382E 5		5.1870		0 1 1
Beta G refined	1.2912E 8		8.1110		0 1 2
Beta H refined	2.2637E 12	0.2688	12.3548	0.1168	1 1 1
Beta I refined	3.7331E 21	0.2019	21.5721	0.0877	1 1 2
Beta J refined	5.6940E 29	0.1771	29.7554	0.0769	1 1 3
Beta K refined	9.3608E 36	0.1510	36.9713	0.0656	1 1 4
Beta L refined	9.7895E 41	0.2179	41.9908	0.0947	1 1 5
Beta M refined	1.4867E 45	0.2050	45.1722	0.0890	1 1 6

(w) 1 iterations

Refinement successful

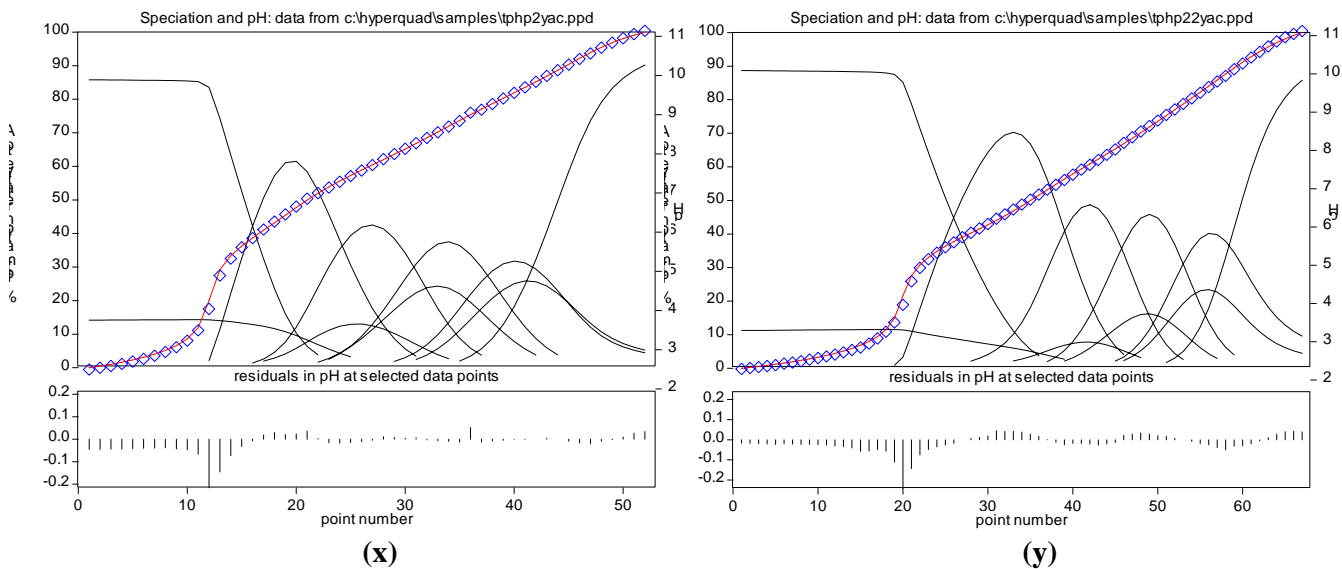
Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 2.5231

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1148E-13		-13.9400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	1.5382E 5		5.1870		0 1 1
Beta G refined	1.2912E 8		8.1110		0 1 2
Beta H refined	7.7618E 12	0.2182	12.8900	0.0948	1 1 1
Beta I refined	1.6655E 22	0.1844	22.2215	0.0801	1 1 2
Beta J refined	2.9657E 30	0.2099	30.4721	0.0912	1 1 3
Beta K refined	1.0990E 38	0.1898	38.0410	0.0824	1 1 4
Beta L refined	3.7875E 43	0.2315	43.5783	0.1005	1 1 5
Beta M refined	3.1937E 46	0.2504	46.5043	0.1088	1 1 6

Amikacina – fenilfosfato

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y fenilfosfato 0.002 y 0.004M según los esquemas (x) y (y).



(x) 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 32.00

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 1.7563

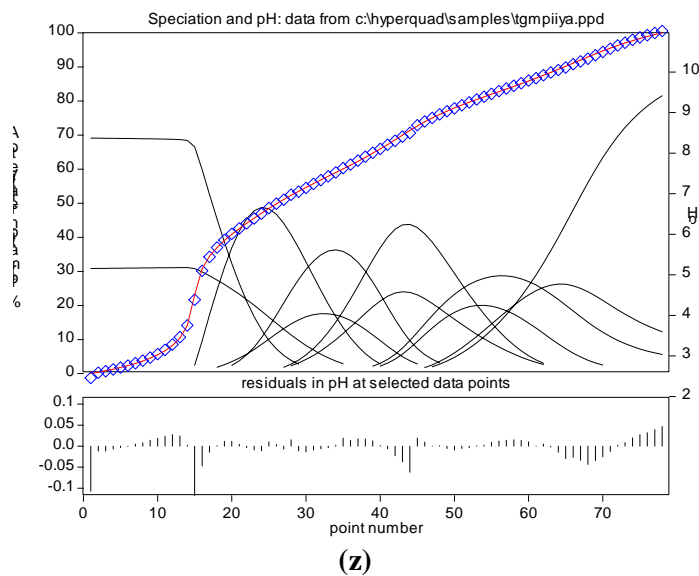
	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0-1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	8.9331E 5		5.9510		0 1 1
Beta G refined	4.3173E 12	0.1929	12.6352	0.0838	1 1 1
Beta H refined	1.0134E 22	0.1365	22.0058	0.0593	1 1 2
Beta I refined	1.7476E 30	0.1351	30.2424	0.0587	1 1 3
Beta J refined	3.8056E 37	0.1202	37.5804	0.0522	1 1 4
Beta K refined	2.7246E 43	0.1519	43.4353	0.0660	1 1 5

(y) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Chi-squared = 27.21  
 Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level  
 sigma = 1.9884

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	1.0000E-14		-14.0000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	8.9331E 5		5.9510		0 1 1
Beta G refined	3.9658E 12	0.1502	12.5983	0.0652	1 1 1
Beta H refined	6.5124E 21	0.1329	21.8137	0.0577	1 1 2
Beta I refined	9.0294E 29	0.1381	29.9557	0.0600	1 1 3
Beta J refined	1.6310E 37	0.1258	37.2125	0.0546	1 1 4
Beta K refined	6.7127E 42	0.1545	42.8269	0.0671	1 1 5

Amikacina – GMP

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0019M y GMP 0.0018 el esquema (z).

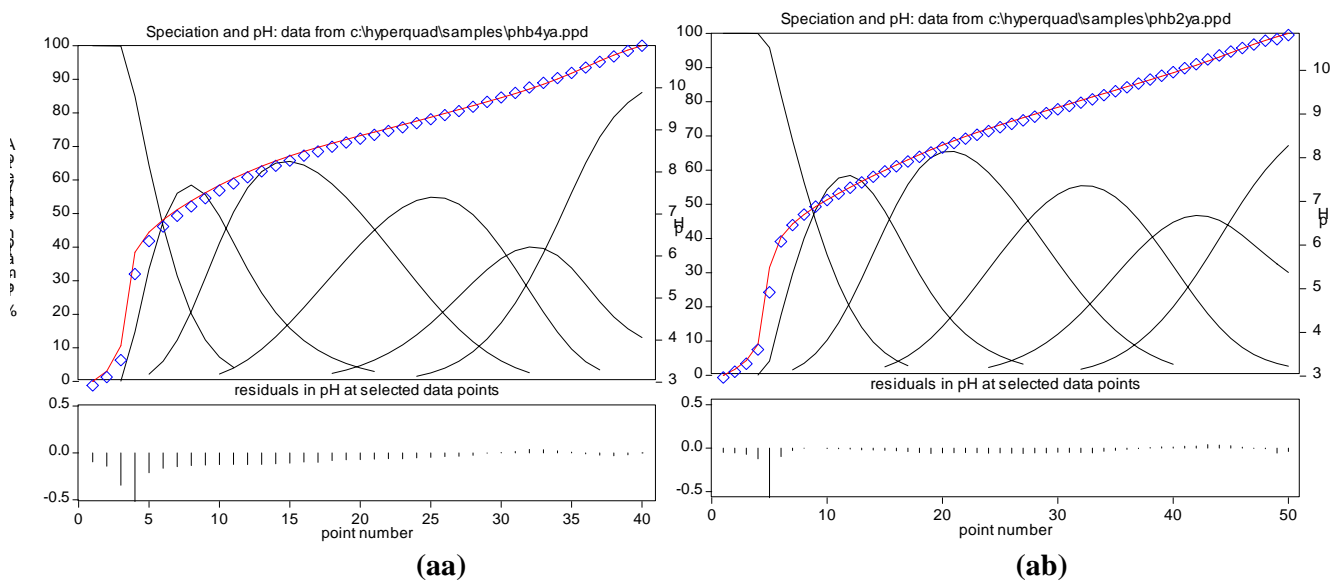


(z) 1 iterations  
 Refinement successful  
 Chi-squared = 16.15  
 Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level  
 sigma = 1.3735

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1585E-13		-13.8000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	4.5709E 9		9.6600		0 1 1
Beta G refined	9.1201E 15		15.9600		0 1 2
Beta H refined	1.0755E 13	0.0938	13.0316	0.0407	1 1 1
Beta I refined	4.1392E 22	0.0801	22.6169	0.0348	1 1 2
Beta J refined	8.7880E 31	0.0649	31.9439	0.0282	1 1 3
Beta K refined	7.0200E 39	0.0714	39.8463	0.0310	1 1 4
Beta L refined	1.0745E 47	0.0673	47.0312	0.0292	1 1 5
Beta M refined	9.3694E 52	0.0852	52.9717	0.0370	1 1 6

Amikacina – ácido fenilborónico

Ajuste de la titulación de amikacina 0.0018M y 0.0024M y 0.005M según los esquemas (ab) y (ac).



**(aa)** 1 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 41.84

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.1528

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1445E-13		-13.8400		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	7.0795E 8		8.8500		0 1 1
Beta H refined	1.0755E 13	0.0938	13.0316	0.0407	1 1 -1

**(ab)** 1 iterations

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 4.5994

	Value	relative std devn	beta log	standard deviation	
Beta A constant	0.1585E-13		-13.8000		0 0 -1
Beta B refined	6.3096E 9		9.8000		1 0 1
Beta C refined	5.6234E 18		18.7500		1 0 2
Beta D constant	3.2359E 26		26.5100		1 0 3
Beta E constant	2.2909E 33		33.3600		1 0 4
Beta F constant	7.0795E 8		8.8500		0 1 1
Beta G refined	0.2145E -7	0.1555	-7.6686	0.0675	0 1 -1