



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE ESPECIACIÓN QUÍMICA DEL COMPUESTO LQM 314
CON EL CATION Cu(II) EN SU SAL DE ACETATO**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. DIANA LUCÍA MARTÍNEZ MENDOZA

**TUTOR: MARIA DEL ROSARIO MOYA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM**

MÉXICO D.F. JUNIO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la UNAM por permitirme continuar con mi formación profesional, por la oportunidad de seguir estudiando, de seguir haciendo investigación científica, pero sobre todo, de seguir aprendiendo.

A la Dra. Rosario Moya por dirigir esta tesis, por su confianza y motivación, por sus consejos y asesorías.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado a través del número de becario 288296.

A los sinodales: Dr. Alberto Rojas, Dr. Víctor Manuel Ugalde, Dra. Laura Gasque, Dra. Lena Ruiz y Dr. Cecilio Álvarez por sus observaciones y comentarios a este trabajo y por el tiempo invertido en su revisión.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Al Laboratorio de Físicoquímica Analítica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, donde se llevó a cabo este proyecto. A Gabriel Nava por sus asesorías en mis primeros semestres, a la Dra. Guadalupe Pérez por su gran apoyo y las buenas charlas, a Omar Bernabé por sus preguntas, al Dr. Rodolfo Gómez, a Luis Reyes y a todos los compañeros del laboratorio 10 por la buena compañía durante mi estancia en la UIM.

A mis amigos por su apoyo y confianza ... y por ese 'échale ganas' que a veces hizo falta.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Agentes quimioterapéuticos con metales	3
2.2. Compuestos LQM	6
2.3. Especiación	9
2.4. Técnicas utilizadas para la determinación de constantes de equilibrio	9
2.4.1. Calorimetría	11
2.5. Número de especies en disolución	15
2.6. Naturaleza de las especies en disolución	17
2.6.1. Variaciones continuas	17
2.6.2. Relaciones molares	19
2.7. Programas computacionales	21
3. Hipótesis y objetivos	23
3.1. Hipótesis	
3.2. Objetivos Generales	
3.3. Objetivos Particulares	
4. Materiales y metodología	24
4.1. Procedimiento para la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en metanol	24
4.2. Procedimiento para la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en agua	26
4.3. Procedimiento para la exploración del sistema Cu(II)-LQM314 mediante microcalorimetría ITC	29
5. Resultados y análisis de resultados de la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en metanol	32
6. Resultados y análisis de resultados de la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en agua	43
7. Resultados y análisis de resultados de la exploración del sistema Cu(II)-LQM314 mediante microcalorimetría ITC	62

8. Conclusiones y perspectivas	68
9. Referencias	71
10. Anexo	73

1. Introducción

En la actualidad existen muchas enfermedades que aquejan al ser humano, es por esto que las investigaciones y la búsqueda de nuevos fármacos no se detienen. Uno de los principales males existentes en México y el mundo con alto índice de mortalidad es el cáncer (OMS, 2013) (Sosa-Durán, *et. al.*, 2013). Así como se van descubriendo nuevos tipos de cáncer, se van estudiando nuevas y mejores formas de tratarlos, ya que los fármacos que comúnmente se emplean presentan una serie de efectos adversos; todo esto ha motivado a la apertura de campos de investigación para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos con actividad antineoplásica y menos reacciones adversas.

De los 46 principales fármacos utilizados en quimioterapia contra el cáncer en el ser humano, 3 contienen metales: cis-diclorodiaminPt(II), de ellos a la bleomicina se le agrega Fe(II), y adriamicina puede ser activado por el hierro (Berthon, 1995). Se han estudiado también otros compuestos metálicos que puedan ser eficientes como agentes anticancerosos, pues los iones metálicos tienen roles cruciales en ciertos procesos fisiológicos, lo que da a los investigadores un amplio intervalo para diseñar fármacos quimioterapéuticos innovadores (Guo, *et. al.*, 1999). Algunos de estos fármacos en investigación son: sales de Galio (III), compuestos mediados por hierro (desferrioxamina), metalocenos (titanio y vanadio), complejos de cobre con bases de Schiff, tiosemicarbazonas, derivados de benzimidazol, imidazol, pirazol y triazol; y complejos de cobre con fenantrolina (Casiopéínas®) (Desoize, 2004) (Ma, 2012) (Pelosi, 2010) (Bernabé-Pérez, 2013) (Breña, *et. al.*, 2010) (Bravo-Gómez, *et. al.*, 2009) (Gracia-Ramos, *et. al.*, 2014) (Ruiz-Azuara, *et. al.*, 2010). En el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la FES Cuautitlán de la UNAM, se han sintetizado compuestos derivados morfólinicos y tiomorfolínicos del fenol, uno de estos compuestos es el llamado **LQM 314**, el cual ha presentado propiedades antiarrítmicas y antihipertensivas. Utilizando el compuesto **LQM 314** como ligante para cobre (II) se obtiene el compuesto **LQM 406**, un complejo polinuclear de estequiometría 4:2 Cu(II):LQM314 en su forma sólida, caracterizado mediante espectroscopia IR y Rayos X (Escutia-Calzada, 2011). A estos derivados del fenol se les atribuyó una posible actividad antineoplásica y ya que no se cuenta con una referencia enfocada a su papel biológico se realizaron pruebas de citotoxicidad *in vitro* para determinar si son efectivos en el tratamiento del cáncer. En el estudio biológico se concluyó que el compuesto **LQM 406** tiene un efecto citotóxico significativo en las células de cáncer de mama, de próstata y cérvico-uterino (Vilchis-Martínez, 2011). Debido a la presencia de ésta actividad farmacológica es que continúan los estudios de este tipo de compuestos, y del **LQM 406** en particular. El comportamiento en disolución de este compuesto y la determinación de sus propiedades fisicoquímicas es el siguiente paso, y el motivo del presente trabajo.

Al tratarse de compuestos nuevos es necesario conocerlos bien para poder utilizarlos en alguna forma farmacéutica y para empezar a describir su modo de acción. Este proyecto consistió en realizar el estudio de la especiación química del compuesto *LQM 314* con el ion metálico Cu(II), utilizando como fuente del metal el acetato de cobre (II). Se determinaron las especies formadas y sus constantes de equilibrio mediante espectrofotometría UV-Vis en medio acuoso (bajo condiciones pseudofisiológicas: T=37 °C, I=0.15 M) y en medio metanólico, utilizando para ambos casos los métodos de relaciones molares y variaciones continuas, y los programas computacionales TRIANG y SYBILA para determinar el número de especies en el sistema, y SQUAD para refinar los valores de $\log \beta$.

Adicionalmente se estudió el sistema Cu(II)-*LQM 314* en medio metanólico mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), y se obtuvo la estequiometría y el valor de ΔH de uno de los complejos encontrados también por UV-Vis. Estos experimentos y sus resultados permiten establecer las bases para el inicio de estudios de especiación química mediante calorimetría ITC en nuestro grupo de trabajo, ya que son de los primeros estudios que se realizan con esta técnica.

2. Antecedentes

Los metales y los compuestos que contienen iones metálicos han sido estudiados ampliamente debido a su importancia enzimática, estructural o a sus roles en procesos biológicos. A lo largo de los años sus propiedades han despertado interés en el desarrollo de nuevas maneras de usar agentes metálicos como moduladores de sistemas biológicos, propiciando con esta investigación su uso potencial en medicina (Bravo-Gómez, *et. al.*, 2009).

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En México, el primer lugar de mortalidad en el hombre lo ocupa el cáncer de próstata. En las mujeres la primera es el cáncer de mama, seguido por cáncer de cérvix uterino (Sosa-Durán, *et. al.*, 2013).

La quimioterapia es el uso de fármacos para el tratamiento del cáncer (ACS, 2014). Tiene como finalidad causar una lesión citotóxica letal que detenga el progreso del tumor en tratamiento. El ataque suele dirigirse contra los sitios metabólicos esenciales para la multiplicación celular, por ejemplo, los precursores de purina y pirimidina disponibles para la síntesis de ADN o ARN.

En las últimas décadas los complejos metálicos han ganado un gran interés como fármacos para ser utilizados como agentes de diagnóstico o como quimioterapéuticos. Como se mencionó anteriormente, de los 46 principales fármacos utilizados en quimioterapia contra el cáncer en el ser humano, 3 contienen metales. Los compuestos que contienen cobre tienen una elevada eficiencia como agentes citotóxicos (Berthon, 1995).

Se han estudiado compuestos metálicos que puedan ser eficientes como agentes anticancerosos, pues los iones metálicos tienen roles cruciales en ciertos procesos fisiológicos, lo que da a los investigadores un amplio intervalo para diseñar fármacos quimioterapéuticos innovadores (Guo, *et. al.*, 1999).

Uno de los primeros esfuerzos para diseñar fármacos anticancerígenos que tuvieran iones metálicos, fue hecho por French y colaboradores en 1958. Sintetizaron compuestos de bis- y monotiosemicarbazona que complejarían los iones metálicos esenciales en el organismo y así interrumpirían la proliferación de células. Varios de estos compuestos mostraron actividad antineoplásica significativa. Uno de estos compuestos fue investigado por H.G. Petering y colaboradores; a partir de dicha investigación descubrieron que al administrar el ligante libre, en forma oral, a roedores con tumores sólidos el compuesto mostraba una importante actividad antineoplásica. Esta acción se perdía cuando se administraba a roedores deficientes de cobre, y era incrementada cuando el complejo de cobre se sustituía por el ligante libre. (Berthon, 1995)

2.1. Agentes quimioterapéuticos con metales

A continuación se describe una serie de fármacos anticancerosos que involucran iones metálicos.

Complejos de Platino. Son de los más utilizados para el tratamiento del cáncer. Cuatro compuestos de platino (II) inyectables han sido aprobados para uso clínico: cisplatino (disponible desde 1978), carboplatino, oxaliplatino y nedaplatino. Otros complejos de platino aún se encuentran bajo investigación clínica. El cisplatino fue el primer compuesto utilizado para el tratamiento del cáncer, y hoy en día es uno de los anticancerígenos más utilizados, junto a la segunda generación de carboplatino (Guo, *et. al.*, 1999) (Desoize, 2004).

Para el cisplatino la evidencia de actividad antineoplásica fue reportada primeramente para cáncer testicular y de ovario.

El carboplatino se seleccionó de una serie de derivados de platino debido a su baja toxicidad hematológica. Desafortunadamente se desarrolló resistencia cruzada junto con el cisplatino. Su actividad quimioterapéutica se ha demostrado en cáncer de ovario, de pulmón y otros tipos. El carboplatino ha sustituido al cisplatino en algunas indicaciones.

El oxaliplatino ha mostrado tener una mayor eficiencia y menor toxicidad que el cisplatino, y no presenta resistencia cruzada con éste. Ha tenido buenos resultados contra cáncer de ovario, de mama, de cabeza y cuello, melanoma maligno y contra otros cánceres resistentes a otros derivados del platino.

Los compuestos de platino son considerados pro-fármacos, ya que son activos después de su hidratación. El compuesto diacu-platino reacciona con los grupos amino de las proteínas del ARN y del ADN. Se forman aductos platino-ADN que se asocian con la actividad antitumoral (Desoize, 2004).

Sales de Galio (III). El componente aniónico de estas sales no tiene influencia sobre la toxicidad de éstos. A bajas concentraciones de galio, éste se une a los fosfatos del ADN formando un complejo estable. Hedley, *et. al.* afirman que el galio inhibe la síntesis replicativa del ADN. El nitrato de galio intravenoso es utilizado para disminuir la hipercalcemia asociada con cáncer. Estudios preclínicos han demostrado sinergismo del galio con paclitaxel, gemcitabina, vinorelbin, hidroxiurea e interferón-alfa.

Hierro. En roedores, una dieta restringida en hierro ha mostrado una disminución en el crecimiento de tumores. El efecto anticanceroso de bleomicina es mediada por quelación con hierro o cobre, con los que forma un complejo que degrada el ADN. El fármaco desferrioxamina (DFO) ha sido muy estudiado, tiene una gran afinidad por el hierro, de manera que se une a él inactivándolo metabólicamente; ésta terapia de quelación ha sido efectiva para neuroblastoma y leucemia.

Metalocenos. Son una nueva clase de compuestos organometálicos; se caracterizan por una estructura tetraédrica distorsionada, en la que se coordinan dos ligantes ciclopentadienil y dos ligantes halogenuro a un ion metálico. El dicloruro de titanoceno ha sido el único de estos compuestos en ser estudiado en pruebas clínicas; además de ser un agente anticanceroso, también es antiviral, antiinflamatorio y con actividad insecticida en ratón. La actividad de este titanoceno se ha estudiado contra sarcoma, leucemias, carcinoma. La formación del complejo metaloceno-ADN está implicada en el carácter antineoplásico, los titanocenos y vanadocenos inhiben la síntesis de ADN y ARN (Desoize, 2004).

El interés del grupo de trabajo de la FES-C se ha centrado recientemente en el diseño de nuevos complejos de cobre como potenciales agentes antitumorales. El cobre es un conocido elemento bioesencial en el ser humano, y sus compuestos de coordinación han probado ser excelentes candidatos para aplicaciones biológicas, así como para el tratamiento del cáncer. El mecanismo citotóxico para los complejos de cobre puede ser causado por su capacidad para unirse y romper el ADN, lo que interrumpe el ciclo celular y produce apoptosis o genera especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que llevan a la muerte celular (Ma, 2012).

A continuación se describe brevemente el papel del cobre en el organismo, y algunos agentes quimioterapéuticos que lo involucran.

Cobre in vivo

Hart et. al. fueron los primeros en demostrar que el cobre es un ion metálico esencial (1928), expusieron que es requerido en la síntesis de hemoglobina. Desde entonces se ha descubierto que el cobre es esencial para muchas funciones celulares. El cobre se encuentra distribuido de manera heterogénea en el cuerpo. Los intervalos típicos de concentración en algunos tejidos se muestran en la Tabla 3-1:

Tabla 2-1. Concentraciones (ppm) de cu (II) en tejidos y fluidos

Tejido o Fluido	Concentración (ppm)
Bilis	500
Sangre	
(total)	1.0
(plasma)	1.2
(suero)	1.9
Cerebro	370
Vesícula biliar	750
Intestino	180-300
Jugo gástrico	0.1-0.4
Riñón	270
Hígado	680
Músculo	85
Orina	40

El cuerpo humano contiene alrededor de 70 - 80 mg de cobre. En su forma libre puede ser tóxico, por lo que existe en formas complejadas, unido a macromoléculas y a ligantes de bajo peso molecular en los fluidos biológicos.

El cobre se encuentra presente en el sitio activo de proteínas y enzimas involucradas en reacciones redox. En las células de los mamíferos se encuentran solamente unas cuantas proteínas que contienen cobre, algunas comunes son: citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, lisil oxidasa, y dopamina-β hidroxilasa (Berthon, 1995).

Las enzimas de cobre se encuentran involucradas en el ciclo del nitrógeno; todas las reacciones en las que están presentes óxidos de nitrógeno son catalizadas por alguna de estas enzimas.

El transporte del cobre recién absorbido, de las mucosas al plasma sanguíneo, es regulado por las metalotioneínas (MT). En el fluido extracelular el metal se encuentra unido predominantemente a albúmina, aminoácidos (principalmente como complejos ternarios de histidina y otros aminoácidos) y ceruloplasmina, la principal enzima transportadora de cobre en sangre (Berthon, 1995).

Cuando se adiciona algún complejo de cobre a las células o fluidos, existen sitios de competencia por el metal que son fuertes e identificables. Por ejemplo, la albúmina y la histidina tienen constantes de estabilidad aparentes elevadas para Cu (II). Debido a la compartimentalización de las formas biológicas de cobre, es posible que las especies fármaco-cobre se formen en un lugar y reaccionen en otro, debido a la disociación.

Complejos de cobre con Bases de Schiff. Las bases de Schiff son complejos orgánicos importantes en la química medicinal gracias a su gran potencial antibacteriano y quimioterapéutico. Sus efectos citotóxicos pueden mejorarse mediante la formación de complejos con cobre (II), éstos compuestos han sido probados en diferentes líneas celulares y su efecto antineoplásico ha sido efectivo contra células de cáncer de mama y de próstata (Ma, 2012) (Adsule, *et. al.*, 2006).

Tiosemicarbazonas. Son compuestos que se han estudiado por mucho tiempo debido a sus propiedades biológicas. Se han utilizado como fármacos contra la tuberculosis y lepra, como antivirales, antifúngicos, antibacterianos, y recientemente como agentes anticancerígenos (Pelosi, 2010). En los últimos años se han sintetizado e investigado complejos tiosemicarbazona-cobre y bis(tiosemicarbazona)-cobre, y han mostrado actividad anticancerígena ante diferentes líneas celulares de cáncer.

Derivados de benzimidazol, imidazol, pirazol y triazol. Recientemente una serie de ligantes basados en estructuras de pirazol-piridina y pirazol-bipiridina han sido sintetizados y coordinados con una gran variedad de metales, entre ellos el cobre; uno de estos complejos mostró una alta afinidad hacia el ADN, y actividad citotóxica contra células de cáncer gástrico, leucemia y cáncer de mama (Bernabé-Pérez, 2013).

Complejos de cobre con fenantrolina. El ligante 1,10-fenantrolina y las sales de cobre forman complejos estables que presentan actividad antitumoral, antifúngica y antimicrobial (Bernabé-Pérez, 2013). En México, dentro de este grupo de compuestos, se investigan actualmente la familia de las llamadas Casiopeínas®, compuestos desarrollados en la Facultad de Química de la UNAM (Breña, *et. al.*, 2010). Se ha demostrado que las Casiopeínas® tienen actividad antineoplásica contra células cancerígenas, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. El modo de acción no ha sido completamente elucidado, pero los investigadores sugieren interacciones de intercalación con el ADN como un posible paso, seguido de una reacción redox que produce especies radicales (generación de ROS), principalmente •OH, que promueven la degradación del ADN con la consecuente muerte celular por apoptosis (García-Ramos, *et. al.*, 2011) (Bravo-Gómez, *et. al.*, 2009) (García-Ramos, *et. al.*, 2014) (Ruiz-Azuara, *et. al.*, 2010).

2.2. Compuestos LQM

El Laboratorio de Química Medicinal, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM, se ha dedicado a sintetizar e investigar compuestos con actividad farmacológica. El diseño de estos compuestos, llamados LQM's, en principio se basó en la estructura de la Changrolina y en los estudios de Li LQ, quien, en 1979, descubrió que la changrolina es efectiva como agente anti-arrítmico (LQ, *et. al.*, 1979).

Stout y su equipo de trabajo introdujeron una nueva serie de compuestos antiarrítmicos realizando algunas variaciones en la estructura de la changrolina. Encontraron que su estructura puede ser dividida en tres fragmentos (Fig. 2-1):

- Fragmento I. Segmento heteroatómico que contiene la quinazolina.
- Fragmento II. Segmento aromático con el bis(pirrolidinilmetil) fenol.
- Fragmento III. Segmento enlazante entre las dos primeras regiones.

Posteriormente encontraron que el fragmento II era importante para mostrar una buena actividad antiarrítmica; además que en el segmento I la quinazolina podía ser reemplazada por una variedad

de anillos heteroatómicos sin que disminuya su actividad; y que el fragmento que une a los dos primeros tiene una mayor actividad y una menor toxicidad cuando contiene un grupo carbonilo.

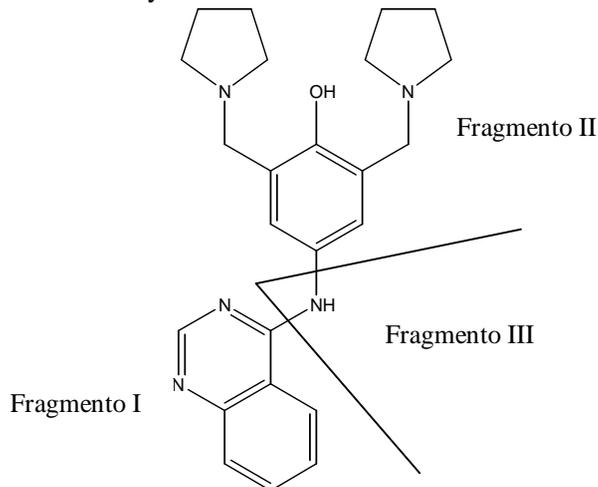


Fig. 2-1. Changrolina (Montes-Madrigal, 2005)

Con base en base a estos estudios, el equipo de trabajo del Laboratorio de Química Medicinal de la FES-C, diseñó y sintetizó derivados morfolínicos y tiomorfolínicos con actividad antiarrítmica y antihipertensiva, realizando algunas modificaciones a la estructura del fragmento II de la changrolina: se cambió el anillo de la pirrolidina por un anillo morfolínico o tiomorfolínico, y en la posición 4 del anillo aromático se incluyeron diferentes sustituyentes (Velázquez, *et. al.*, 2006) (Montes-Madrigal, 2005). El compuesto de estudio del presente trabajo: el **LQM314**, es un derivado morfolínico, con un sustituyente ciano en la posición 4 del anillo aromático, su estructura se muestra en la Fig. 2-2.

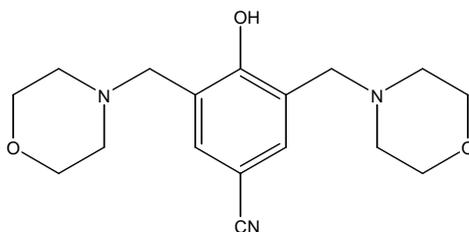


Fig. 2-2. Estructura química del compuesto LQM314 (Aguilar-Hernández 2012)(Velázquez, *et. al.*, 2006)

Con los antecedentes del uso de complejos metálicos como agentes anticancerosos, el equipo de trabajo del Laboratorio de Química Medicinal decidió utilizar los compuestos morfolínicos como ligantes, y se han hecho reaccionar con cobre (II) para formar los complejos correspondientes; con estos trabajos se pretende encontrar alternativas al tratamiento ya existente contra el cáncer, que se mencionó anteriormente, de manera que puedan encontrarse fármacos efectivos contra este padecimiento con mínimos efectos negativos. Utilizando el compuesto **LQM314** como ligante con cobre (II) se obtiene el compuesto **LQM406**, la síntesis se realizó por Escutia-Calzada, 2011. La estructura del complejo se muestra en la Fig. 2-3.

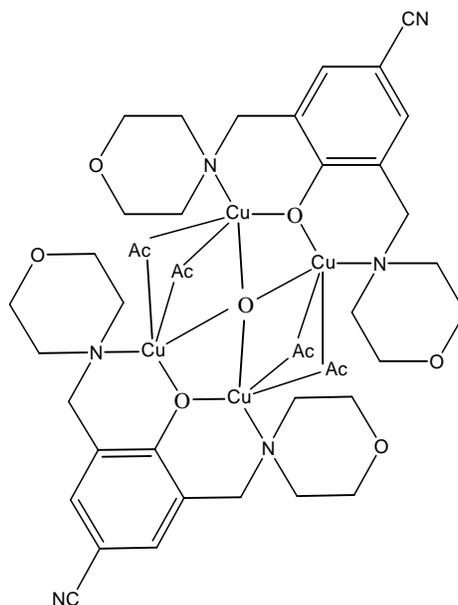


Fig. 2-3. Estructura química del compuesto LQM406 (Escutia-Calzada, 2011)

El compuesto **LQM406** es un complejo de cobre (II) polinuclear, de estequiometría 4:2, Cu(II):LQM314, en su forma sólida. Una vez sintetizado se caracterizó su forma sólida mediante espectroscopía IR y Rayos X (Escutia-Calzada, 2011). Su comportamiento en disolución y la determinación de sus propiedades fisicoquímicas es el siguiente paso, y el motivo del presente trabajo.

Dentro de sus propiedades farmacológicas, a estos derivados del fenol se les atribuyó una posible actividad antineoplásica. Al ser compuestos nuevos no se cuenta con una referencia enfocada a su papel biológico, por lo tanto se realizaron pruebas de citotoxicidad *in vitro* para determinar si son efectivos en el tratamiento del cáncer, sin toxicidad para los pacientes. El estudio biológico fue llevado a cabo por Vilchis-Martínez, 2011. Se evaluó la citotoxicidad del compuesto **LQM406** en tres líneas neoplásicas: MDA-MB-231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cérvico-uterino) y PC-3 (cáncer de próstata); así como en células no cancerosas (linfocitos) para evaluar la toxicidad a células sanas.

De acuerdo al estudio biológico, se concluyó que el compuesto **LQM406** tiene un efecto citotóxico significativo en las células de cáncer de mama, de próstata y cérvico-uterino, y presenta menor daño a las células sanas (linfocitos) que el LQM estudiado a la par (**LQM403**), éste último resultado comparable a los del taxol, fármaco anticanceroso inhibidor de los microtúbulos indicado para el tratamiento de cáncer de mama, de ovario y de pulmón (Vilchis-Martínez, 2011).

Dentro de este tipo de compuestos se ha estudiado también el compuesto **LQM402**; de cuyo estudio biológico *in vitro* se concluyó que tiene una actividad antineoplásica significativa contra cáncer cérvico-uterino, de manera selectiva para células HeLa y CaSki. Además, se demostró que este compuesto induce el rompimiento del ADN de dos líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, de una forma dependiente del tiempo. En años recientes, reportes de citotoxicidad de complejos de cobre han mostrado que el mecanismo de acción se basa en la intercalación en el ADN y su posterior rompimiento o inducción de la apoptosis (Frías-González, *et. al.*, 2013).

El estudio realizado con el compuesto **LQM402** indicó que la actividad citotóxica determinada para el compuesto coincide con los resultados obtenidos para otros compuestos de cobre, como las

Casiopeínas®. Además se demostró que la citotoxicidad es menor en células control no cancerígenas (Frías-González, *et. al.*, 2013).

Para el compuesto **LQM406** aún se tiene como perspectiva continuar con los estudios *in vitro* para corroborar el efecto citotóxico en más líneas celulares cancerosas, así como estudios *in vivo*. Debido a la presencia de ésta actividad farmacológica es que continúan los estudios de este tipo de compuestos, y del **LQM406** en particular.

2.3. Especiación

El término especiación es utilizado de diferentes maneras, en química, biología y geoquímica. En el contexto de la química analítica podemos llamarla **especiación química**, y utilizaremos éste término para referirnos al *proceso de identificación y cuantificación de las formas o especies químicas y su distribución en una muestra dada*. Éste proceso puede en algunas ocasiones proveer más información sobre la forma del elemento presente, por ejemplo su composición isotópica, conformación, estado de oxidación, o sobre la naturaleza de los sustituyentes unidos a él; y no sólo informar sobre la presencia del elemento en su totalidad.

Una vez definido el término **especiación química**, veamos las definiciones a las que da lugar éste término:

- i. *Especie química*: elemento químico, forma específica de un elemento definido, dada por su composición isotópica, estado electrónico o de oxidación, y/o su estructura molecular. Puede tratarse de una molécula neutra, un ion simple o compuesto o un material sólido.
- ii. *Análisis de especiación*: actividades analíticas de identificación y/o medición de las cantidades de una o más especies químicas individuales en una muestra.
- iii. *Especiación de un elemento*: distribución de un elemento entre especies químicas definidas en un sistema.

A partir de la *especiación química* se obtiene información para comprender el comportamiento del sistema; para una explicación lógica de éste comportamiento, las especies encontradas deben ser suficientemente diferentes y medibles, en el nivel adecuado de acuerdo al sistema de estudio (Templeton, *et. al.*, 2000).

Para lograr la *especiación química* necesitamos determinar las propiedades fisicoquímicas de las especies en el sistema; esto involucra la determinación de constantes de equilibrio. A continuación se describen los métodos y técnicas para tal efecto.

2.4. Técnicas utilizadas para la determinación de constantes de equilibrio

De acuerdo a Legget y Wu, hay cuatro técnicas capaces de generar datos con una precisión adecuada para permitir una estimación confiable de las constantes de formación de un sistema de interés. Estas técnicas son: potenciometría, espectrofotometría, calorimetría y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La mayoría de los programas utilizados para estimar constantes de formación emplean alguna variante del algoritmo de cuadrados no lineales. Usando estimados iniciales de las constantes de formación, se construye un conjunto de ecuaciones simultáneas a ser resueltas para obtener las

correcciones que serán aplicadas en las constantes de formación. Los nuevos valores son mejores aproximaciones a los valores finales y se utilizan para el siguiente ciclo de refinamiento. El proceso iterativo arroja finalmente los valores de las constantes de formación que dan el mejor ajuste entre los datos experimentales y los calculados. Se utiliza el criterio de mínimos cuadrados (U) para dirigir el proceso iterativo.

En el programa se incluye como variable dependiente siempre la constante de formación β_{abc} , y pueden incluirse parámetros adicionales relacionados al modelo de equilibrio (coeficientes de absorptividad molar o calores de formación de los complejos) o las condiciones experimentales (concentraciones). Como variable independiente se incluyen los datos experimentales. El programa calculará y arrojará el conjunto de variables que mejor predigan las observaciones, de la manera más confiable, con el menor valor de U. La tabla 2-2 muestra los parámetros observables utilizados para la minimización de la suma de cuadrados (Berthon, 1995).

Tabla 2-2. Parámetros observables utilizados para la minimización de la suma de cuadrados.
(Berthon, 1995)

Técnica	Observables minimizados
Potenciometría	pH, E, C_H , C_M , C_L , $C_{componentes}$
Calorimetría	q_r , todas las $C_{componentes}$
Espectrofotometría	A, pH para sistemas acuosos
Resonancia Magnética Nuclear	δ_i

A continuación la tabla 2-3 resume algunas técnicas utilizadas para generar datos para el refinamiento de constantes de estabilidad, sus ventajas y limitaciones.

En base a estas ventajas y limitaciones para cada técnica, y a los equipos disponibles, se decidió realizar la determinación de las constantes de estabilidad mediante espectrofotometría UV-Vis complementada con potenciometría, y calorimetría.

Tabla 2-3. Algunas técnicas utilizadas para la determinación de constantes de estabilidad.

Técnica	Características	Ventajas	Limitaciones
<i>Potenciometría</i>	Se basa en la medición de $[H^+]$ mediante un electrodo de pH, o de $p[M]$ y/o $p[L]$ mediante electrodos ion-selectivos.	Es la técnica más utilizada. Elevada precisión y exactitud	Para algunos sistemas más complicados se ha cuestionado su exactitud. Requiere de un electrodo reversible. Se requieren disoluciones a concentraciones altas para poder distinguir claramente cambios en el sistema.
<i>Espectrofotometría UV-Visible</i>	Utiliza la Ley de Lambert-Beer-Bouguer para relacionar las absorbancias con las concentraciones de los complejos, y con ello con las constantes de formación. Es una técnica complementaria a la Potenciometría más que alternativa a ésta, la espectrofotometría se utiliza para definir el modelo químico y ambas para calcular las constantes de formación.	Provee información valiosa partir de los coeficientes de absortividad, con ellos se pueden definir especies presentes en sistemas complejos.	No es posible evaluar con precisión las constantes de formación de complejos cuyas bandas de absorción se traslapan. No se pueden determinar constantes de formación de complejos débiles (por debajo de 0.2 L mol^{-1}), los cambios en los espectros pueden deberse a fuerzas de dispersión en vez de a la formación de un enlace covalente.
<i>Calorimetría</i>	Hay dos formas de realizar estos estudios: calorimetría directa o titulación termométrica; en la primera, el metal y el ligante son mezclados una sola vez y se mide el cambio de calor resultante; en la titulación, el ligante es adicionado en alícuotas y se puede evaluar la entalpía de formación del complejo y la constante de estabilidad.	Puede utilizarse para estudiar cualquier reacción, ya que cada reacción química involucra absorción o liberación de calor.	β puede calcularse simultáneamente con ΔH sólo si $\log \beta < 8$, de no ser así las diferencias en el calor de reacción son indistinguibles. Las pequeñas diferencias entre las curvas de titulación dificultan la distinción de los sistemas de reacción, se recomienda hacer repeticiones a diferentes concentraciones o complementar con otra técnica.
<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	Se utilizan principalmente dos parámetros para evaluar las constantes de estabilidad: desplazamiento químico, constantes de acoplamiento.	Técnica efectiva en medios no acuosos. Además de las constantes de estabilidad, provee constantes de unión para sitios específicos de la molécula.	La frecuencia de la radiación son relativamente bajas, por lo que son necesarias concentraciones mayores a las utilizadas para otras técnicas. Es difícil, aunque posible, estudiar la formación de dos o más complejos. Es una técnica costosa.

(Berthon, 1995), (Hartley, *et. al.*, 1980)

2.4.1. Calorimetría

La calorimetría es una técnica de análisis basada en la medición de los cambios de calor en el sistema, a través de ella se pueden determinar los parámetros energéticos asociados a la unión de dos especies, estos parámetros son: el número de sitios de enlace o la estequiometría de la reacción, la fuerza en la que se da la asociación (expresada en términos de la constante de formación o de la energía libre de Gibbs, ΔG) y la caracterización de las contribuciones entálpicas y entrópicas a ΔG (E. Freire, 1990), (Hansen, 2011).

Hoy en día ésta técnica es utilizada principalmente en bioquímica para el estudio de proteínas y macromoléculas y su interacción con diversas especies químicas; también es utilizada para el estudio de surfactantes mediante la construcción de las isothermas de adsorción y para el estudio termodinámico de reacciones de complejación entre metales y ligantes de interés (Bjelić, 2008).

El cambio de entalpía para una reacción general entre un metal y un ligante se puede obtener mediante la medición del calor liberado o absorbido durante la reacción. Un calorímetro es un instrumento que permite conocer una cantidad de calor desconocida, determinada por comparación con una cantidad conocida. La cantidad de calor es medida mediante el monitoreo de la temperatura. El tipo de calorimetría más utilizado es el de titulación isotérmica (ITC) mediante el que puede obtenerse simultáneamente la constante de equilibrio (K), la entalpía (ΔH), la energía libre de Gibbs (ΔG) y la entropía (ΔS) (Berthon, 1995, pp.: 536, 546-550).

El experimento en calorimetría por titulación isotérmica (ITC) consiste en adiciones del ligante (L), que es colocado en la jeringa de inyección, al receptor (R), que está contenido en la celda de reacción. La jeringa de inyección se mantiene en movimiento facilitando el mezclado de los reactivos. Una celda de referencia, idéntica en forma y volumen a la celda de reacción se llena con agua (disolvente). Ambas celdas están colocadas en una chaqueta de aislamiento térmico y son equilibradas a la temperatura deseada antes de comenzar el experimento (Bjelić, 2008, pp.: 289-290) (Velázquez-Campoy, 2004, pp.: 17.8.1-17.8.2) (Milev, 2010, pp.: 6-7).

La figura 2-4 muestra un diagrama del equipo utilizado:

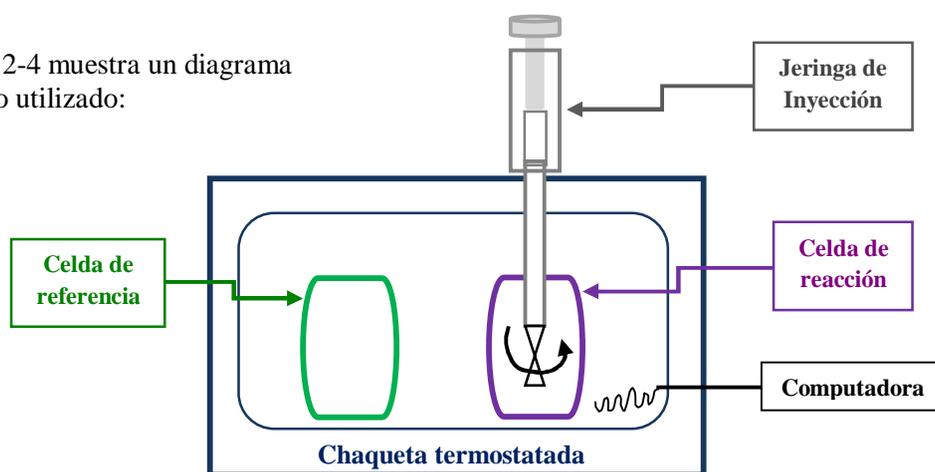
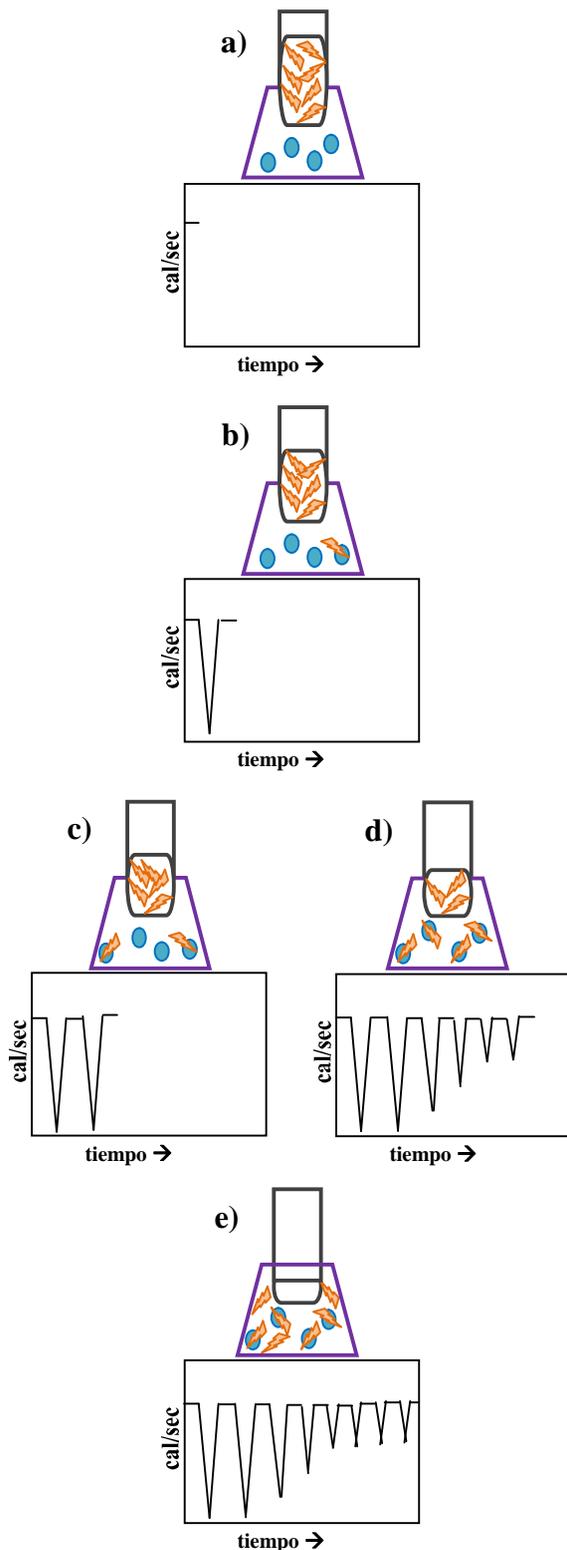


Fig. 2-4. Diagrama de un calorímetro de titulación isotérmica
(Velázquez-Campoy, 2004, pp.: 17.8.1-17.8.2) (Milev, 2010, pp.: 6-7)

Una mínima diferencia de temperatura se mantiene durante el experimento entre la celda de reacción y la de referencia; mientras se va uniendo el ligante (L) con el receptor (R), se produce calor debido a la formación del complejo (en una reacción exotérmica) o se absorbe calor (en una reacción endotérmica), el equipo detecta el cambio de temperatura y compensa la pérdida o ganancia de calor, la diferencia de calor es graficada como un pico sobre la línea base y es obtenida a través de la interfaz. La cantidad de calor asociada con la inyección se obtiene mediante la integración de ese pico, tomando como referencia la línea base.

Se llevan a cabo una serie de adiciones de L a R, de manera que la relación de las concentraciones totales $[L]_{tot}/[R]_{tot}$ va aumentando hasta de 2 a 3 veces ó más, de acuerdo a las necesidades de la investigación. Los valores de calor observados monitorean el grado de unión entre L y R conforme la saturación aumenta. Conforme los sitios de coordinación se van saturando van ocurriendo menos enlaces y el calor va cambiando respecto al inicial, cuando todos los sitios se saturan no ocurren más uniones y sólo se observa en calor de dilución. La figura 2-5 ilustra la obtención del termograma, que es el gráfico resultante de la cantidad de calor en función del tiempo:



Considerando que (🍃) corresponde al reactivo L y (●) corresponde al reactivo R.

a) Previo a la inyección del reactivo L no hay cambio en el calor del sistema.

b) En la primera inyección todo L adicionado se une a R, lo que produce un cambio en el calor del sistema que se observa como un pico en el gráfico, después de esta primera inyección en sistema vuelve al estado inicial antes de la siguiente inyección, es decir, a la línea base.

c) y d) en las siguientes inyecciones todo L adicionado se une a R hasta que se saturan los sitios de unión, en cada inyección se produce un cambio en el calor del sistema, que va disminuyendo conforme se van agotando los sitios de unión.

e) ya que se han saturado todos los sitios de unión no es posible que se enlace más L a R, por lo que el calor del sistema corresponde al de dilución.

Fig. 2-5. Diagrama del progreso de un experimento de ITC. (Hansen, 2011) (Bjelić, 2008, pp.: 289-290) (Velázquez-Campoy, 2004, pp.: 17.8.1-17.8.2) (Milev, 2010, pp.: 6-16)

A partir de los datos correspondientes al calor del sistema en cada inyección se genera una isoterma de enlace (Fig. 2-6), que es una curva que representa el grado de saturación de la especie R en términos de la relación molar del L adicionado sobre la de R. Entonces el grado de saturación es definido en función del calor asociado con la reacción (Freire, 1990). El punto de inflexión de la curva indicará la estequiometría de la reacción, la diferencia de calor total de la titulación indicará el cambio de entalpía y la pendiente de la curva corresponderá al valor de la constante de equilibrio.

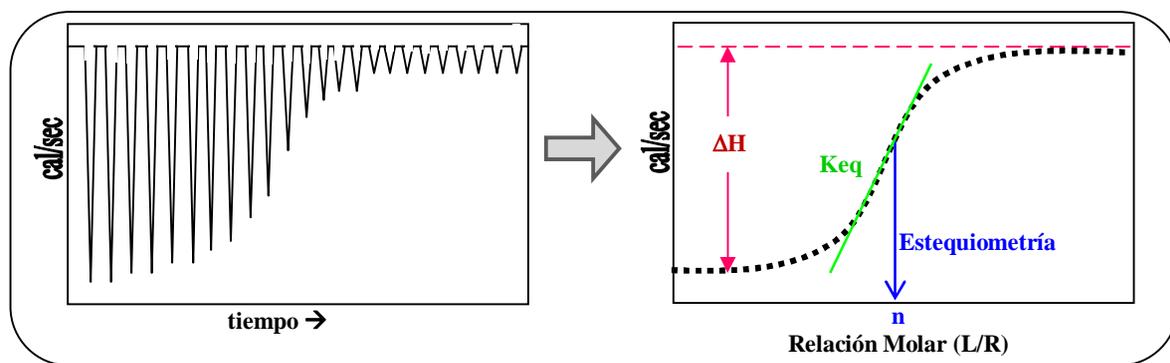


Fig. 2-6. Transformación del termograma en la isoterma de enlace para la titulación de la especie R con la especie L.

El calor detectado en cada inyección es proporcional al valor de entalpía de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$q = V_{cell} \Delta H [RL]_i$$

Donde:

V_{cell} = volumen de la celda de reacción

ΔH = el cambio de entalpía asociado a la reacción entre L y R

$[RL]_i$ = la concentración del complejo formado en la duración de la inyección

Hay diversas maneras en que se pierde o se gana calor en un equipo diseñado para mediciones de los parámetros termodinámicos, es por eso que se deben tomar en cuenta ciertas correcciones en la ecuación del cálculo del calor total, esta ecuación es:

$$q_r = q_{tot} - [q_{dil} + q_{hl} + q_{td}]$$

donde:

q_{tot} es el calor total medido

q_{dil} es el calor de dilución de los reactivos

q_{hl} es la pérdida de calor durante la reacción

q_{td} es el calor resultante de las diferencias de temperatura entre los reactivos

Al utilizar un equipo de calorimetría por titulación isotérmica no hay preocupación por los últimos dos términos, ya que la temperatura se mantiene constante y es un sistema cerrado que no permite pérdida de calor, así que las correcciones en ITC sólo son por la dilución de los reactivos.

Para conocer el valor de $[RL]_i$ (término involucrado en la ecuación del calor detectado por inyección) utilizamos la expresión de la constante de equilibrio:

$$K_A = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{[RL]}{([R]_{tot} - [RL])([L]_{tot} - [RL])}$$

Haciendo las operaciones correspondientes, obtenemos una ecuación cuadrática:

$$[RL]^2 - \left(\frac{1}{K_A} + [R]_{tot} + [L]_{tot} \right) [RL] + [R]_{tot}[L]_{tot} = 0$$

A partir de esta ecuación podemos conocer el valor de [RL], combinado las ecuaciones anteriores podemos llegar a un ajuste con los datos experimentales para conocer K_A y ΔH y conocidos estos valores se pueden calcular todos los parámetros termodinámicos relevantes haciendo uso de las siguientes ecuaciones:

La relación de la energía libre de Gibbs (ΔG) con la constante de equilibrio:

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

R = constante de los gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T = temperatura absoluta (en grados Kelvin)

El cambio de entropía asociado a la reacción puede calcularse a partir de la expresión para ΔG :

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

También puede calcularse el cambio de capacidad calorífica (ΔC_p): $\Delta C_p = d\Delta H/dT$.

De este modo la técnica ITC se convierte en una poderosa técnica para lograr la caracterización termodinámica de una reacción entre dos especies. Se necesitan aproximadamente 2-3 experimentos de 2-3 horas cada uno para obtener los resultados, sin embargo debemos tomar en cuenta que algunas reacciones pueden ser muy rápidas y pueden completarse durante el tiempo en que se mezclan las disoluciones y otras son tan lentas que se siguen llevando a cabo aún después de completado el tiempo de mezclado (Bjelić, 2008) (Freire, 1990).

2.5. Número de especies en disolución

Antes de empezar a hacer cálculos sobre las constantes de estabilidad, es necesario definir el modelo químico que será utilizado para éstos cálculos. Para ello debemos conocer el número y la naturaleza de las especies presentes en el sistema, para lo que existen algunos métodos. Aunque, a veces no es posible determinar el número de especies y su fórmula química directamente, entonces es necesario tomar en cuenta el razonamiento químico y la evaluación estadística de los datos.

Para determinar el número total de especies, en el equilibrio, presentes en una disolución, se emplea la medida de un parámetro físico como función del número del tipo de moléculas. La técnica más utilizada es la espectrofotometría, en la que trabajamos con mediciones de absorbancia, que es una función lineal de la concentración a una determinada longitud de onda (λ); como lo indica la Ley de Beer, que puede expresarse como:

$$\frac{A_{obs}^\lambda}{l} = \epsilon_1^\lambda c_1 + \epsilon_2^\lambda c_2 + \dots + \epsilon_n^\lambda c_n$$

Donde:

$\frac{A_{obs}^\lambda}{l}$ = absorbancia observada por unidad de paso óptico, a una longitud de onda λ

$\epsilon_1^\lambda, \epsilon_2^\lambda, \epsilon_n^\lambda$ = coeficientes de absortividad molar de las especies 1, 2, y n, a una longitud de onda λ

c_1, c_2, c_n = concentraciones de las especies

Al superponer los espectros de absorción de diversas disoluciones con concentraciones metal y ligante variantes, es posible observar la presencia de puntos invariantes producidos por la intersección de los espectros, éstos puntos son conocidos como *puntos isobésticos*. La presencia de uno o más indica la presencia de al menos dos especies con diferente relación metal-ligante, en equilibrio. Datos como éstos, adicionados con otros obtenidos por un método complementario son utilizados para determinar el número de especies en el sistema (Hartley, *et. al.*, 1980).

Existen programas computacionales utilizados para dicho efecto, entre ellos podemos citar a los programas TRIANG y SYBILA, que son los que se utilizarán durante este proyecto.

TRIANG. Es un programa escrito en lenguaje FORTRAN que estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en el sistema, a partir de los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda para distintas disoluciones, y considerando el error en las lecturas de transmitancia (ΔT). Considerando que se cumple la Ley de Beer y la Ley de aditividades para el sistema de estudio, TRIANG establece la existencia de una especie química absorbente comparando entre valores de absorbancia y errores asociados a la misma.

El procedimiento que sigue el programa se describe a continuación: la matriz de absorbancias A es reducida a una matriz equivalente mediante una serie de operaciones elementales, la matriz reducida contiene a los elementos de mayor magnitud en la diagonal principal y todos los elementos por debajo de ésta son cero. Este proceso se llama triangularización. El grado de la matriz resultante está dado por el número de elementos ‘diferentes de cero’ presentes en la diagonal de la matriz. Para decidir qué es ‘diferente de cero’, se calcula también una matriz reducida del error (E), para ello se utiliza la ecuación de la propagación del error. Los valores de los elementos correspondientes en A y E se comparan, el elemento en A será ‘diferente de cero’ si es mayor al elemento correspondiente en E multiplicado por tres. El grado de la matriz (el número de elementos ‘diferentes de cero’) corresponderá al número de especies que absorben radiación electromagnética de forma diferente en el sistema de estudio (Berthon, 1995). Para datos espectrofotométricos el valor de ΔT debe encontrarse en el intervalo de $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$. (Gómez-Zaleta, 2006)

SYBILA. Es un programa escrito en BASIC que utiliza técnicas de estadística multivariante como el análisis de factores (FA) o el análisis de componente principal (PCA) para estimar el número de especies presentes en un sistema químico. Estas técnicas se refieren al análisis de una matriz de datos A de $m \times n$, donde m podría ser el conjunto de espectros de absorbancia, o cualquier otra observación, para cada valor de n (variable) de pH.

De manera que se puede escribir la siguiente ecuación: $A = E * C$, es decir, se tiene una matriz A de valores de absorbancia para n_w longitudes de onda de n_s muestras, donde se tienen n_c componentes que absorben en el intervalo elegido, E es la matriz de absorptividades molares $n_w \times n_c$ y C es la matriz de concentraciones $n_c \times n_s$.

El programa pretende encontrar el determinante de la matriz de datos. Existen diferentes formas para encontrarlo, una de ellas es el método descrito por Wallace y Katz que involucra diagonalizaciones tanto de la matriz A como de la matriz de error, como lo hace TRIANG. SYBILA utiliza la técnica FA con varios criterios para estimar el determinante, en particular el propuesto por Kankare que involucra los residuales de la desviación estándar de las absorbancias (Gómez-Zaleta, 2006).

2.6. Naturaleza de las especies en disolución

Una vez conocido el número de especies presentes en disolución, el siguiente paso es conocer la estequiometría de éstas especies (Berthon, 1995). La absorción molecular se utiliza para distintos estudios de caracterización, entre ellos la determinación de la estequiometría de los complejos metal-ligante y de las constantes de equilibrio. La estequiometría de una reacción de complejación metal-ligante con la forma general:



Puede determinarse mediante uno de los siguientes métodos: variaciones continuas y relaciones molares.

2.6.1. Variaciones continuas (método de Job)

Si se considera la reacción:



Se preparan disoluciones de M y L a la misma concentración para hacer, a partir de ellas, una serie de disoluciones de forma que la concentración total (o el número total de moles) de M y L sea igual en todas, pero la concentración (o el número de moles) de M y L varían (Ayres, 1968). De manera que, si $[M]$ y $[L]$ son, respectivamente las concentraciones de metal y ligante y n_M y n_L el número de moles en la disolución i , entonces:

$$C_{tot} = [M]_i + [L]_i$$

$$n_{tot} = (n_M)_i + (n_L)_i \quad (\text{Harvey, 2002})$$

Así por ejemplo se preparan disoluciones que contienen una parte de M y nueve de L, dos partes de M y ocho de L, y así sucesivamente de manera que la cantidad total de moles y la concentración total sean constantes. Para cada una de las disoluciones se mide alguna propiedad que sea una función lineal de la concentración. Si se mide la absorbancia, se representan gráficamente los valores a la longitud de onda óptima (a la que absorbe el complejo ML_y) frente a la fracción molar de L en cada una de las disoluciones $(X_L)_i$, este último valor se calcula de la siguiente manera:

$$(X_L)_i = \frac{[L]_i}{[M]_i + [L]_i}$$

O en función del número de moles:

$$(X_L)_i = \frac{n_L}{n_M + n_L}$$

La representación gráfica tendrá dos ramas lineales: una cuando el reactivo limitante es el ligante, y otra cuando el reactivo limitante es el metal. La intersección de estas dos ramas se produce cuando la mezcla de metal y ligante se hace estequiométrica, se presentará a la fracción molar que corresponde a la composición del complejo formado. Para determinar el valor de y del complejo metal-ligante, ML_y , se utiliza la fracción molar del ligante en esta intersección:

$$y = \frac{n_L}{n_M} = \frac{X_L}{X_M} = \frac{X_L}{1-X_L} \quad (\text{Harvey, 2002})$$

La tabla 2-4 muestra las condiciones estequiométricas para tres tipos de complejos y su correspondiente fracción molar de L y M en la que se espera se encuentre el valor máximo de la propiedad medida. La figura 2-7 muestra el comportamiento de los gráficos típicos para estos

complejos considerando que se mide la absorbancia, se observa el máximo que indica la composición del complejo predominante, las líneas son rectas ya que se trata de un modelo teórico en el que las reacciones de formación de cada uno de los complejos son cuantitativas.

Tabla 2-4. Condiciones estequiométricas y sus fracciones molares para el método de variaciones continuas.

Complejo	Condiciones Estequiométricas		Fracción molar de L ^(a)	Fracción molar de M ^(a)
	n_M	n_L	$(X_L)_{CE} = \frac{n_L}{n_M + n_L}$	$(X_M)_{CE} = \frac{n_M}{n_M + n_L}$
ML	1	1	$1/(1+1) = 0.50$	$1/(1+1) = 0.50$
ML ₂	1	2	$2/(1+2) = 0.67$	$1/(1+2) = 0.33$
M ₃ L	3	1	$1/(3+1) = 0.25$	$3/(3+1) = 0.75$

^(a) para las condiciones estequiométricas (CE)

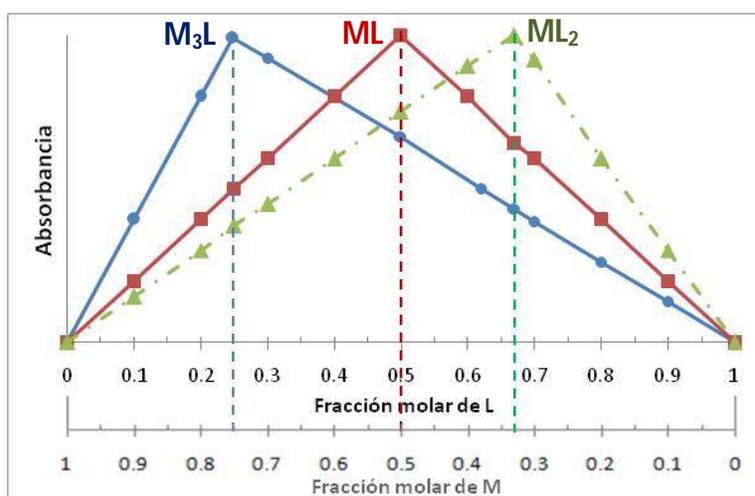


Fig. 2-7. Comportamiento típico de los gráficos para el método de variaciones continuas para complejos M₃L, ML y ML₂, donde solamente los complejos formados absorben a la longitud de onda seleccionada (Harris, 2003).

Cuando se utiliza el método de las variaciones continuas se parte de algunas hipótesis sobre el sistema, bajo las cuales se sabe funciona:

- Se forma un único complejo metal-ligante.
- La propiedad medida es una función lineal de la concentración. Si se mide la absorbancia, el complejo metal-ligante cumple la Ley de Beer para la gama de concentraciones utilizadas.
- La reacción de formación del complejo es cuantitativa (el complejo no está disociado). Si la reacción no es cuantitativa, es decir, si la constante de formación del complejo es relativamente pequeña, el gráfico típico no presenta un máximo agudo, sino achatado; cuanto más intenso es el achatamiento, más extensa es la disociación del complejo. En estos casos se recurre a la extrapolación de las dos ramas lineales, donde la disociación se ha suprimido debido al exceso de uno de los dos reactivos, el punto de intersección extrapolado corresponde a la composición del complejo.

- La fuerza iónica y el pH son constantes. Ya que las condiciones de la disolución pueden influir en la estabilidad del complejo, es necesario controlar cuidadosamente la composición (buffers, agentes enmascarantes). (Harvey, 2002) (Ayres, 1968) (Harris, 2003).

2.6.2. Relaciones Molares

Si se considera nuevamente la reacción:



Se prepara una serie de disoluciones de forma que la concentración de uno de los dos reactivos M o L se mantiene constante mientras la concentración del otro reactivo varía. Así, por ejemplo se prepara una disolución con una parte de M y una de L, otra con una parte de M y dos de L y así sucesivamente.

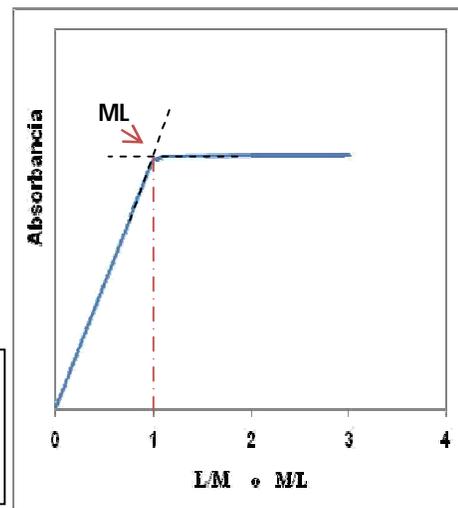
En la representación gráfica se utiliza el valor de la relación molar L/M o M/L, que se calcula a partir del número de moles de metal y ligante, n_M y n_L respectivamente, en la disolución i , entonces:

$$\frac{L}{M} = \frac{n_L}{n_M} \quad \text{y} \quad \frac{M}{L} = \frac{n_M}{n_L}$$

Si el complejo está muy poco disociado, es decir, la reacción de formación es cuantitativa, la representación gráfica de la propiedad frente a la relación molar L/M, en las disoluciones en las que [M] permanece constante y [L] varía, da lugar a una línea recta desde el origen hasta el punto que corresponde a la relación molar del complejo formado, a partir del cual cambia de pendiente y alcanza una valor de la propiedad constante, bajo el supuesto de que solamente el complejo ML_y tiene un valor de la propiedad medida diferente de cero. Alternativamente, se puede mantener [L] constante y variar [M], y el punto en el que cambia la pendiente indica la relación M/L. Si el complejo está disociado de forma apreciable, el cambio de pendiente no es agudo sino que presenta una curvatura, en este caso se recurre a la extrapolación de los tramos iniciales y finales de la curva al punto de intersección, el punto extrapolado corresponde a la relación de composición del complejo.

La figura 2-9 muestra un gráfico típico del método de relaciones molares para la formación de un complejo 1:1 (ML) en el que se mide la absorbancia, que se controla en una longitud de onda en la que sólo absorbe el complejo. Para este tipo de complejo se observa el mismo perfil del gráfico independientemente de cuál sea la relación molar representada L/M o M/L.

Fig. 2-9. Gráfico típico para el método de relaciones molares en la formación de un complejo del tipo ML donde sólo el complejo absorbe en la longitud de onda seleccionada.



Las figuras 2-10a y 2-10b corresponden a los gráficos típicos para un complejo ML_2 en el que el metal, el ligante y el complejo absorben en la longitud de onda seleccionada. En la figura 2-10a se representa la relación molar L/M frente a la absorbancia para el experimento en el que [M] permanece constante y [L] varía, el cambio de pendiente se ubica en la relación molar de dos,

mientras que en la figura 2-10b se representa la relación molar M/L frente a la absorbancia para el experimento en el que [L] permanece constante y [M] varía y en este caso el cambio de pendiente correspondiente al complejo ML₂ se encuentra en la relación molar 0.5. En la tabla 2-5 se indican las relaciones molares L/M y M/L que corresponden a la ubicación del cambio de pendiente en los gráficos correspondientes para este tipo de complejo.

Tabla 2-5. Condiciones estequiométricas y sus relaciones L/M y M/L para el método de relaciones molares.

Complejo	Condiciones Estequiométricas		Relación molar L/M ^(a) $\frac{L}{M} = \frac{n_L}{n_M}$	Relación molar M/L ^(a) $\frac{M}{L} = \frac{n_M}{n_L}$
	n _M	n _L		
ML	1	1	1/1 = 1	1/1 = 1
ML ₂	1	2	2/1 = 2	1/2 = 0.5

^(a) para las condiciones estequiométricas (CE)

Fig. 2-10a.

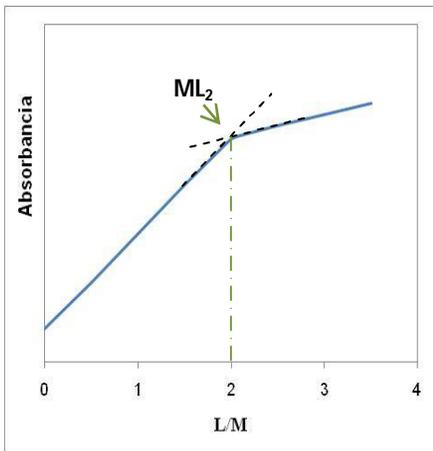


Fig. 2-10b.

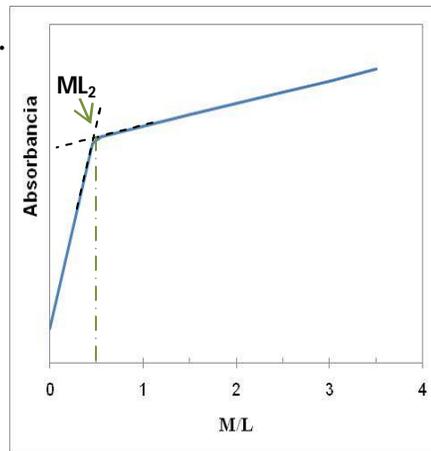


Fig. 2-10. Gráficos típicos para el método de relaciones molares en la formación de un complejo ML₂ donde el metal, el ligante y el complejo absorben en la longitud de onda seleccionada.

Al principio, este método se consideró aplicable únicamente a sistemas que involucraran la formación de un solo complejo en condiciones determinadas. Sin embargo, puede utilizarse para reacciones de complejación que se producen de manera progresiva, siempre que las absorptividades molares de los complejos sean diferentes y que las constantes de formación sean también lo suficientemente distintas para revelar su presencia. La figura 2-11 muestra los gráficos típicos para la formación progresiva de ML y ML₂ cuando solamente los complejos formados absorben (Harvey, 2002). La figura 2-11a se obtiene del experimento en el que [M] permanece constante y [L] varía, mientras que la figura 2-11b se obtiene a partir del experimento en el que [L] permanece constante y [M] varía. Estas representaciones gráficas muestran dos cambios de pendiente, en la figura 2-11a se encuentran en la relación molar L/M 1 y 2, y en la figura 2-11b se encuentran en la relación molar M/L 0.5 y 1. La tabla 2-5 reúne los valores para las relaciones molares asociados a cada uno de estos complejos.

Fig. 2-11a.

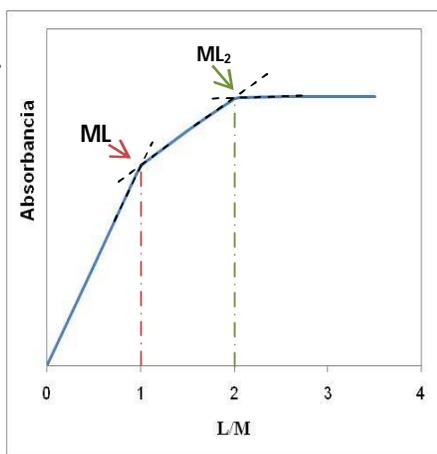


Fig. 2-11b.

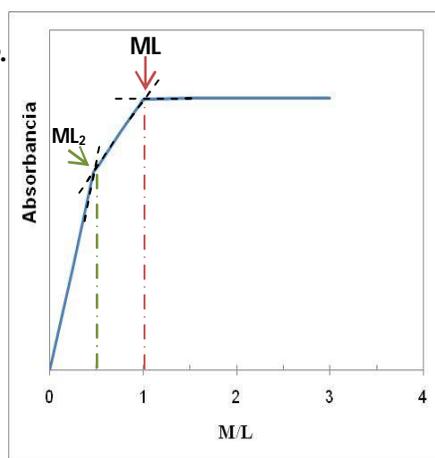


Fig. 2-11. Gráficos típicos para el método de relaciones molares en la formación progresiva de los complejos ML y ML_2 , donde sólo los complejos formados absorben en la longitud de onda seleccionada.

2.7. Programas computacionales

Se pueden calcular las constantes de equilibrio a partir de los métodos gráficos, no obstante pueden resultar difíciles las estimaciones del error, o la decisión de si el ajuste es adecuado al modelo, además el trabajo es mucho mayor cuando se tiene una gran cantidad de datos. A partir de éstas limitaciones se han desarrollado métodos de cálculo modernos; una variedad de programas bien establecidos y probados están disponibles para extraer constantes a partir de datos primarios (Hartley, *et. al.*, 1980). Uno de ellos y el que será utilizado en éste proyecto es SQUAD. Los sistemas computacionales permiten trabajar con sistemas más complicados y mayor número de datos, así como tener una mayor confiabilidad por el tratamiento estadístico de la información (Bernabé-Pineda, 2009).

SQUAD es un programa computacional escrito en lenguaje FORTRAN, diseñado para refinar constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto, a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferente composición. El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH, y puede involucrar especies como: $M_m M'_l H_j L_i L'_q$, con $m, l, j, i, q \geq 0$. Para el refinamiento de las constantes de equilibrio se utiliza el algoritmo de Gauss-Newton, por medio de la minimización de la suma de los residuos de absorbancia cuadráticos (mínimos cuadrados no lineales):

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2$$

donde:

I = todas las disoluciones

NW = todas las longitudes de onda

$A_{i,k}^T$ = absorbancia calculada por SQUAD en la i -ésima disolución a la k -ésima longitud de onda

$A_{i,k}^E$ = absorbancia experimental en la i -ésima disolución a la k -ésima longitud de onda

Las absorbancias calculadas son obtenidas mediante la resolución de la ecuación de Beer. SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie, y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson (minimización de la suma de cuadrados de los residuos). El modelo converge si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo 0.001. Que éste criterio se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento, ya que puede tenerse una convergencia en un mínimo relativo.

Para determinar si el modelo químico propuesto explica la información experimental, SQUAD emplea los siguientes parámetros estadísticos:

- Parámetro de correlación (matriz): determina la asociación entre las variables, su valor va de cero a uno, es una medida de la dependencia lineal entre las variables.
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}): es un indicativo de la validez del modelo químico propuesto.
- La desviación estándar sobre las constantes (σ_{ctes}): Braibanti y Brushei proponen que valores del 1 % son aceptables.
- La desviación estándar por espectro (σ_{espectro}) y desviación estándar sobre los coeficientes de absorptividad molar (σ_{coef}): dependen de las desviaciones estándar en los datos de absorbancia y de las constantes.

El análisis estadístico que presenta SQUAD, así como los intervalos que propone, depende en gran medida de la precisión del espectrofotómetro empleado, de la cantidad de datos alimentados y, sobre todo, de la complejidad química del sistema de estudio (Morales-Pérez, 1993).

El programa requiere buenos estimados iniciales de las constantes de estabilidad para asegurar la convergencia. Pueden probarse diferentes modelos químicos, pero finalmente el punto de vista objetivo del investigador debe ser utilizado para construir el modelo que mejor explique los resultados experimentales (Hartley, *et. al.*, 1980).

MEDUSA (Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms) es un software de equilibrios químicos con el cual es posible crear diversas representaciones gráficas del sistema químico estudiado, a partir de los valores refinados de las constantes de equilibrio. Se pueden crear diagramas de distribución de especies, logarítmicos, de zonas de predominio. Para la construcción de dichos diagramas se tiene el apoyo de una base de datos llamada HYDRA (Hydrochemical Equilibrium Data Base), que contiene valores de constantes de formación a 25 °C, utiliza los datos de constantes de equilibrio desarrollada por el *Department of Inorganic Chemistry, Royal Institute of Technology (KTH)* en Estocolmo Suiza. Algunos de los elementos que constituyen el archivo de entrada son: el número de componentes del sistema, número de complejos formados y especies sólidas tanto de complejos como de componentes, la estequiometría de cada uno de los complejos y los valores de sus constantes de equilibrio, la concentración de trabajo, la fuerza iónica y la temperatura (Bernabé-Pineda, 2009) (Gómez-Zaleta, 2006) (Puigdomenech <https://www.kth.se/en/che/medusa>).

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Se sabe que el compuesto LQM314 puede coordinarse con cobre (II), por lo que es posible comprobar la formación de los complejos correspondientes utilizando la técnica de espectrofotometría UV-Vis, y realizar el estudio de especiación química en dos diferentes disolventes, para describir el comportamiento químico de este sistema en disolución. Por otro lado, si se realiza el estudio del sistema mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) a las condiciones experimentales óptimas, será posible confirmar las estequiometrías de los complejos formados y determinar el valor de entalpía asociado a las reacciones.

3.2 Objetivos generales

Determinar las constantes de estabilidad correspondientes a la formación de los complejos Cu (II)-*LQM314*, realizando valoraciones espectrofotométricas, y utilizando los programas computacionales existentes para tal efecto, para definir la interacción química existente entre estas dos especies a las condiciones de trabajo impuestas.

Realizar estudios exploratorios del sistema *LQM 314* - acetato de cobre (II) mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

3.3 Objetivos particulares

Estudiar el sistema *LQM 314* - acetato de cobre (II) en metanol como medio de disolución, utilizando los métodos de relaciones molares y variaciones continuas para determinar la estequiometría de las especies formadas, y sus correspondientes valores de constantes de equilibrio.

Estudiar el sistema *LQM 314* - acetato de cobre (II) en disolución acuosa bajo condiciones pseudofisiológicas, $T=37\text{ °C} \pm 0.5$ y $I=0.15\text{ M}$, utilizando los métodos de relaciones molares y variaciones continuas, así como valoraciones en función del pH para determinar la estequiometría de las especies formadas, y sus correspondientes valores de constantes de equilibrio.

Optimizar las condiciones experimentales para el estudio del sistema *LQM 314* - acetato de cobre (II) mediante la técnica de microcalorimetría ITC, con el fin de determinar las estequiometrías de los complejos formados.

4. Materiales y metodología

Materiales y equipo

Matraces volumétricos de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL
Pipeta volumétrica de 5 mL, 15 mL
Vaso de precipitados de 50 mL, 100 mL, 250 mL
Celda de vidrio termostata de 150 mL
Tapa de 5 bocas para celda termostata
Barra magnética
Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
Puntas para pipeta de volumen variable
Espátula
Piseta
Termómetro
Pipeta de volumen variable 0.5-5 mL, ThermoScientific
Pipeta de volumen variable 0.1-1 mL, ThermoScientific
Pipeta de volumen variable 10-50 μ L, ThermoScientific
Pipeta de volumen variable 1-10 μ L, ThermoScientific

Balanza Analítica Pioneer, Ohaus
Potenciómetro SevenMulti, Mettler Toledo

Electrodo de pH InLab®413 pH 0...14, Mettler Toledo
Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 35, Perkin Elmer
Baño recirculador PolyScience
Agitador magnético IKA
Sonicador Branson 1510
Purificador de agua Purelab Classic, ELGA
Microcalorímetro VP-ITC GE Healthcare

Reactivos

Nitrógeno gaseoso 99.997%, INFRA
Agua Desionizada
Disolución Bufer pH 4, J.T.Baker
Disolución Bufer pH 7, J.T.Baker
Disolución Bufer pH 10, J.T.Baker
HCl 37.2 %, J.T.Baker
HClO₄ 60.4 %, J.T.Baker
NaOH 98.6 %, Mallinkrodt
Cloruro de sodio Q.P., Reactivos y Productos Químicos Finos
Acetato de cobre (II) \geq 98 %, Sigma-Aldrich
Compuesto LQM314 (Sintetizado, purificado y caracterizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán)

4.1. Procedimiento para la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en metanol

i. Preparación de disoluciones

Disolución de acetato de cobre (II) en metanol

Se colocaron aproximadamente 10 mg de acetato de cobre (II) en un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió el sólido con metanol y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 1×10^{-3} M. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. Cu(II)**. (El sólido tarda un poco en disolverse, tiene una solubilidad en metanol aproximada de 2.7 mg/mL*) * Se estimó experimentalmente.

Disolución de LQM314 en metanol

Se colocaron aproximadamente 16 mg de compuesto LQM314 en un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió el sólido con metanol y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 1×10^{-3} M. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. LQM**. (El sólido se disuelve fácilmente, tiene una solubilidad en metanol aproximada de 22.7 mg/mL*) * Se estimó experimentalmente.

ii. Procedimiento para el método de variaciones continuas

Para el método de variaciones continuas se prepararon 11 sistemas, cada uno con la misma concentración total, resultado de la suma de las concentraciones del Cu (II) y el LQM314. Los sistemas se prepararon en matraces volumétricos de 5 mL, se homogeneizaron y se obtuvo el espectro de absorción UV/Vis de cada uno, en un intervalo de longitud de onda de 290 nm a 900 nm. La preparación de los sistemas se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4-1. Disoluciones preparadas para el método de variaciones continuas en metanol.

Sistema	mL Soln. Cu(II)	mL Soln. LQM	[Cu(II)] (M)	[LQM314] (M)	Suma de concentraciones (M)
1	5.0	0	1.0×10^{-3}	0.0	1.0×10^{-3}
2	4.5	0.5	0.9×10^{-3}	0.1×10^{-3}	1.0×10^{-3}
3	4.0	1.0	0.8×10^{-3}	0.2×10^{-3}	1.0×10^{-3}
4	3.5	1.5	0.7×10^{-3}	0.3×10^{-3}	1.0×10^{-3}
5	3.0	2.0	0.6×10^{-3}	0.4×10^{-3}	1.0×10^{-3}
6	2.5	2.5	0.5×10^{-3}	0.5×10^{-3}	1.0×10^{-3}
7	2.0	3.0	0.4×10^{-3}	0.6×10^{-3}	1.0×10^{-3}
8	1.5	3.5	0.3×10^{-3}	0.7×10^{-3}	1.0×10^{-3}
9	1.0	4.0	0.2×10^{-3}	0.8×10^{-3}	1.0×10^{-3}
10	0.5	4.5	0.1×10^{-3}	0.9×10^{-3}	1.0×10^{-3}
11	0	5.0	0.0	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-3}

Una vez obtenidos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se realizó por triplicado.

iii. Procedimiento para el método de relaciones molares

Este método se realizó en dos partes:

- Manteniendo la cantidad de LQM314 constante
- Manteniendo la cantidad de Cu(II) constante

Se tomaron 5 mL de la disolución a permanecer constante (*Soln. Cu(II)* o *Soln. LQM*) y se fue adicionando la otra disolución (*Soln. LQM* o *Soln. Cu(II)*) en volúmenes de 0.5 mL en 0.5 mL, obteniendo el espectro de absorción UV/Vis después de cada adición, en un intervalo de longitud de onda de 290 nm a 900 nm. Una vez obtenidos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se realizó por triplicado.

4.2. Procedimiento para la especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en agua

a) Determinación de las constantes de acidez del compuesto LQM314 bajo las condiciones de trabajo utilizadas para la especiación con cobre (II)

Aguilar-Hernández, 2012 describe la determinación de las constantes de acidez del compuesto LQM314 utilizando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para modificar el pH, y cloruro de sodio para imponer la fuerza iónica; sin embargo para realizar la especiación química utilizamos ácido perclórico e hidróxido de sodio únicamente para evitar la formación de complejos de cobre (II) con cloruro. Ya que hacemos algunos cambios en el procedimiento experimental, es necesario obtener las constantes de acidez del compuesto LQM314 bajo las mismas condiciones, de esta forma los valores de las constantes de acidez del ligante y de las constantes de formación de los complejos estarán determinados en las mismas condiciones experimentales, lo que es importante porque todos estos valores se utilizarán para el análisis de resultados y para la refinación de las constantes de formación de los complejos.

Preparación de disoluciones

Disolución NaOH 0.15 M

Se colocaron aproximadamente 1.019 g de NaOH en un vaso de precipitado de 50 mL, se disolvió el sólido con aproximadamente 10 mL de agua desionizada; se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 1M. De esta disolución se tomaron 15 mL y se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al volumen de aforo con agua desionizada.

Disolución HClO₄ 0.15 M

Se tomaron 1660 μ L de ácido perclórico y se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL sobre un poco de agua desionizada, se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente.

Disolución Stock LQM314

Se pesó en una balanza analítica, en un matraz volumétrico de 25 mL, aproximadamente 5 mg del compuesto LQM314. Se adicionaron 4 gotas de HClO₄ 0.15 M y se solubilizó el sólido con agua desionizada agitando manualmente. Una vez disuelto completamente, se llevó al volumen de aforo con agua desionizada y se homogeneizó. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. S LQM314**.

Disolución Ácida LQM314

Se tomaron 10 mL de la **Soln. S** y se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron 1.66 mL de HClO₄ concentrado y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. Ácida LQM314**.

Disolución Básica LQM314

Se tomaron 10 mL de la **Soln. S** y se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron 10 mL de NaOH 1.5 M y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. Básica LQM314**.

Valoración Ácido-Base

Para realizar la valoración, primero se encendió, se calibró y ajustó el potenciómetro, se montó la celda termostataada y se encendió el recirculador ajustándolo a 37 °C. Se agregó a la celda un

volumen de 15 mL de la disolución ácida, manteniéndola en agitación en un sistema cerrado, en una atmósfera de nitrógeno para evitar variaciones en el pH debidas al CO₂ del ambiente.

Se encendió el espectrofotómetro y se seleccionó el método a utilizar; se realizó la calibración y ajuste a cero (autocero) del equipo utilizando agua desionizada como blanco, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 900 nm.

Se verificó que la temperatura del sistema se encontrara a 37 °C y se midió el pH inicial de la *Soln. Ácida*, se tomó una alícuota de la disolución y se colocó en una celda de cuarzo para obtener su espectro de absorción; una vez obtenido, se devolvió la alícuota tomada a la celda termostataada. Se agregaron al sistema volúmenes de la *Soln. Básica* en cantidades necesarias para subir el pH cada 0.1 unidades, tomando en cada valor de pH una alícuota de la disolución para obtener el espectro de absorción correspondiente, para después regresar la muestra al sistema. Se registraron los cambios de pH, realizando la valoración hasta pH=12. Ya obtenidos todos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

b) Especiación química de Cu(II) con el compuesto LQM314

i. Preparación de disoluciones

Disolución concentrada de acetato de cobre (II)

Se colocaron aproximadamente 6.3 mg de acetato de cobre (II) en un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió el sólido con agua desionizada y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 6.3×10^{-4} M. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. A Cu(II)*. (El sólido tiene una solubilidad en agua de 72 mg/mL)

Disolución concentrada de LQM314

Se colocaron aproximadamente 10 mg de compuesto LQM314 en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 4 gotas de NaOH 0.15 M para disolver el sólido y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada, obteniendo así una concentración de 6.3×10^{-4} M. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. A LQM*. (El sólido tiene una solubilidad en agua de aproximadamente 1.4 mg/mL*)* Se estimó experimentalmente.

Disolución de trabajo de acetato de cobre (II)

Se tomaron 10 mL de la *Soln. A Cu (II)* y se depositaron en un vaso de precipitado de 250 mL, se diluyó la alícuota con aproximadamente 90 mL de agua desionizada; se ajustó el pH de la disolución a 10, 8 ó 4, con NaOH 0.15 M y con HClO₄ 0.15 M. (El pH inicial de la disolución se encuentre entre 4 y 5). Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada, obteniendo así una concentración de 6.3×10^{-5} M. Se midió el pH final de la disolución. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. T Cu (II) pH 10, 8 ó 5*.
NOTA: se ajustó a un pH aproximado cada una de las disoluciones y se trabajaron los sistemas sin amortiguar, verificando que durante el experimento el pH se encontrara en la zona de predominio de la especie LQM presente de acuerdo a las condiciones impuestas, considerando el comportamiento ácido-base del ligante.

Disolución de Trabajo de LQM314

Se tomaron 10 mL de la *Soln. A LQM* y se depositaron en un vaso de precipitados de 250 mL, se diluyó la alícuota con aproximadamente 90 mL de agua desionizada; se ajustó el pH de la disolución a 10, 8 ó 4, con NaOH 0.15 M y con HClO₄ 0.15 M. (El pH inicial de la disolución se encuentra entre 7 y 8). Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al

volumen de aforo con agua desionizada, obteniendo así una concentración de 6.3×10^{-5} M. Se midió el pH final de la disolución. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. T LQM pH 10, 8 ó 5**.

NOTA: se ajustó a un pH aproximado cada una de las disoluciones y se trabajaron los sistemas sin amortiguar, verificando que durante el experimento el pH se encontrara en la zona de predominio de la especie LQM presente de acuerdo a las condiciones impuestas, considerando el comportamiento ácido-base del ligante.

Disolución ácida de acetato de cobre (II)

Se tomaron 10 mL de la *Soln. A Cu (II)* y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 830 μ L de ácido perclórico concentrado y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. Ácida Cu (II)** y tiene una concentración de 6.3×10^{-5} M.

Disolución ácida de LQM314

Se tomaron 10 mL de la *Soln. A LQM* y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 830 μ L de ácido perclórico concentrado y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como **Soln. Ácida LQM** y tiene una concentración de 6.3×10^{-5} M.

ii. Procedimiento para variaciones continuas a pH fijo

Para el método de variaciones continuas se prepararon 11 sistemas, cada uno con la misma concentración total, resultado de la suma de las concentraciones del Cu (II) y el LQM314. Los sistemas se prepararon en matraces volumétricos de 10 mL y se homogeneizaron, se colocó cada disolución en un baño de agua a 37 °C y se burbujeó nitrógeno en ella, después de 5 minutos se tomó una alícuota y se obtuvo el espectro de absorción UV/Vis de cada una, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 900 nm. La preparación de los sistemas se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4-2. Disoluciones preparadas para el método de variaciones continuas en agua.

<i>Sistema</i>	<i>mL Soln.T Cu(II)</i>	<i>mL Soln.T LQM</i>	<i>[Cu(II)] (M)</i>	<i>[LQM314] (M)</i>	<i>Suma de concentraciones (M)</i>
1	10	0	6.3×10^{-5}	0.0	6.3×10^{-5}
2	9	1	5.7×10^{-5}	0.6×10^{-5}	6.3×10^{-5}
3	8	2	5.0×10^{-5}	1.3×10^{-5}	6.3×10^{-5}
4	7	3	4.4×10^{-5}	1.9×10^{-5}	6.3×10^{-5}
5	6	4	3.8×10^{-5}	2.5×10^{-5}	6.3×10^{-5}
6	5	5	3.2×10^{-5}	3.1×10^{-5}	6.3×10^{-5}
7	4	6	2.5×10^{-5}	3.8×10^{-5}	6.3×10^{-5}
8	3	7	1.9×10^{-5}	4.4×10^{-5}	6.3×10^{-5}
9	2	8	1.3×10^{-5}	5.0×10^{-5}	6.3×10^{-5}
10	1	9	0.6×10^{-5}	5.7×10^{-5}	6.3×10^{-5}
11	0	10	0.0	6.3×10^{-5}	6.3×10^{-5}

Una vez obtenidos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se realizó por triplicado.

iii. Procedimiento para relaciones molares a pH fijo

Este método se realizó en dos partes:

- Manteniendo la cantidad de LQM314 constante
- Manteniendo la cantidad de Cu(II) constante

Se tomaron 10 mL de la disolución a permanecer constante (*Soln. T Cu(II)* o *Soln. T LQM*) y se colocaron en una celda termostatada a 37 °C, con corriente de nitrógeno para evitar variaciones en el pH debidas al CO₂ del ambiente. Se fue adicionando la otra disolución (*Soln. T LQM* o *Soln. T Cu(II)*) en volúmenes de 1 mL en 1 mL hasta completar los 30 mL adicionados, obteniendo el espectro de absorción UV/Vis después de cada adición, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 900 nm. Una vez obtenidos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se realizó por triplicado.

iv. Procedimiento para relaciones molares fijas en función del pH (valoraciones ácido-base a relaciones molares fijas)

Se prepararon mezclas de las disoluciones ácidas a las relaciones molares LQM314:Cu(II) de 1:1, 1:2 y 2:1.

Para realizar la valoración, primero se encendió, se calibró y ajustó el potenciómetro, se montó la celda termostatada y se encendió el recirculador ajustándolo a 37 °C. Se agregó a la celda un volumen de 15 mL de la mezcla correspondiente, manteniéndola en agitación en un sistema cerrado, en una atmósfera de nitrógeno para evitar variaciones en el pH debidas al CO₂ del ambiente.

Se encendió el espectrofotómetro y se seleccionó el método a utilizar, se realizó la calibración y ajuste a cero (autocero) del equipo utilizando agua desionizada como blanco, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 900 nm.

Se verificó que la temperatura del sistema se encontrara a 37 °C y se midió el pH, se tomó una alícuota y se colocó en una celda de cuarzo para obtener su espectro de absorción; una vez obtenido, se regresó la alícuota tomada a la celda termostatada. Se agregaron al sistema volúmenes de la disolución de *NaOH 0.15 M* en cantidades necesarias para subir el pH cada 0.2 unidades, tomando en cada valor de pH una alícuota de la disolución para obtener el espectro de absorción correspondiente, para después regresar la muestra al sistema. Se registraron los cambios de pH, realizando la valoración hasta pH=12. Ya obtenidos todos los espectros, se realizó el análisis de resultados, corrigiendo los datos por dilución. El procedimiento se realizó por triplicado.

4.3. Procedimiento para la exploración del sistema cobre (II)-LQM314 mediante microcalorimetría ITC

A continuación se describe el procedimiento general, que involucra la experimentación en metanol y en agua. Se realiza una titulación calorimétrica, en la mayoría de los experimentos se coloca el metal en la celda de reacción y es titulada con el ligante, para estos experimentos se realizan dos titulaciones:

L-1) la titulación del metal con el ligante (metal en la celda de reacción y ligante en la jeringa)

L-2) la titulación del disolvente con el ligante (disolvente en la celda de reacción y ligante en la jeringa)

En metanol se hizo también un experimento colocando el metal en la jeringa, como titulante realizando también dos titulaciones:

- M-1*) la titulación del ligante con el metal (ligante en la celda de reacción y metal en la jeringa)
- M-2*) la titulación del disolvente con el metal (disolvente en la celda de reacción y metal en la jeringa)

La titulación de dilución se realiza para corregir el calor generado en la reacción, como si fuera un blanco.

a) ITC en metanol

Se prepararon disoluciones de LQM314 y de acetato de cobre (II) dejando en mayor concentración la disolución titulante (aproximadamente 10 veces más concentrada que la disolución en la celda), de manera que al finalizar la titulación se alcanzara una relación molar titulante/titulado máxima de 5 para comenzar. A partir de los resultados se modificaron las concentraciones para obtener diversas relaciones molares. Se modificó también el número y volumen de inyecciones y los tiempos hasta lograr los mejores resultados. Se realizaron experimentos con LQM como titulante (Tit. L en la Tabla 4-3) y con acetato de cobre como titulante (Tit. M en la Tabla 4-3).

i. Preparación de Disoluciones

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de las disoluciones, así como los parámetros de la valoración fijados en el calorímetro. En la primera parte se muestran los datos para los experimentos en los que LQM se encuentra en la pipeta de titulación y la disolución de acetato de cobre en la celda de reacción, a partir del resultado obtenido para la prueba lqmCu01 se fueron modificando las concentraciones y los parámetros del calorímetro (Tabla 4-3 Tit.L). La segunda parte de la tabla muestra los datos para los experimentos realizados con la disolución de acetato de cobre en la pipeta de titulación y la de LQM en la celda de reacción (Tabla 4-3 Tit. M).

Tabla 4-3. Disoluciones preparadas para microcalorimetría ITC en metanol.

Tit.	ID	[Cu(II)] (mM)	[LQM314] (mM)	RM _{máx} (LQM/Cu)	Núm. iny.	Vol./iny. (μ L)	Duración/inj. (segundos)	Espaciado (segundos)
L	lqmCu01	0.1155	2.5836	4.75	50	5	10	300
	lqmCu 02	0.1206	1.5123	2.38	50	5	10	300
	lqmCu 02b	0.1206	1.5123	1.38	50	3	6	200
	lqmCu 03	0.1206	1.5123	0.56	20	5	10	200
	lqmCu 04	0.1105	0.6301	0.89	41	5	10	200
	lqmCu 05	0.1306	0.7562	0.89	41	5	10	200
	lqmCu 05b	0.1306	0.7562	0.91	50	5	10	200
	lqmCu 06	0.2411	1.3863	0.98	45	5	10	200
	lqmCu 08	0.2512	1.4493	0.98	45	5	10	200
	lqmCu10	0.9043	25.5209	5.38	50	varios	varios	200
	lqmCu 12b	0.1206	1.5123	1.24	45	3	6	200
Tit.	ID	[Cu(II)] (mM)	[LQM314] (mM)	RM _{máx} (Cu/LQM)	Núm. iny.	Vol./iny. (μ L)	Duración/inj. (segundos)	Espaciado (segundos)
M	Culqm01	2.4114	0.0832	5.51	50	5	10	200
	Culqm02	19.0904	0.5671	6.37	63	2 5	22 41	200

	Culqm03	0.2673	0.0681	0.86	43	3 8	12 31	200
--	---------	--------	--------	------	----	--------	----------	-----

Tit. = titulación.

L = metal en la celda de reacción y ligante en la jeringa

M = ligante en la celda de reacción y metal en la jeringa

Los mejores resultados se obtuvieron a una relación molar máxima de LQM/Cu de 1.5, a continuación se describe el procedimiento para la preparación las disoluciones en este experimento.

Disolución de acetato de cobre (II) en metanol

Se colocaron aproximadamente 2.4 mg de acetato de cobre (II) en un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió el sólido con metanol y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 1.2 mM. Se tomó 1 mL de esta disolución y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó al volumen de aforo con metanol. La disolución se encuentra a una concentración de 0.1206 mM.

Disolución de LQM314

Se colocaron aproximadamente 2.4 mg de compuesto LQM314 en un matraz volumétrico de 5 mL, se disolvió el sólido con metanol y se llevó al volumen de aforo con el mismo disolvente, obteniendo así una concentración de 1.51 mM.

b) ITC en Agua

Se trabajó con las mismas condiciones impuestas para la especiación con cobre mediante espectrofotometría UV-Vis, es decir utilizando ácido perclórico 0.15 M y NaOH 0.15 M. Se prepararon disoluciones de LQM314 y de acetato de cobre (II) comenzando por una relación molar LQM/Cu de 5, a partir de los resultados se modificaron las concentraciones para obtener diversas relaciones molares. Se modificó también el número y volumen de inyecciones y los tiempos, para intentar obtener el mejor perfil en la isoterma de enlace.

Resultados y análisis de resultados

5. Especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en metanol

Se decidió trabajar en un medio de metanol porque es el disolvente utilizado para la síntesis del complejo Cu(II)-LQM314, llamado LQM406. Además uno de los inconvenientes de la especiación del compuesto LQM314 en agua es su baja solubilidad, por lo que se hace necesario el uso de otro disolvente para aumentar las concentraciones de trabajo y apreciar mejor los espectros de absorción y los máximos de absorbancia.

A partir de los espectros de absorción obtenidos en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 900 nm, se elaboraron gráficos absorbancia = f (longitud de onda) para observar la modificación de la absorbancia y la presencia de puntos isobésticos. A continuación se muestra los espectros obtenidos para el experimento de variaciones continuas (Fig. 5-1); se aprecia la presencia de un punto isobéptico a 420 nm, otro en 570 nm y un último aproximadamente a 710 nm. La presencia de estos puntos isobéuticos en el gráfico indica que se presenta al menos un equilibrio en el sistema, que involucra la formación de al menos un complejo.

Es importante mencionar que las bandas observadas en este intervalo de longitud de onda corresponden a las especies de cobre (II), que presenta un máximo de absorción que se desplaza conforme va aumentando la concentración de LQM314, se va recorriendo el máximo de 672 nm a 730 nm. Además, en los dos últimos sistemas se observa la presencia de un nuevo máximo de absorción a 430 nm, lo que indica la formación de una nueva especie a partir de Cu (II) y LQM314. El compuesto LQM314 no presenta absorbancia en el intervalo de longitud de onda estudiado (Sist 11).

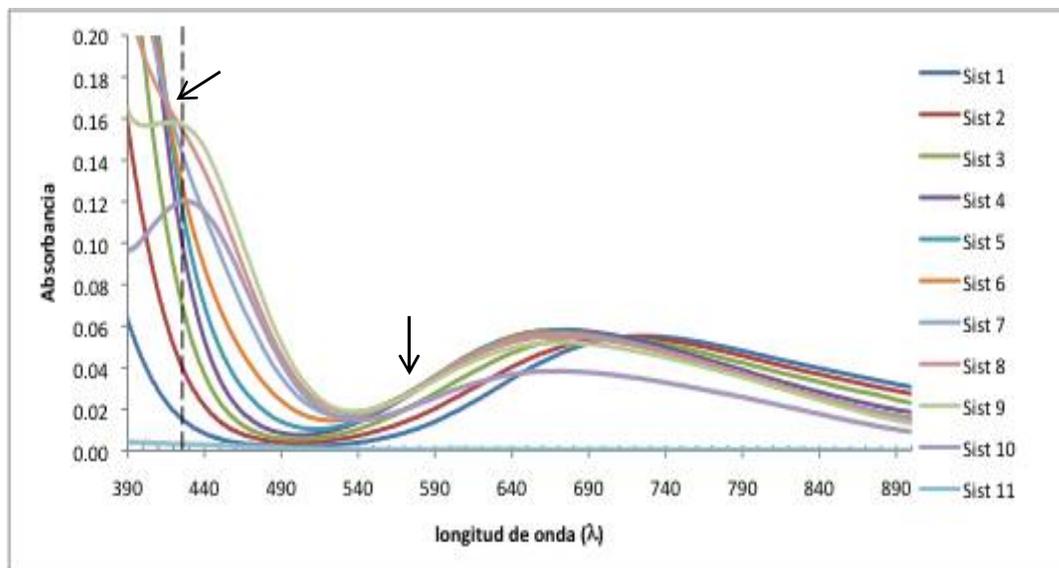


Fig. 5-1. Selección de espectros de absorción para variaciones continuas.
La línea punteada indica la longitud de onda utilizada para construir el gráfico típico.

A partir de los espectros de absorción también se construyó el gráfico típico para el método de variaciones continuas (Fig. 5-2), absorbancia = f (fracción molar de LQM314), tomando los valores de absorbancia a 426 nm (donde se encuentra el nuevo máximo). Se observan dos cambios evidentes de pendiente que indicarían la presencia de dos equilibrios. El primer cambio de pendiente que se encuentra del lado izquierdo del gráfico (fracción molar menor a 0.5) indicaría la

presencia de un compuesto polinuclear de cobre del tipo Cu_2LQM . El segundo cambio de pendiente se encuentra alrededor de 0.8, e indica la presencia de un compuesto del tipo CuLQM_3 o CuLQM_4 . Las posibles especies formadas serán confirmadas comparando estos gráficos típicos con los de relaciones molares y mediante el uso de los programas computacionales.

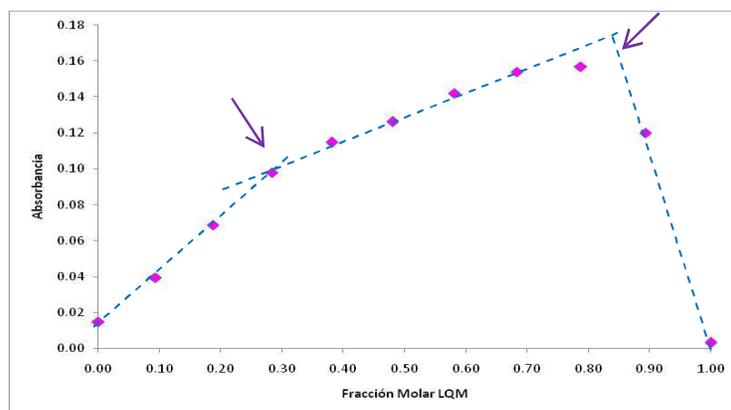


Fig. 5-2. Gráfico típico absorbancia en función de la fracción molar de ligante a 426 nm.

Para el método de relaciones molares manteniendo la cantidad de LQM314 fija, se muestra en la Fig. 5-3. Se aprecia la presencia de un punto isobéptico aproximadamente a 440 nm y otro a 520 nm. Estos puntos indican que se presenta al menos un equilibrio de intercambio de Cu(II) en el sistema, con lo que esperamos la formación de al menos un complejo.

Se observa también la formación de un nuevo máximo de absorción en los primeros sistemas a 430 nm, cuando se mantiene un exceso de LQM. El máximo de absorbancia debido al Cu(II) no se desplaza, lo que podría indicar que se mantiene la presencia de una de las especies CuLQM ya que no se alcanza un exceso de Cu(II) para observar su máximo de absorbancia a 720 nm.

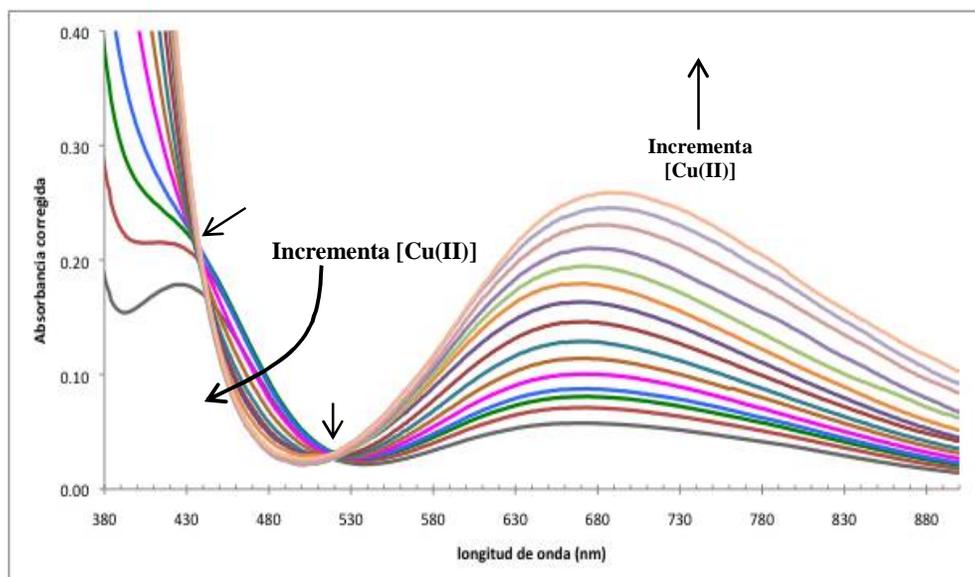


Fig. 5-3. Selección de espectros para relaciones molares a concentración de LQM314 fija.

A partir de los espectros de absorción, también se construyeron gráficos típicos del método de relaciones molares, absorbancia = $f(\text{relación molar Cu/LQM})$ (Fig. 5-4 y 5-5). Se tomaron los valores de absorbancia a 390 nm, longitud de onda que define el perfil del nuevo máximo (conforme cambia la absorbancia a esta longitud de onda se va perdiendo el perfil de máximo de

absorción), y los valores a 430 nm donde se encuentra el nuevo máximo de absorbancia. La figura 5-4 muestra un acercamiento a las zonas de los espectros correspondientes a estas longitudes de onda para apreciar mejor la tendencia de los valores de absorbancia.

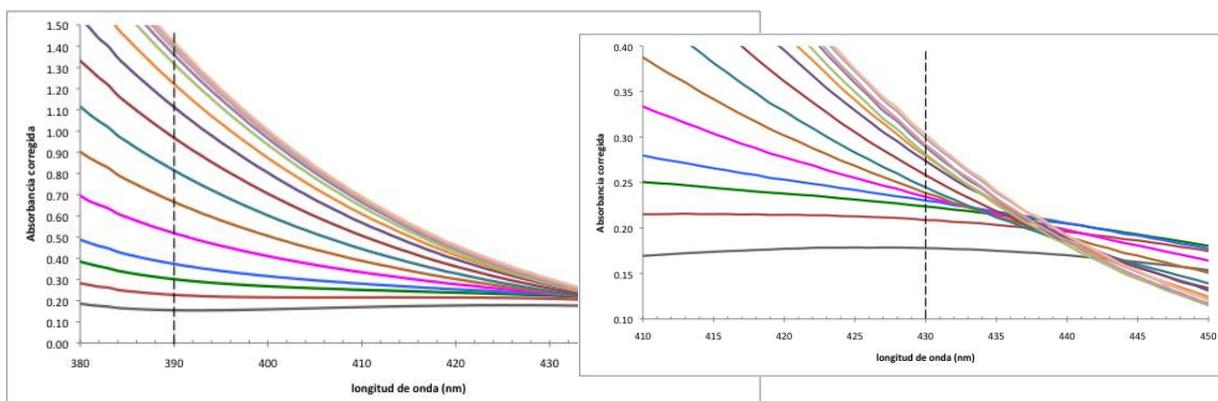


Fig. 5-4. Acercamiento a las zonas de los espectros de relaciones molares a concentración de LQM314 fija de 390 nm y 430 nm.

En el gráfico 5-5 se observa claramente el cambio de pendiente en 2.0, que corresponde a la formación del complejo $\text{Cu}_2\text{LQM314}$. En el gráfico 5-6 se observa un cambio de pendiente alrededor de 0.25, que correspondería al complejo CuLQM_4 o CuLQM_3 . También se observa otro cambio de pendiente entre la relación molar de 1.2 y la de 1.6, que podría corresponder al complejo CuLQM o a un complejo tipo Cu_3LQM_2 , sin embargo éste último no se observa en el gráfico típico de variaciones continuas (donde debería observarse el cambio de pendiente en 0.4).

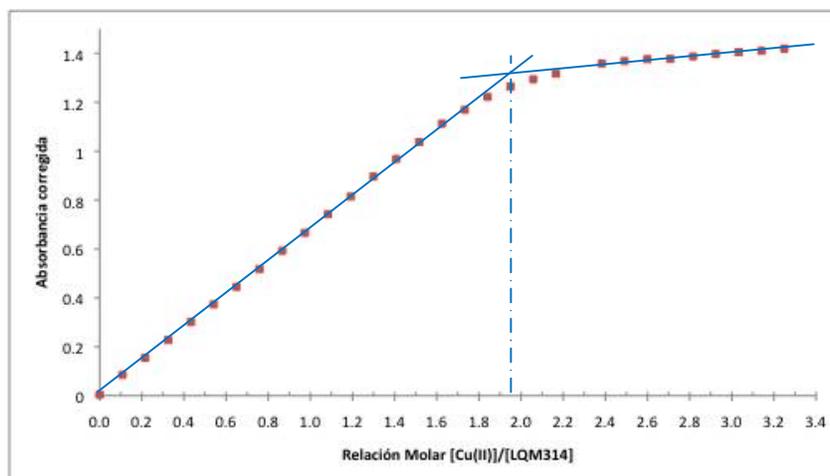


Fig. 5-5. Gráfico típico para relaciones molares a concentración de LQM314 fija a 390 nm.

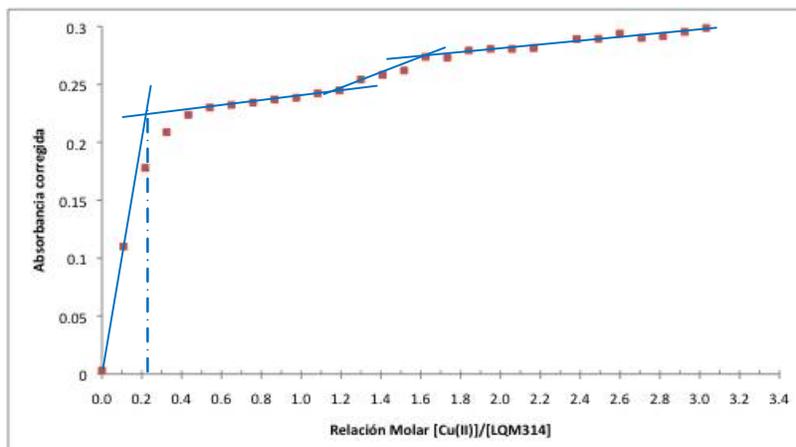


Fig. 5-6. Gráfico típico para relaciones molares a concentración de LQM314 fija a 430 nm.

Para el método de relaciones molares manteniendo la cantidad de Cu (II) fija, se muestra a continuación el gráfico absorbancia = f(longitud de onda) (Fig. 5-7). Se aprecia la presencia de un punto isobéptico aproximadamente a 382 nm. Se observa también la formación de un nuevo máximo de absorción en los últimos sistemas a 425 nm, cuando se mantiene un exceso de LQM.

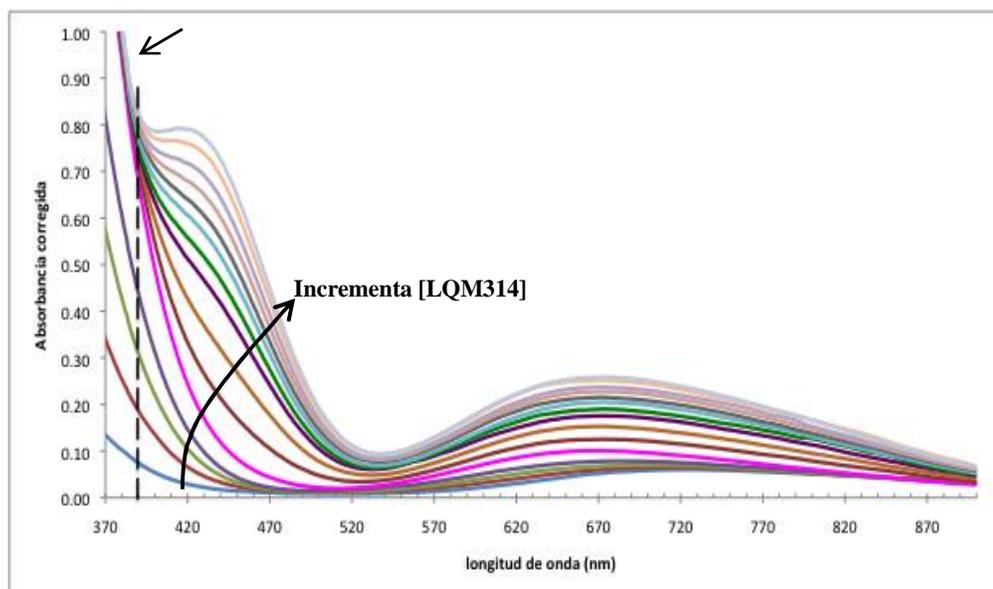


Fig. 5-7. Selección de espectros para relaciones molares a concentración de Cu (II) fija.

A partir de los espectros de absorción, también se construyeron gráficos absorbancia = f (relación molar LQM/Cu) (Fig. 5-8), a 390 nm se observan mejor los cambios de pendiente, uno de ellos se encuentra alrededor de 0.5 y otro alrededor de 2.1, que podrían corresponder a los complejos Cu_2LQM y CuLQM_2 .

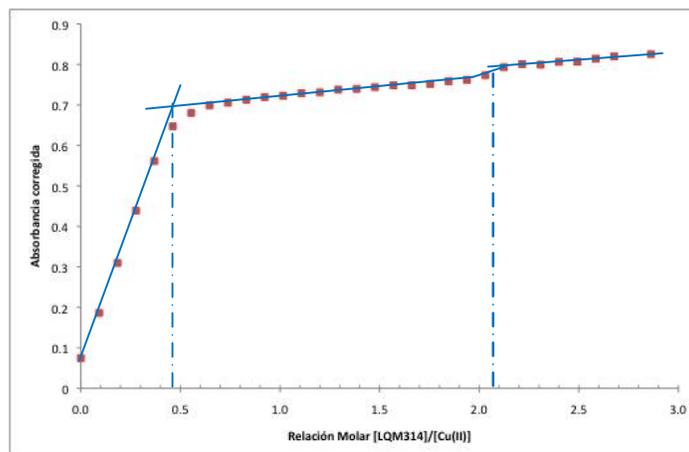


Fig. 5-8. Gráfico típico para relaciones molares a concentración de Cu (II) fija a 390 nm.

Del análisis de los gráficos típicos podemos concluir que se forman de dos a tres complejos entre Cu(II) y LQM314, las posibles estequiometrías de cada uno son: (1) Cu_2LQM , (2) CuLQM_3 , CuLQM_4 y (3) CuLQM , CuLQM_2 , los últimos sólo evidentes en relaciones molares a [LQM] fija y a [Cu(II)] fija respectivamente, por lo que no es muy probable que se encuentren presentes, sin embargo lo comprobaremos con el siguiente análisis.

Análisis de resultados con programas computacionales

Los datos de absorbancia obtenidos para cada método se introdujeron en los programas computacionales TRIANG y SQUAD.

El programa TRIANG calcula 3 especies presentes en el sistema, lo que confirma la existencia de dos equilibrios, es decir la formación de dos complejos entre Cu (II) y LQM314, ya que la tercera especie que absorbe en este intervalo de longitud de onda es el cobre libre; y tendremos dos valores de $\log \beta$. Estos resultados concuerdan con lo observado en los gráficos anteriores, que presentan dos cambios de pendiente evidentes, y nos indicaban la posibilidad de tener 3 especies involucradas en dos equilibrios en el sistema de trabajo.

A partir de los datos de TRIANG se propusieron diversos modelos químicos, incluyendo especies mononucleares y polinucleares de acuerdo a las observaciones en los gráficos típicos. A pesar de que TRIANG indica la presencia de dos complejos solamente, se proponen los Complejos de la primera columna de la Tabla 5-1. también, que son: CuLQM y CuLQM_2 , ya que se observan ligeramente en el gráfico de variaciones continuas y el de relaciones molares Cu fijo. Las especies propuestas son las siguientes:

Tabla 5-1. Complejos Cu(II)-LQM314 propuestos para la especiación en metanol.

Complejo 1	Complejo 2	Complejo 3
CuLQM	CuLQM_3	Cu_2LQM
Cu_2LQM_2	CuLQM_4	Cu_4LQM_2
CuLQM_2		
Cu_2LQM_4		

Se propusieron modelos de 3 equilibrios realizando las combinaciones de los complejos 1, 2 y 3; y modelos de dos equilibrios con combinaciones de los complejos 2 y 3 (éstos dos porque son los más evidentes en los gráficos típicos). Se propusieron también los dímeros de los complejos, excepto para los complejos 2.

Al programa SQUAD se alimentaron 18 espectros de absorción en un intervalo de longitud de onda de 389 nm a 895 nm, con valores de absorbancia a cada 11 nm. Para variaciones continuas se alimentaron 11 espectros.

Ya que los experimentos se realizaron por triplicado, el refinamiento de las constantes de equilibrio utilizando SQUAD también se realizó por triplicado, sin embargo sólo se muestra un valor para cada constante, tomando en cuenta que las reportadas son las que registraron mejores resultados estadísticos.

Para los modelos de 3 equilibrios se obtuvieron varios resultados con una suma de residuos (U) de 10^{-4} , sin embargo las desviaciones estándar de los $\log\beta$ que se obtuvieron son mayores al 1 % y los mejores modelos no convergen para los tres métodos de análisis (variaciones continuas y relaciones molares a LQM fijo y Cu fijo). Entonces, a falta de buenos resultados mediante SQUAD, se confirma la ausencia de los complejos de la primera columna de la Tabla 5-1 en el sistema, situación que se preveía con la falta de evidencia en algunos de los gráficos típicos.

Con lo anterior se confirma la presencia de dos equilibrios en el sistema, el mejor modelo para este caso se muestra en la Tabla 5-2:

Tabla 5-2. Resultados obtenidos por SQUAD para la especiación en metanol

Método	Modelo	$\log \beta$	\pm	σ_{Abs}	U
Variaciones Continuas	Cu ₂ LQM	10.2969	0.2249	1.8375E-3	1.2628E-3
	CuLQM ₃	12.0057	0.1153		
Relaciones Molares [LQM314] fija	Cu ₂ LQM	9.7864	0.0642	1.8591E-3	1.8591E-3
	CuLQM ₃	12.1713	0.0399		
Relaciones Molares [Cu(II)] fija	Cu ₂ LQM	9.6075	0.0461	1.0573E-3	7.8593E-4
	CuLQM ₃	13.1084	0.1053		

Los valores de los $\log\beta$ obtenidos para los diferentes métodos son similares, y la estadística es buena. Además se realizaron tres experimentos independientes y para los tres obtenemos resultados similares con el mismo modelo.

El archivo de salida de SQUAD provee también los coeficientes de absorptividad molar refinados de las especies que absorben radiación electromagnética en el sistema. Ya que el ligante LQM314 no es una especie de este tipo, se fijó con absorbancia cero. Los gráficos de coeficiente de absorptividad molar=f(longitud de onda) (Fig. 5-9) muestran tres diferentes trayectorias que corresponden a cada una de las especies absorbentes: Cu (II), y los complejos CuLQM₃ y Cu₂LQM. Lo que confirma y da soporte a los resultados obtenidos hasta ahora para la especiación en metanol: tres especies, involucradas en dos equilibrios, que dan lugar a la formación de dos complejos Cu(II)-LQM314. Observamos también en el siguiente gráfico, que el máximo de absorbancia que se encuentra a 422

nm corresponde al complejo CuL_3 , que es el máximo encontrado en los sistemas con exceso de LQM314, es decir, teniendo ahora el gráfico de absorptividades molares refinadas, podemos concluir que el nuevo máximo de absorbancia encontrado en éstos sistemas, corresponde al complejo 1:3.

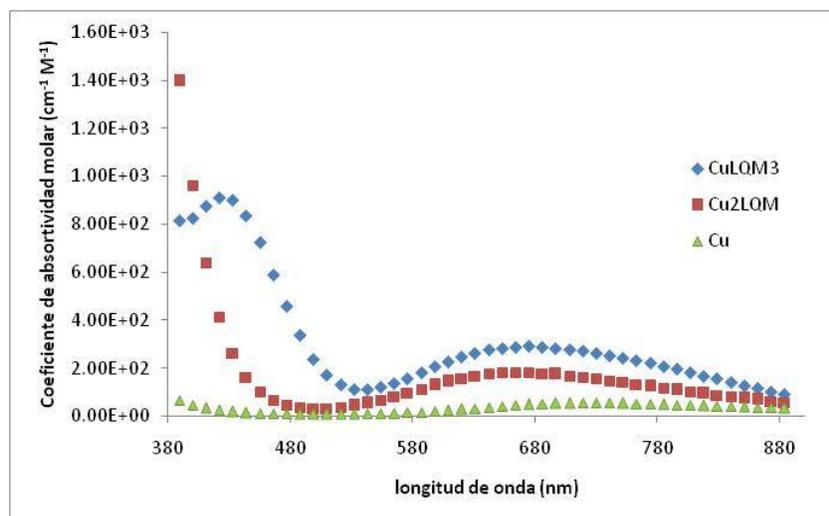


Fig. 5-9. Coeficientes de absorptividad molar refinados para las especies Cu(II)-LQM314 .

Se construyeron además los gráficos comparativos de los espectros de absorción experimentales y estimados con los datos refinados por SQUAD. Los perfiles se observan superpuestos por lo que se comprueba que el modelo y sus resultados sí explican el comportamiento experimental. Los gráficos se muestran en la figura 5-10.

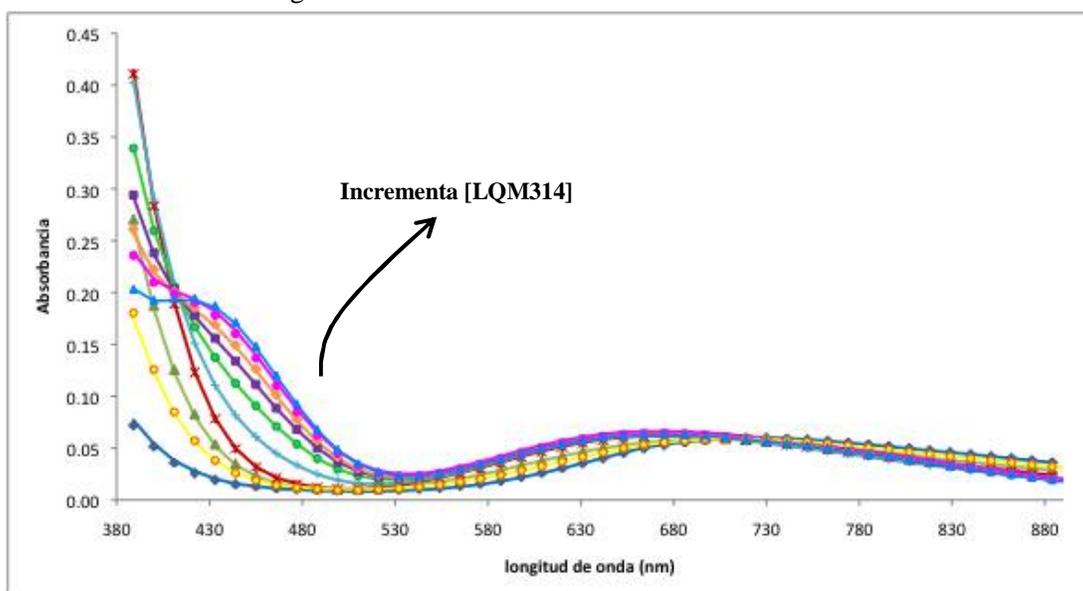


Fig. 5-10. Espectros de absorción experimentales (línea continua) y estimados con los datos de SQUAD (marcadores).

Una vez refinadas las constantes de formación, se construyeron los diagramas de distribución de especies con ayuda del programa Medusa. Estos diagramas son muy utilizados y son una representación gráfica de fracciones de las especies de un sistema en función de una variable principal, como en éste caso $[\text{Cu(II)}]$ o $[\text{LQM314}]$. A partir de estos diagramas se obtiene

información sobre la contribución de cada una de las especies a la composición total del sistema e ilustran el proceso de formación de complejos. Para estas representaciones se utilizaron los valores de las constantes de equilibrio obtenidas para el método de relaciones molares a $[Cu(II)]$ fija ya que muestran la mejor estadística.

La figura 5-11 muestra el diagrama de distribución de especies de LQM314 a $[Cu(II)]$ constante, siendo la $[Cu(II)] = 10^{-3}$ M y $[LQM314] = 0.0$ M a 3×10^{-3} M. Se observa que el compuesto polinuclear está presente hasta en un 100 % a concentraciones de LQM314 bajas; y conforme va aumentando la concentración de LQM314 va aumentando la formación del compuesto $CuLQM_3$ hasta alcanzar el 90 %.

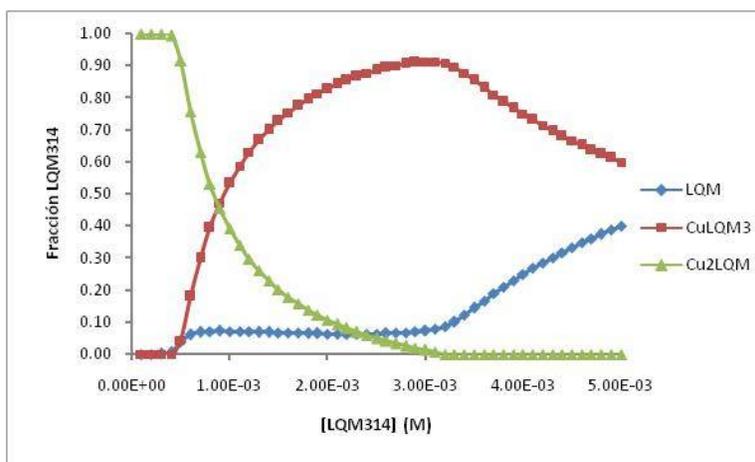


Fig.5-11. Diagrama de distribución de especies de LQM314 a concentración de $Cu(II)1 \times 10^{-3}$ M.

En la figura 5-12 se grafican las especies de $Cu(II)$ a $[Cu(II)] = 10^{-3}$ M y $[LQM314] = 0.0$ M a 3×10^{-3} M. Se observa la desaparición gradual del $Cu(II)$ libre y el aumento primero en la formación del compuesto polinuclear hasta alcanzar un máximo de 90 %, y luego del compuesto 1:3, que llega a estar presente también en un 90% a la concentración de 3×10^{-3} M de LQM314.

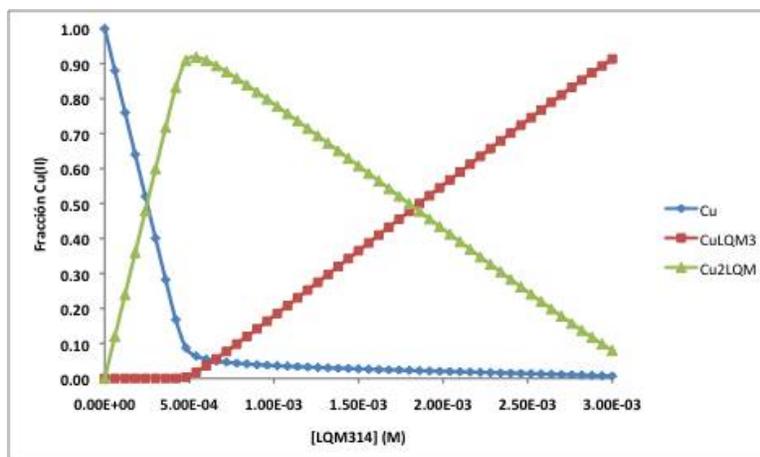


Fig. 5-12. Diagrama de distribución de especies de $Cu(II)$ a concentración de $Cu(II)1 \times 10^{-3}$ M.

La Fig. 5-13 corresponde al Diagrama de Distribución de Especies de Cu(II) a $[LQM314] = 10^{-3} \text{ M}$ y $[Cu(II)] = 0.0 \text{ M}$ a $3 \times 10^{-3} \text{ M}$. El complejo $CuLQM_3$ se forma inmediatamente al agregar Cu(II), es decir cuando hay exceso de LQM314, y va desapareciendo conforme se agrega cobre ya que va siendo desplazado por el complejo polinuclear, que llega a estar presente en un máximo de 90%. En este máximo parece que se saturan todos los sitios de unión del LQM314, ya que después la fracción de la especie polinuclear empieza a disminuir y la de cobre libre empieza a aumentar ya que lo que se va agregando ya no forma parte de más complejo y se va acumulando como cobre libre. No hay, a estas concentraciones mayores de cobre, complejo $CuLQM_3$ ya que al haber exceso de cobre se favorece la formación de la especie Cu_2LQM .

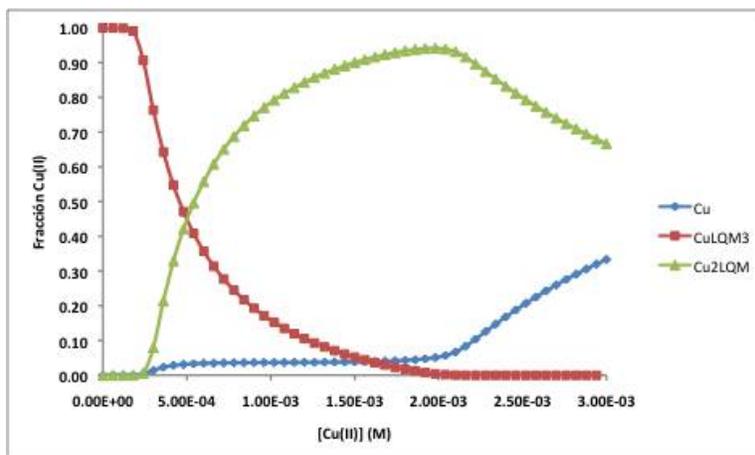


Fig. 5-13. Diagrama de distribución de especies de Cu(II) a concentración de LQM314 de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

La Fig. 5-14 muestra el diagrama de distribución de especies de LQM314 a $[LQM314] = 10^{-3} \text{ M}$ y $[Cu(II)] = 0.0 \text{ M}$ a $3 \times 10^{-3} \text{ M}$. La fracción de LQM314 va disminuyendo conforme aumenta la concentración de Cu(II), ya que se van formando los complejos. El complejo $CuLQM_3$ alcanza un máximo de 80 % antes de empezar a ser desplazado por la especie polinuclear, a mayores concentraciones de Cu(II), ésta especie llega a presentarse hasta en un 100 %.

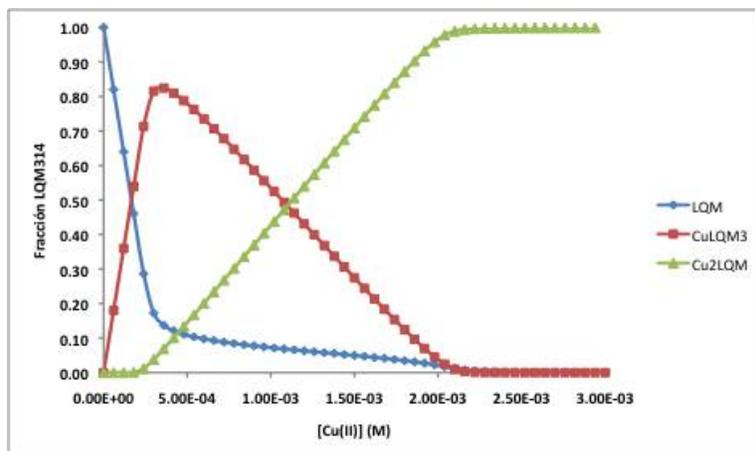


Fig. 5-14. Diagrama de distribución de especies de LQM314 a concentración de LQM314 10^{-3} M .

Los diagramas de distribución de especies muestran la presencia de los complejos Cu_2LQM y CuLQM_3 en diferentes condiciones de concentración en más del 80 %, lo que nos lleva a concluir que el modelo químico propuesto para la especiación en metanol es adecuado ya que se comprueba la existencia y prevalencia, bajo ciertas condiciones de concentración, de los complejos.

Para el método de variaciones continuas no es posible obtener un diagrama de distribución de especies como los anteriores, ya que ambas concentraciones (metal y ligante) son diferentes en cada sistema. Por lo tanto, para visualizar la distribución de las especies, se construyeron diagramas de distribución de especies de fracción mol como distribución de variables discontinuas (coeficientes estequiométricos del metal y el ligante), que son diagramas tridimensionales (Moya-Hernández, 1997). Estos diagramas se construyen con los datos de fracción mol para cada especie calculados por Medusa al imponer ciertas concentraciones metal y ligante.

Se muestran a continuación éstos diagramas de distribución para el Sistema 1, 5 y 9 de variaciones continuas (Fig. 5-15).

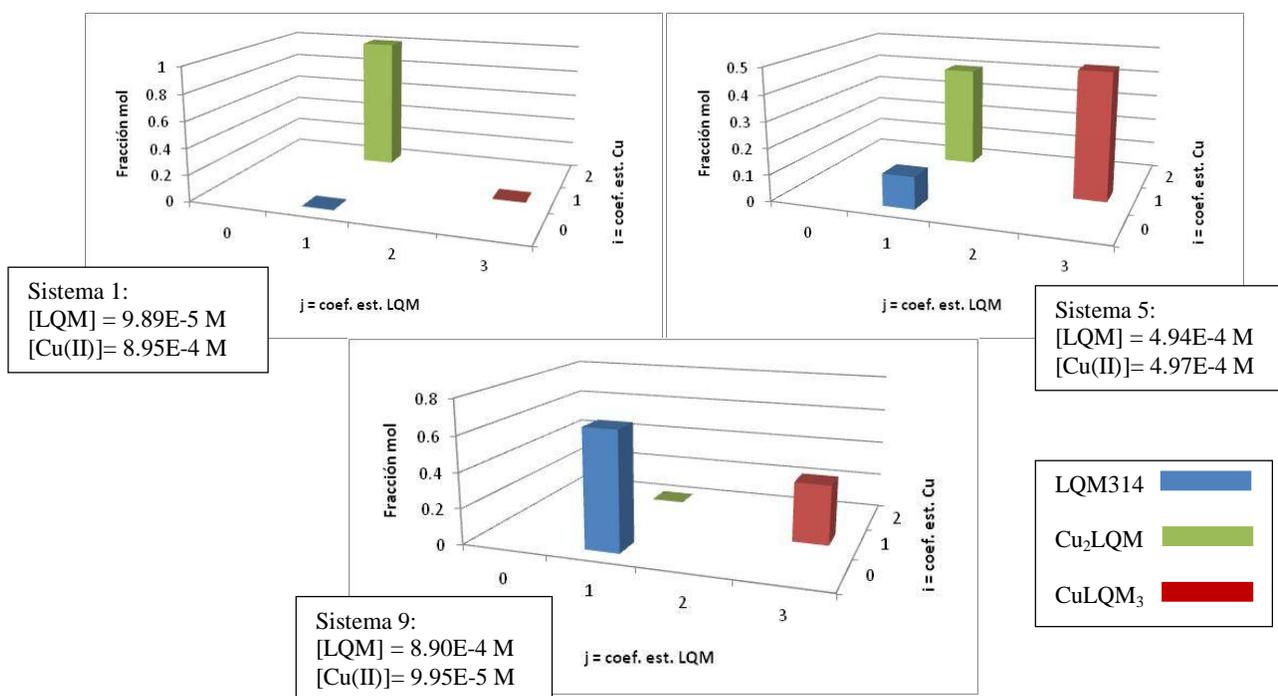


Fig. 5-15. Diagramas de distribución de especies de LQM314 de fracción mol como distribución de variables discontinuas (coeficientes estequiométricos)

Para el Sistema 1, donde es mucho menor la concentración de LQM314 que de Cu (II) se observa claramente la prevalencia del complejo polinuclear (barra verde). Conforme va aumentando la concentración de LQM, el complejo CuLQM_3 va desplazando al complejo polinuclear, hasta llegar al Sistema 9 (donde la concentración de LQM es mayor que la de Cu (II)) en que el complejo CuLQM_3 desplaza completamente al complejo Cu_2LQM , aunque hay también una gran cantidad de LQM libre debido al exceso de éste que no puede complejarse con cobre porque ya no hay suficiente.

El hecho de que el complejo CuLQM_3 predomine a concentraciones de LQM elevadas confirma la identidad del máximo de absorbancia a 430 nm observado en los espectros de absorción. Que efectivamente se presenta en sistemas con exceso de LQM sobre Cu (II). Éste máximo de absorbancia pertenece al complejo CuLQM_3 .

En la figura 5-16 se muestran los diagramas de distribución de especies de Cu(II):

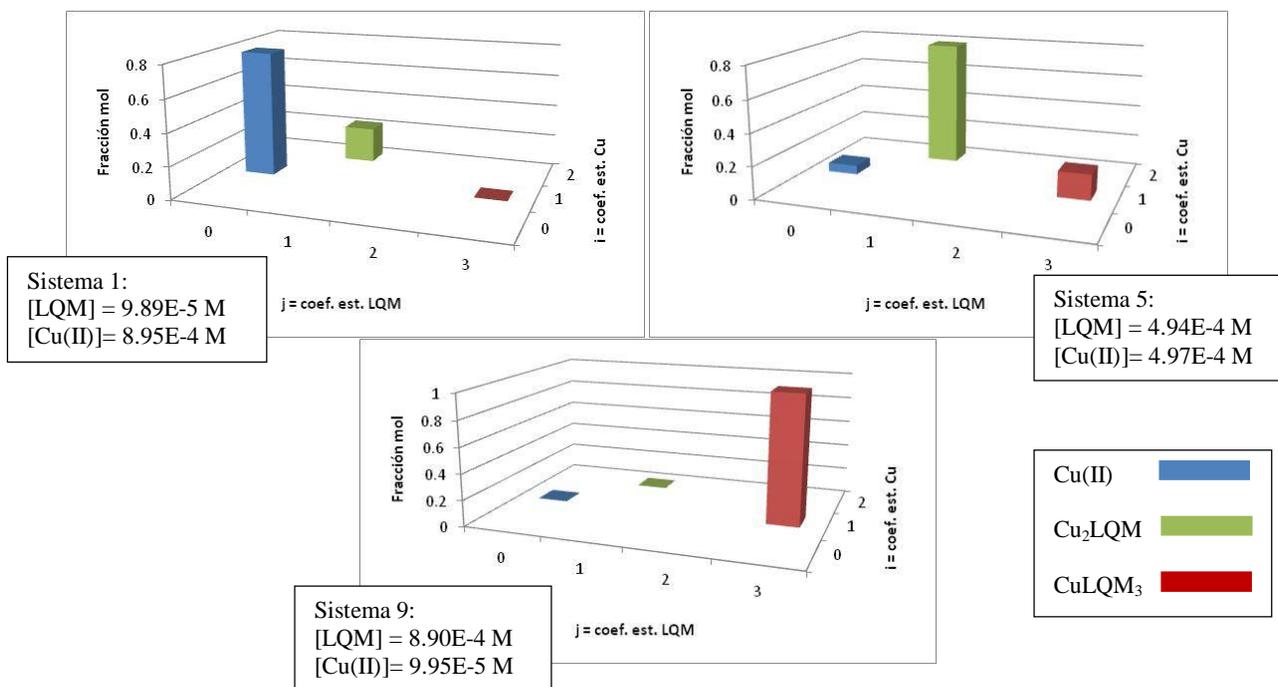


Fig. 5-16. Diagramas de distribución de especies de Cu (II) de fracción mol como distribución de variables discontinuas (coeficientes estequiométricos)

Para los diagramas similares de las especies de cobre se observa que a concentraciones pequeñas de LQM (Sistema 1) la formación de los complejos es posible en un grado muy pequeño, y la especie que comienza a formarse es la polinuclear, ya que hay exceso de cobre. Conforme aumenta la cantidad de LQM se van formando los dos complejos y va disminuyendo la fracción de cobre libre. En un sistema con exceso de LQM sobre Cu (II) como el Sistema 9, prevalece el complejo CuLQM_3 agotando el cobre libre.

Cabe destacar nuevamente que se llevaron a cabo 3 experimentos independientes, y que, a pesar de que no se muestran los resultados para cada uno de ellos, éstos fueron muy similares entre sí.

6. Especiación de cobre (II) con el compuesto LQM314 en agua

a) Determinación de las constantes de acidez del compuesto LQM314 bajo las condiciones de trabajo utilizadas para la especiación con cobre (II)

Las constantes de acidez del compuesto LQM314 fueron determinadas por Aguilar-Hernández, 2012, pero no a las condiciones experimentales con las que se trabajó la especiación en este proyecto, por lo tanto se realizó nuevamente la determinación a las nuevas condiciones experimentales. Se obtuvieron perfiles de los espectros de absorción muy similares a los obtenidos por Aguilar-Hernández, lo que indica que no afecta en gran medida el cambio de las condiciones experimentales a los valores de pK_a 's del LQM314. Sólo se observa un cambio evidente a longitudes de onda de 220 nm a 250 nm, ya que para este experimento las absorbancias no son tan altas en el intervalo de longitud de onda como en el experimento anterior. A continuación se muestran los espectros obtenidos en la valoración a diferentes intervalos de pH (Fig. 6-1 a 6-3).

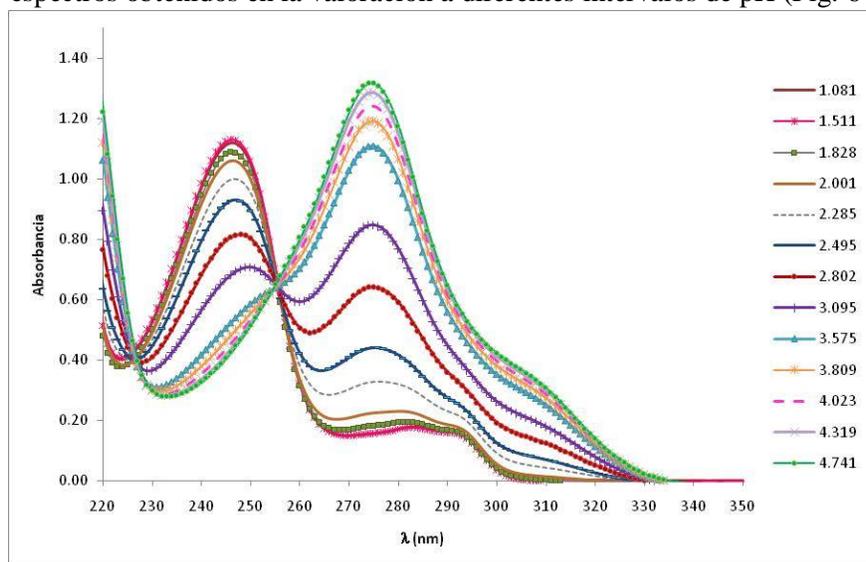


Fig. 6-1. Espectros de absorción obtenidos en la valoración del compuesto LQM314 a las condiciones de trabajo de la especiación, pH 1.081 - 4.741.

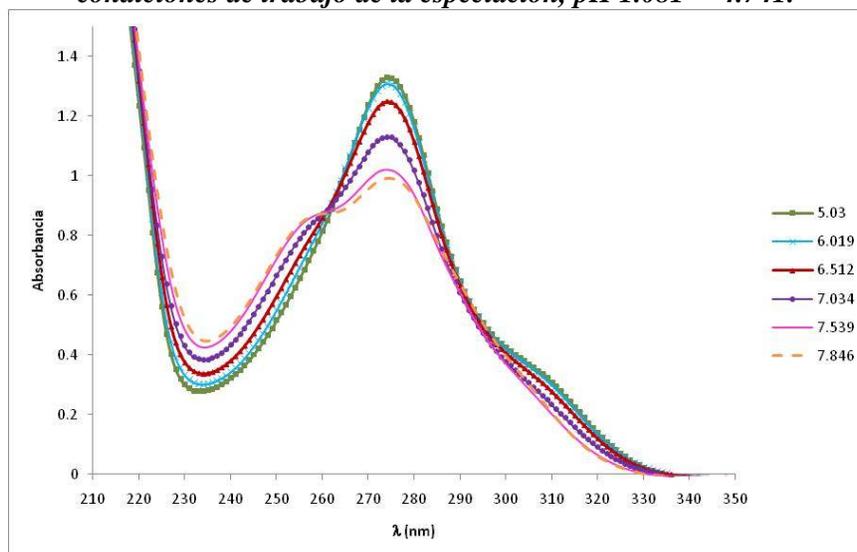


Fig. 6-2. Espectros de absorción obtenidos en la valoración del compuesto LQM314 a las condiciones de trabajo de la especiación, pH 5.030 - 7.846.

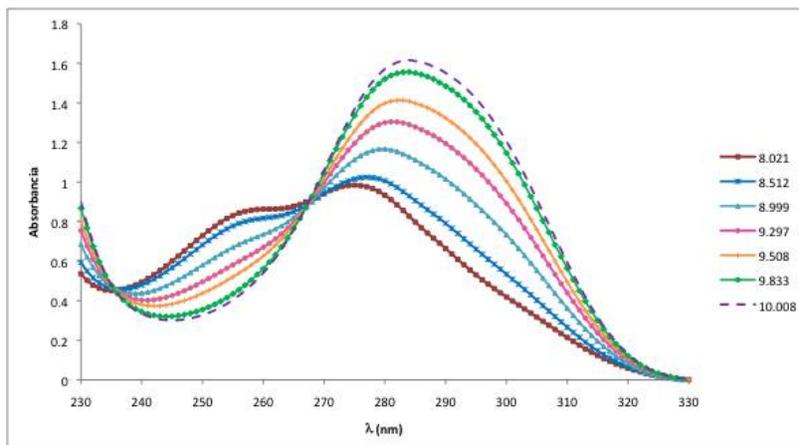


Fig. 6-3. Espectros de absorción obtenidos en la valoración del compuesto LQM314 a las condiciones de trabajo de la especiación, pH 8.021– 10.008.

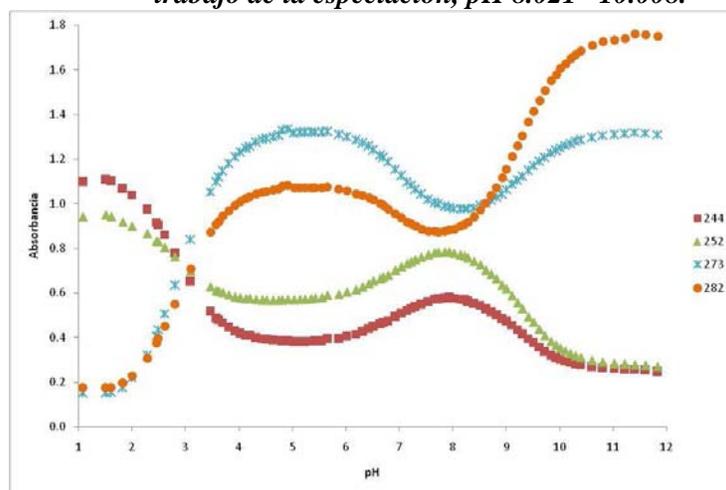


Fig. 6-4. Gráfico absorbancia = f(pH) a determinadas longitudes de onda pH 1.081 – 12.009.

En el gráfico absorbancia = f(pH) (Fig. 6-4) se observan también tres cambios de pendiente: pH 2.5-3, pH 6-7 y alrededor de pH 9. Con el programa SQUAD se refinaron las constantes de acidez, en el archivo de entrada se trabajó con 23 espectros y datos de absorbancia en un intervalo de longitud de onda de 224 nm a 332 nm cada 3 nm. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6-1. Valores de las constantes de formación obtenidos para el compuesto LQM314 bajo las condiciones de trabajo.

Equilibrio	log β		pKa	$\sigma_{\text{Datos Abs}}$	U
$LQM^- + H^+ = HL$	9.2299	\pm 0.0047	9.2299	1.01088-02	7.1236E-02
$LQM^- + 2H^+ = H_2L^+$	16.1301	\pm 0.0138	6.9002		
$LQM^- + 3H^+ = H_3L^{2+}$	19.0689	\pm 0.0136	2.9388		

Mediante el programa computacional MEDUSA se construyó el diagrama de distribución de especies de LQM.

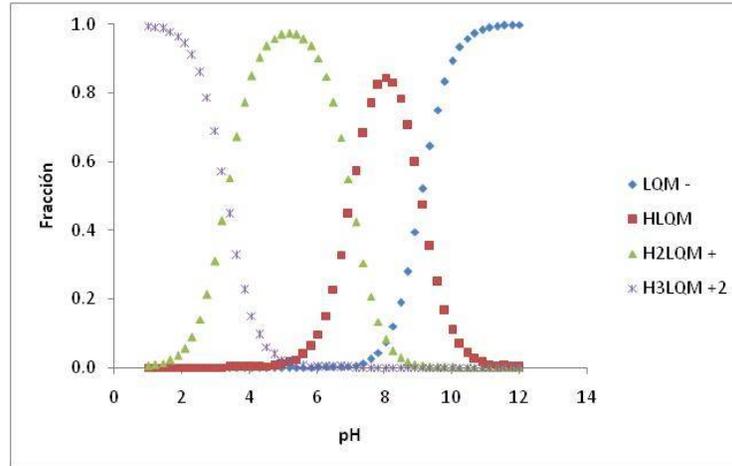


Fig. 6-5. Diagrama de distribución de especies de LQM en función del pH.

Estos valores son los que se utilizarán en el análisis de resultados para la especiación en agua. La comparación entre los valores de las constantes de acidez calculadas por Aguilar-Hernández y las determinadas durante el presente proyecto, a las mismas condiciones experimentales, se muestran en el anexo 1.

b) Especiación química de Cu(II) con el compuesto LQM314

Para la especiación química en agua se trabajó en la zona de absorción del LQM, debido a las bajas concentraciones que se deben mantener en el sistema por la baja solubilidad del compuesto.

b.1) Especiación en agua a pH fijo

Las disoluciones para estos procedimientos se prepararon a un pH aproximado al que se deseaba imponer y sin amortiguar. Debido a esta condición varió el pH a lo largo de los experimentos, la modificación más grande se presentó para los experimentos a pH 5 en el que los cambios fueron de aproximadamente 1.2 unidades. Los experimentos a pH 8 y pH 10 mostraron cambios de 0.3 a 0.7 unidades. Debido a estas variaciones se procedió a evaluar la validez de esta parte de la especiación en agua para comprobar, de acuerdo al comportamiento ácido-base del ligante, que el pH se mantiene en la zona de predominio de la especie LQM presente de acuerdo a las condiciones impuestas. Para ello se recurrió al diagrama de distribución de especies de este compuesto, que se muestra nuevamente en la figura 6-6, y se indican en zonas sombreadas las variaciones de pH en cada uno de los experimentos. Se observa que las especies predominantes siguen siendo las mismas en cada caso, incluso a pH ~5 donde se tuvo el mayor cambio. Por lo tanto estas variaciones en el pH se consideran válidas a pesar de haber cambios hasta de 1.2 unidades, y se puede confirmar que la interpretación de los resultados es válida.

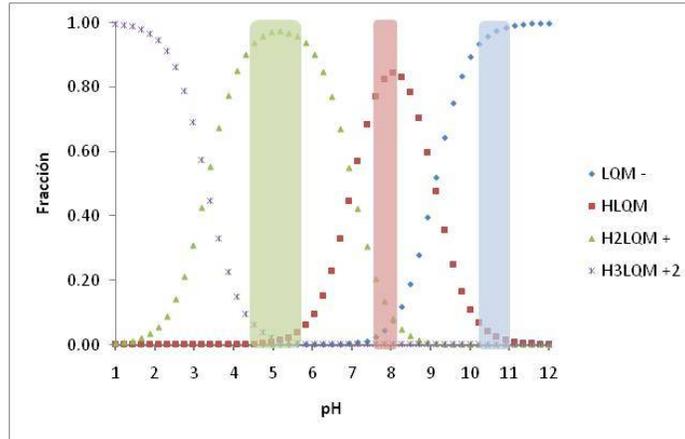


Fig. 6-6. Representación de las variaciones en el pH para la especiación en agua a pH 5, 8 y 10 en el diagrama de distribución de especies de LQM.

pH 5

El experimento de variaciones continuas no da información relevante ya que no se observan los cambios de pendiente en el gráfico típico.

Los espectros para **relaciones molares a [LQM314] fija** a 6.36×10^{-5} M (Fig. 6-6) no muestran cambios en las longitudes de onda de absorbancia máxima, permanecen casi constantes, excepto por el mínimo de absorbancia a 234 nm que presenta un efecto hipercrómico con la adición de la disolución de cobre (II); también se nota este efecto en el máximo de absorbancia a 274 nm, aunque menos marcado, aunque podría deberse este cambio gradual en la absorbancia a los cambios de pH durante el experimento. No se observa la presencia de puntos isobésticos. Pero el aumento en la absorbancia en las longitudes de onda marcadas indican que sí hay interacción química entre el compuesto LQM314 y Cu(II).

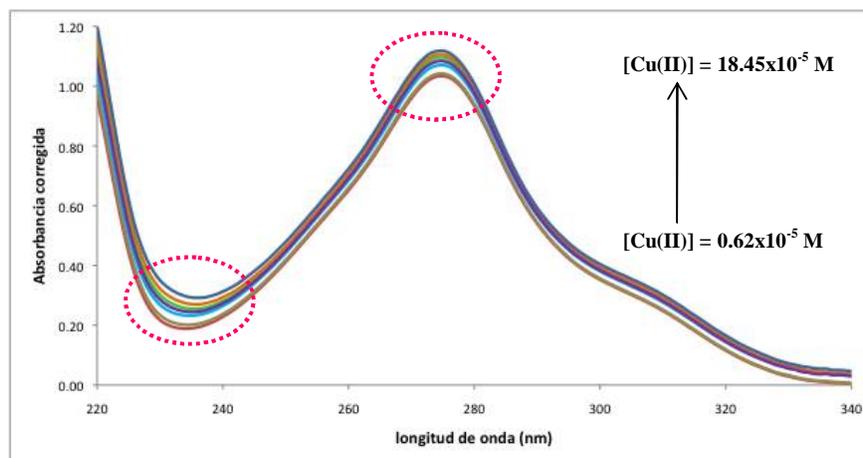


Fig. 6-7. Selección de espectros para relaciones molares a $[LQM314]=6.36 \times 10^{-5}$ M, a pH 5.273.

El gráfico típico se construyó a 234 nm (Fig. 6-7) y presenta un notable cambio de pendiente en la relación molar 1.0.

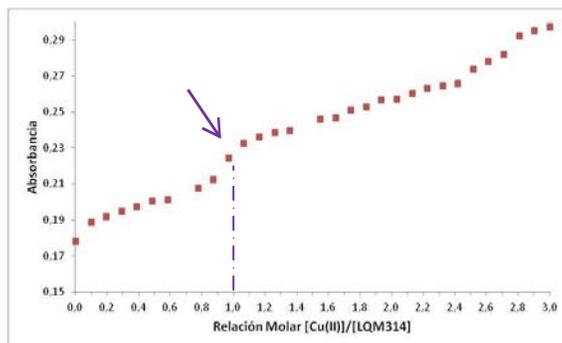


Fig. 6-8. Gráfico típico para relaciones molares a $[LQM314]=6.36 \times 10^{-5} M$, pH 5.273, 234 nm.

De acuerdo a la Figura 6-7 el cambio de pendiente se encuentra en la relación molar Cu/LQM = 1.0, lo que indica que tenemos un complejo que contiene un mol de cobre por cada mol de LQM, es decir el complejo 1:1 CuLQM.

Para el experimento de **relaciones molares a $[Cu(II)]$ fija** a $6.33 \times 10^{-5} M$ (Fig. 6-8) tampoco se observan cambios en las longitudes de onda de los máximos de absorbancia, sólo se observa el efecto hiperocrómico en general debido a la adición de la especie LQM314, que es la que absorbe principalmente en el intervalo de longitud de onda de 230 nm a 340 nm.

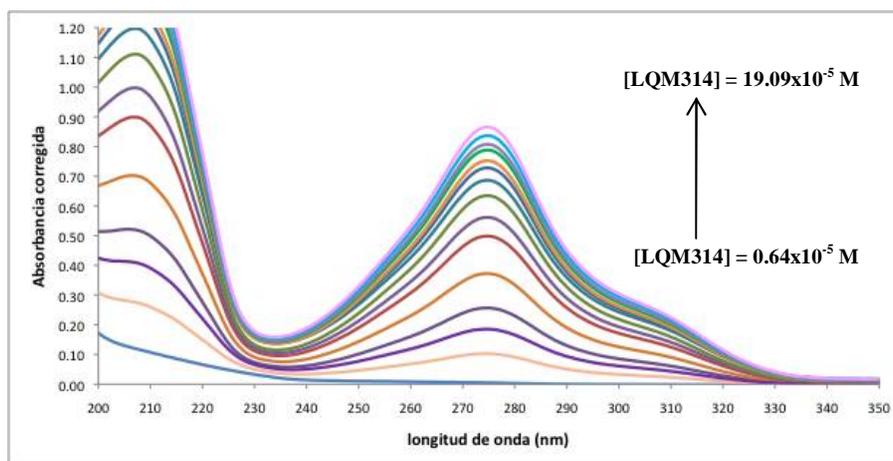


Fig. 6-9. Selección de espectros para relaciones molares a $[Cu(II)]=6.33 \times 10^{-5} M$, a pH 5.770.

El gráfico típico se construyó tomando en cuenta las mismas longitudes de onda que para relaciones molares a $[LQM314]$ fija. El gráfico absorbancia = $f(\text{relación molar } [LQM314]/[Cu(II)])$ a 234 nm muestra un cambio de pendiente alrededor 1.4 que podría corresponder a la formación de un complejo polinuclear, y otro cambio alrededor de 1.9 que podría indicar la formación del complejo $Cu(LQM)_2$.

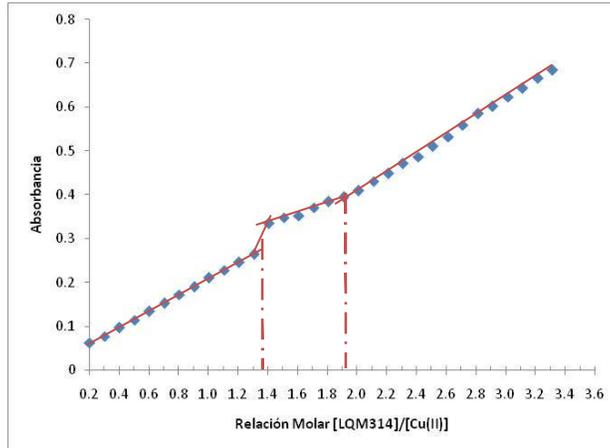


Fig. 6-10. Gráfico absorbancia = f (relación molar $[LQM314]/[Cu(II)]$) para relaciones molares a $[Cu(II)]=6.33 \times 10^{-5} M$, pH 5.770, 234 nm.

pH 8

De la misma manera que para pH 5, el experimento de variaciones continuas no da información porque no se observan claramente los cambios de pendiente en el gráfico típico.

Para relaciones molares a $[LQM314]$ fija de $6.24 \times 10^{-5} M$ (Fig. 6-10) se observa un efecto hipercrómico general, ya que la línea base aumenta su absorbancia, esto debido a presencia de precipitado, aún así es notorio el efecto hipercrómico del mínimo a 235 nm.

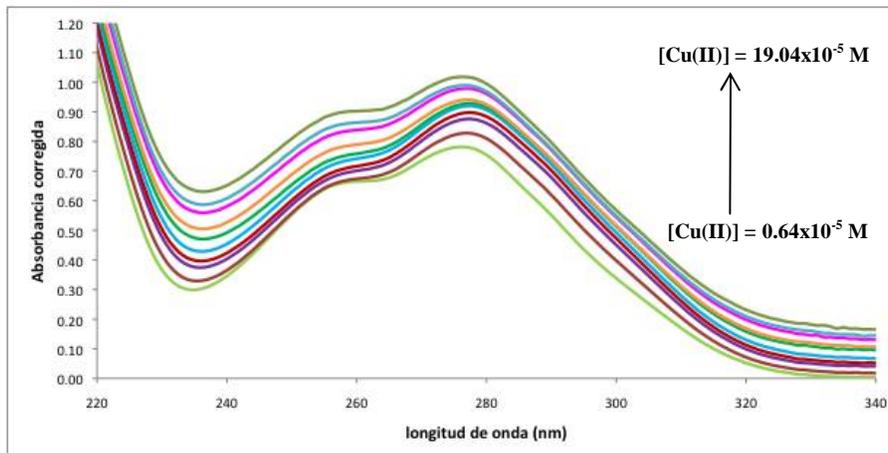


Fig. 6-11. Selección de espectros para relaciones molares a $[LQM314]=6.24 \times 10^{-5} M$, a pH 7.580.

Los gráficos típicos se construyeron a la longitud de onda de mínima absorbancia de 235 nm, y a las longitudes de absorbancia máxima 258 nm y 277 nm. Las figuras 6-11a y 6-11b corresponden a los gráficos absorbancia= f (relación molar $[Cu(II)]/[LQM314]$) donde se observan cambios de pendiente aproximadamente a la relación molar de 2 a 235 nm y 277 nm, y otro cambio en la relación molar de 0.5 a 277 nm; con estas observaciones se deduce la formación de los complejos Cu_2LQM y $Cu(LQM)_2$. La figura 6-11c muestra tres cambios de pendiente en el gráfico absorbancia= f (relación molar $[LQM314]/[Cu(II)]$) a 258 nm, en 0.5, 1 y 2, con lo que se comprueba la formación de los complejos Cu_2LQM y $CuLQM_2$ y se indica además la formación de la especie $CuLQM$.

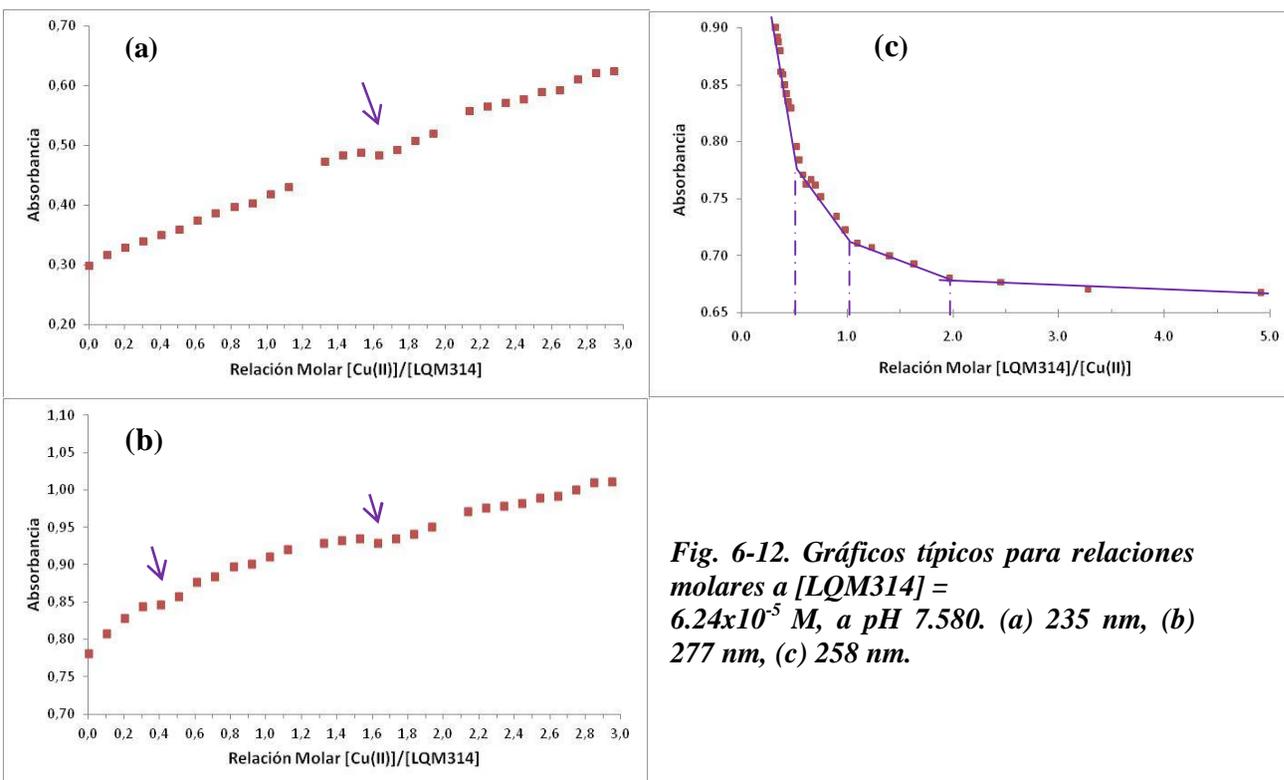


Fig. 6-12. Gráficos típicos para relaciones molares a [LQM314] = 6.24×10^{-5} M, a pH 7.580. (a) 235 nm, (b) 277 nm, (c) 258 nm.

Para el experimento de *relaciones molares a [Cu(II)] fija* a 6.53×10^{-5} M se observan un comportamiento muy similar al experimento a pH 5, los gráficos típicos no aportan información relevante sobre el sistema.

pH 10

Para *relaciones molares a [LQM314] fija* de 6.30×10^{-5} M (Fig. 6-12) se observa un efecto hipercrómico general ya que la línea base aumenta su absorbancia, esto debido a presencia de precipitado, aún así es notorio el efecto hipercrómico de 200 nm a 220 nm, que corresponde al aumento en la absorbancia debida a la adición de Cu(II).

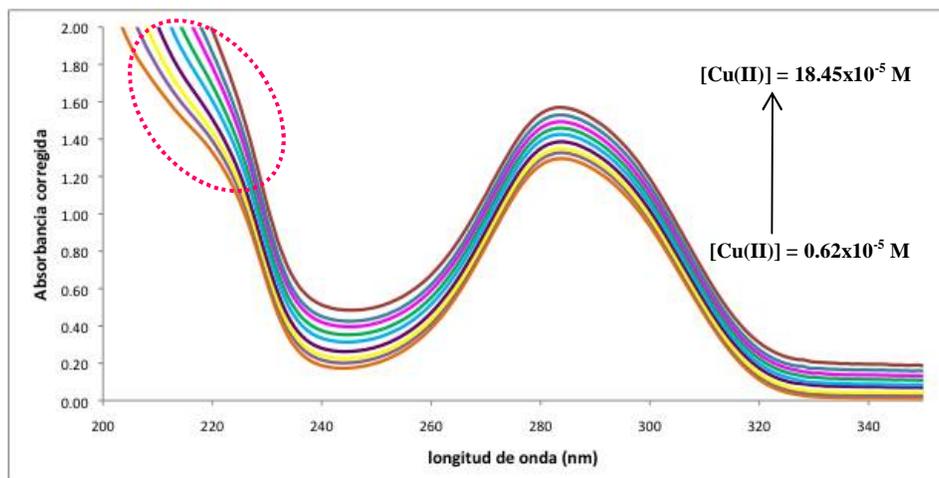


Fig. 6-13. Selección de espectros para relaciones molares a $[LQM314]=6.30 \times 10^{-5} M$, a pH 10.269.

Para el experimento de *relaciones molares a $[Cu(II)]$ fija* a $6.33 \times 10^{-5} M$ (Fig. 6-13) no se observan cambios en las longitudes de onda de los máximos de absorbancia, sólo se observa el efecto hipercrómico en general debido a la adición de la especie LQM314.

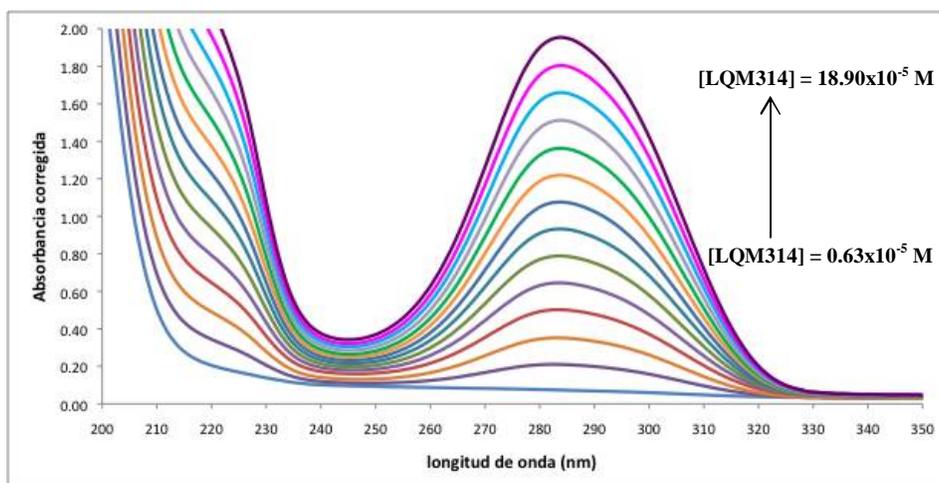


Fig. 6-14. Selección de espectros para relaciones molares a $[Cu(II)]=6.33 \times 10^{-5} M$, a pH 10.838.

Los gráficos típicos a pH 10 muestran la presencia de los complejos encontrados a pH 5 y 8.

b.2) Especiación en agua a relaciones molares fijas

Con los resultados anteriores a pH fijo se logró concluir que los complejos formados son: CuLQM, Cu(LQM)₂ y Cu₂LQM, por lo tanto éstas fueron las relaciones molares que se trabajaron para el siguiente experimento, que consiste en la preparación de disoluciones a determinadas relaciones molares Cu(II)-LQM y la medición de sus espectros de absorción en función del pH.

Ya que la especie que absorbe principalmente en medio acuoso es el compuesto LQM314 los espectros obtenidos se parecen a los de la valoración ácido-base del compuesto; se compararon entonces los espectros obtenidos en este experimento con los del LQM314 solo, obtenidos en la determinación de las constantes de acidez de dicho compuesto para evidenciar algún cambio en los perfiles. Principalmente se encuentran cambios entre 220 nm y 260 nm, se observan diferencias en los puntos isobéuticos de unos 2 a 5 nm, desplazamientos en los mínimos y máximos de absorbancia de 3 nm y hasta de 10 nm, siendo algunos desplazamientos batocrómicos consecuencia del ensanchamiento del mínimo de absorbancia. Además se observan efectos hipercrómicos debidos a la mayor cantidad de LQM presente en el sistema (relación molar Cu(LQM)₂), e hipsocrómicos en los sistemas Cu₂LQM.

En la figura 6-14 se muestra una selección de figuras comparativas, en las que se observan las diferencias citadas anteriormente. Las figuras (a) y (b) corresponden a las relaciones molares Cu(II)-LQM 1:1 y 1:2 a pH 5-7, se observan los desplazamientos batocrómicos en el primer mínimo de absorbancia debidos al ensanchamiento de la banda y además una mejor definición en el hombro a pH ~ 7 para las mezclas Cu(II)-LQM. Las figuras (c), (d) y (e) muestran los espectros de las 3 relaciones molares trabajadas, de pH 8 a 10, al igual que para pH 5-7 se muestran las diferencias en las longitudes de onda del primer mínimo de absorbancia que es consecuencia también del ensanchamiento de la banda; a diferencia de las figuras (a) y (b) los hombros en los espectros de LQM (líneas punteadas) son más definidos que para las mezclas, llegando a desaparecer como en la figura (e).

Estos resultados comprueban que existe una interacción química entre el LQM314 y Cu(II) ya que los espectros muestran diferencias entre sí, estas diferencias en los perfiles de cada una de las relaciones molares trabajadas nos dan un indicio de la formación de los complejos. Para comprobarlo se realizó el análisis con los programas computacionales.

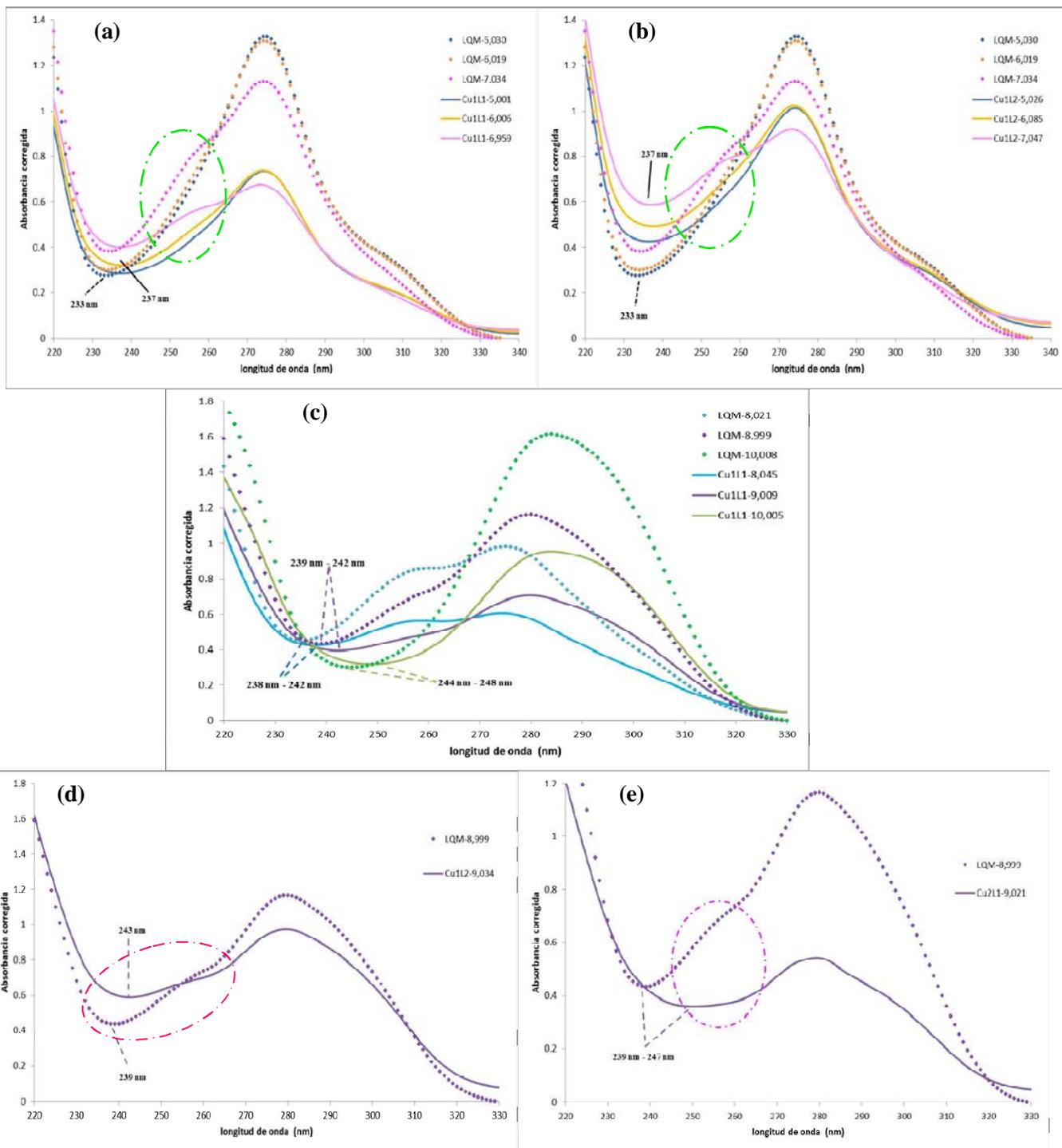


Fig. 6-15. Selección de espectros comparativos para el experimento a relaciones molares fijas. (a) $CuLQM$, pH 5-7, (b) $Cu(LQM)_2$, pH 5-7, (c) $CuLQM$, pH 8-10, (d) $Cu(LQM)_2$, pH 8-10 y (e) Cu_2LQM , pH 8-10.

Se comenzó el análisis de resultados mediante los programas computacionales, en primer lugar con SYBILA para determinar el número de especies presentes en los sistemas. Al número total de especies calculadas se le restó el número de especies ácido-base de LQM presentes de acuerdo al experimento. Los resultados se muestran en la tabla 6-2:

Tabla 6-2. Resultados para el cálculo del número de especies presentes.

Experimento		# Especies calculadas con SYBILA ^a	# complejos Cu-LQM
pH 4	RM-LQM	3-4	2-3
	RM-Cu	4-5	3-4
pH 8	RM-LQM	3-4	2-3
	RM-Cu	4-5	3-4
pH 10	RM-LQM	3	2
	RM-Cu	4-5	3-4
RM Fijas (Cu: LQM)	1:1	5-6	1-2
	1:2	7-8	3-4
	2:1	8-9	4-5

RM-LQM = relaciones molares a concentración de LQM constante

RM-Cu = relaciones molares a concentración de Cu(II) constante

RM Fija = relaciones molares fijas en función del pH

^a desviación estándar acumulada de 99.9996 %

Sabiendo el número de complejos formados en cada experimento se propusieron diferentes modelos a trabajar con el programa SQUAD, primero se propusieron modelos tomando en cuenta los valores de las constantes de acidez del LQM314, la constante de formación del hidróxido de cobre CuOH^+ pero no el valor de la constante de disociación de la especie sólida $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ni los valores de las constantes de formación de los complejos Cu-Acetato. Se obtuvieron modelos que incluyen a las especies CuH_2LQM / CuHLQM / CuLQM , CuLQM_2 / $\text{Cu}(\text{HLQM})_2$ / CuOHLQM_2 y $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{LQM}$, sin embargo al construir los diagramas de zonas de predominio con el programa MEDUSA no se observan todos los complejos involucrados en el modelo, algunos no tienen una zona de predominio por lo que pensamos que el hidróxido de cobre sólido y los acetatos pueden estar interfiriendo y deben ser tomados en cuenta en el archivo de entrada de SQUAD, con base en esto se propusieron también complejos que incluyen acetato en su estructura como se muestra a continuación:

Tabla 6-3. Especies Cu-L propuestas para SQUAD.

1:1 (Cu_1LQM_1)	1:2 (Cu_1LQM_2)	2:1 (Cu_2LQM_1)
CuLQM	CuLQM ₂	Cu ₂ LQM
CuHLQM	Cu(HLQM) ₂	Cu ₂ HLQM
CuH ₂ LQM	Cu(H ₂ LQM) ₂	(CuOH) ₂ LQM
CuOHLQM	CuOHLQM ₂	Cu ₂ AcLQM
CuAcLQM	CuAcLQM ₂	
CuAcHLQM		

Se fueron proponiendo modelos con los resultados de los experimentos a Relaciones Molares Fijas tomando en cuenta el número de especies calculado por SYBILA. Se realizó primero el refinamiento del modelo con estequiometría 1:1 para luego fijar estos valores de constantes de formación en el archivo de entrada de los modelos con estequiometría 1:2 y 2:1. Se realizaron corridas en SQUAD hasta obtener el mejor modelo, utilizando paralelamente el programa MEDUSA para evaluar las zonas de predominio de cada una de las especies involucradas. El modelo final tiene un valor de U aceptable y desviaciones de los valores de $\log \beta$ de aproximadamente 0.1%, asimismo los coeficientes de absorptividad y sus desviaciones son buenos y en los Diagramas de Distribución de Especies logran observarse todas las especies involucradas.

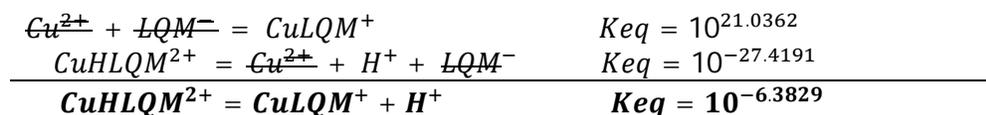
Este modelo contiene especies con estequiometría 1:1 y 1:2, pero para la relación molar 2:1 no converge ningún modelo propuesto, a pesar de no incluir especies Cu_2LQM consideramos que los complejos involucrados en el modelo final explican el comportamiento experimental, dichos complejos y sus $\log\beta$ se muestran a continuación:

Tabla 6-4. Resultados obtenidos para el sistema Cu(II)-LQM314 en medio acuoso.

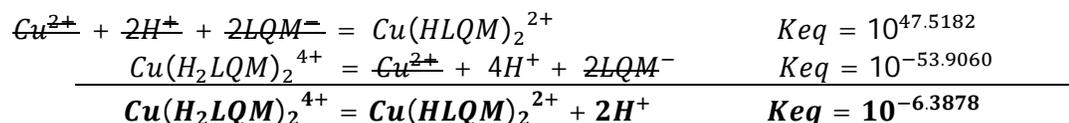
Complejo	$\log \beta$	U	$\sigma_{\text{Datos Abs}}$
CuLQM^+	21.0362 ± 0.0273	2.0355E-1	1.9185E-2
CuHLQM^{2+}	27.4191 ± 0.0419		
$\text{Cu}(\text{HLQM})_2^{2+}$	47.5182 ± 0.0550	6.3094E-1	3.4968E-2
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{LQM})_2^{4+}$	53.9060 ± 0.0812		

De los equilibrios de complejación Cu(II)-LQM presentes en el sistema, 2 de ellos son equilibrios ácido-base, por lo tanto realizamos el cálculo de los valores de sus respectivas constantes de acidez:

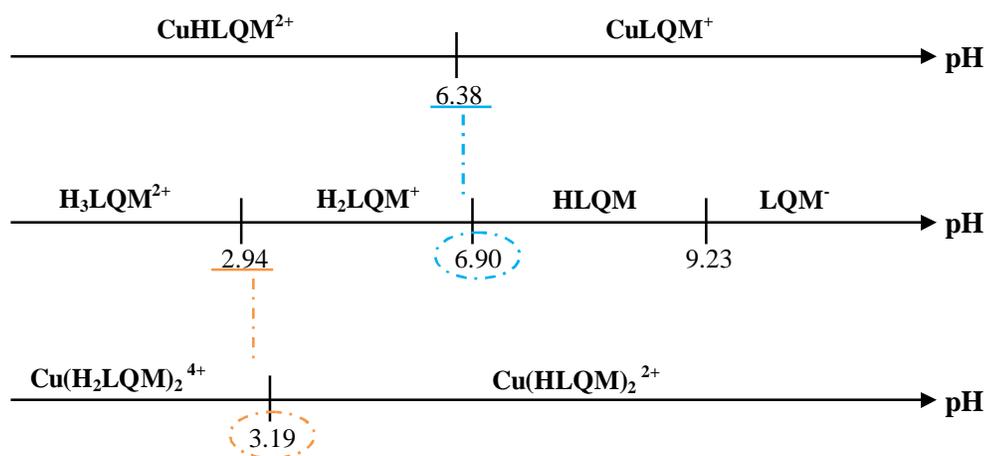
Equilibrio $\text{CuLQM}^+ / \text{CuHLQM}^{2+}$



Equilibrio $\text{Cu}(\text{HLQM})_2^{2+} / \text{Cu}(\text{H}_2\text{LQM})_2^{4+}$



Poniendo estos equilibrios y sus valores de pKa's en diagramas de zonas de predominio y comparando con los equilibrios ácido-base del LQM, observamos que los valores de pKa's obtenidos para los complejos corresponden aproximadamente a los pKa's de $\text{H}_3\text{LQM}^{2+}$ y H_2LQM^+ , es decir, que el LQM sigue unido a dos o tres especies pero para los complejos una de éstas es Cu^{2+} y las demás son H^+ en vez de ser todas ellas H^+ . Los valores de las constantes de equilibrio son aproximadamente las mismas ya que corresponden a las reacciones de disociación sucesiva de cada uno de los complejos, a la liberación de uno de los 3 sitios de unión del LQM.



Los espectros de absorción construidos a partir de los coeficientes de absorptividad refinados por SQUAD se muestran en la figura 6-15:

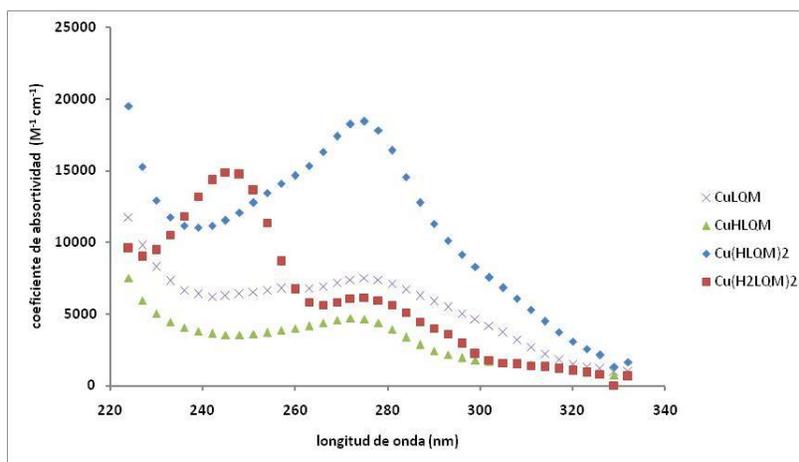


Fig. 6-16. Coeficientes de absorptividad calculados por SQUAD para los complejos Cu-LQM314.

Se observan cuatro trayectorias diferentes correspondientes a los cuatro complejos Cu-LQM formados en el sistema.

Se construyeron además gráficos los espectros de absorción ajustados con los datos refinados por SQUAD para los coeficientes de absorptividad y se compararon con los espectros experimentales (Fig. 6-16 y 6-17). Los diagramas ajustados utilizando los datos de SQUAD se construyeron calculando la absorbancia total, tomando en cuenta todas las especies presentes a determinado pH y sus concentraciones y coeficientes de absorptividad. Los perfiles presentan gran similitud. Las líneas continuas son los espectros experimentales y los marcadores los espectros ajustados con los datos de SQUAD.

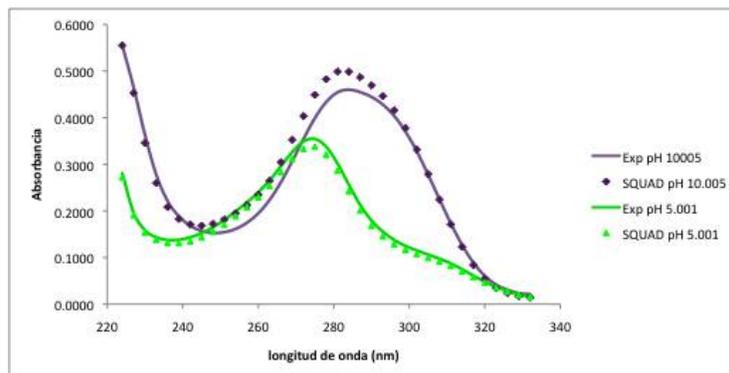


Fig. 6-17. Comparación de los espectros experimentales con los ajustados con los datos de SQUAD para la estequiometría 1:1 (CuLQM).

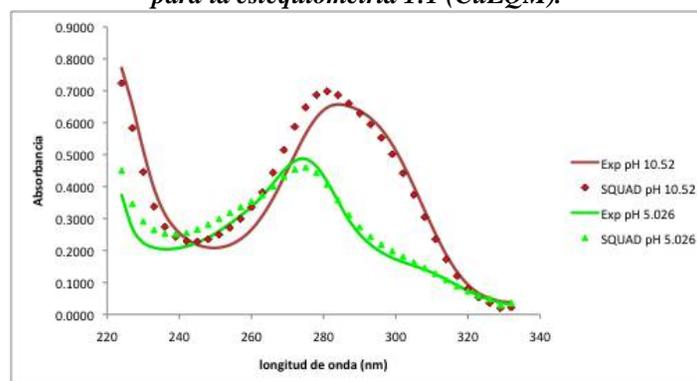


Fig. 6-18. Comparación de los espectros experimentales con los ajustados con los datos de SQUAD para la estequiometría 1:2 (CuLQM₂).

Los diagramas de distribución de especies (Fig. 6-18 y 6-19) se construyeron a concentraciones de LQM y acetato de cobre diferentes, tomando en cuenta las relaciones molares 1:1 y 1:2. A concentraciones correspondientes a la relación molar 1:1 se observa la presencia de los complejos de esta relación, mientras que las demás especies no se llegan a formar.

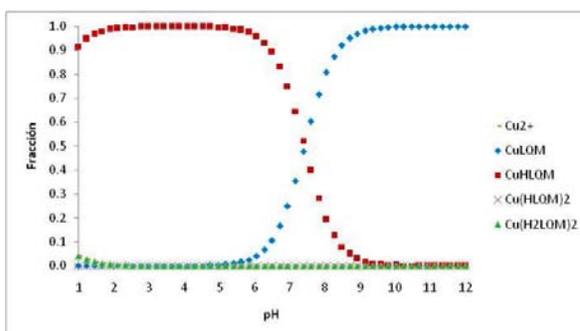


Fig. 6-19. Diagrama de distribución de especies de cobre a $[LQM] = 1 \times 10^{-5} M$ y $[Cu(II)] = 1 \times 10^{-5} M$.

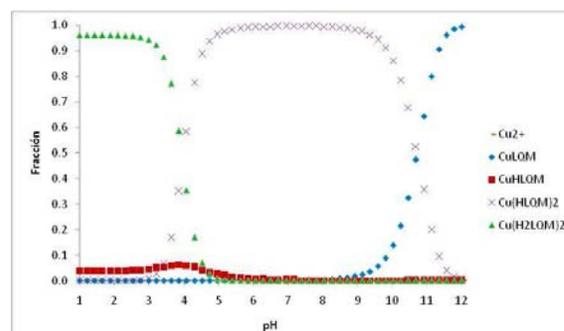


Fig. 6-20. Diagrama de distribución de especies de cobre a $[LQM]=2 \times 10^{-5} M$ y $[Cu(II)]=1 \times 10^{-5} M$.

A concentraciones correspondientes a la relación molar 1:2 se observa la presencia de las especies CuLQM₂ además de la especie CuLQM⁺ a pH's mayores a 11, la especie CuHLQM²⁺ se presenta todavía a pH 4 en un 10 %. Todas las especies se observan en los diagramas, dependiendo de las concentraciones de Cu(II) y LQM314, lo que confirma los resultados ya que es posible observar a todas ellas.

Con el modelo final obtenido se confirma el número de especies calculados: para la relación **1:1** SYBILA calculó la presencia de 1-2 especies, y de acuerdo al refinamiento con SQUAD son 2 especies (***CuLQM*** y ***CuHLQM***); para la relación **1:2** SYBILA calculó 3-4 especies, 2 corresponden a la relación 1:1 y las otras dos a la relación 1:2. Para la estequiometría **2:1** SYBILA calculó 4-5 especies, 2 correspondientes a los complejos 1:1 y dos que deberían ser los complejos 2:1, sin embargo de acuerdo al análisis no se lograron refinar estas constantes de formación, es posible entonces que SYBILA detecte las especie pero no son suficientemente estables como para poder calcular su constante de equilibrio y además poder verlas en los diagramas de distribución de especies.

7. Exploración del sistema cobre (II)-LQM314 mediante microcalorimetría ITC

Antes de realizar el análisis de los resultados es necesario explicar que, de acuerdo a los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Vis, los equilibrios involucrados en los sistemas Cu(II)-LQM tienen valores de constantes de estabilidad grandes ($> 10^8$) y de acuerdo a la bibliografía consultada, para reacciones con K's en ese orden de magnitud (Velázquez-Campoy, *et. al.*, 2004) se necesitan bajas concentraciones de los reactivos para realizar la experimentación en ITC, de manera que puede ser necesario trabajar con concentraciones lo suficientemente bajas como para llegar a alcanzar el límite de detección del calorímetro, en estos casos solamente pueden determinarse n y ΔH , pero no K (Wiseman, *et. al.*, 1989) (Freire, *et. al.*, 1990).

Para reacciones como las involucradas en el presente estudio, de alta afinidad, se recomienda utilizar el método de desplazamiento, en el que se titula una disolución de macromolécula (o metal) pre-enlazado a un ligante competitivo, más débil, con la disolución del ligante en estudio. De esta manera la afinidad se reduce ya que ahora el ligante potente tiene que desplazar al más débil para poder unirse a la macromolécula (o metal), lo que involucra pérdida de energía y la obtención de una isoterma de enlace adecuada para ser analizada (Velázquez-Campoy, *et. al.*, 2004, pág. 17.8.12). Ya que solamente realizamos pruebas exploratorias, no llegamos a utilizar el método de desplazamiento.

a) ITC en Metanol

Como se describió en el capítulo *Materiales y Metodología*, se prepararon diversas disoluciones de LQM314 y de acetato de cobre (II) para conseguir relaciones molares LQM/Cu de 5 a 1. En la prueba 01 se trabajó una relación molar máxima de 4.5 y se observa el cambio de pendiente alrededor de 0.5 sin cambios después de 1.0. Este resultado muestra la evidencia la presencia del complejo Cu_2LQM , que se determinó también mediante espectrofotometría UV-Vis. Se muestra a continuación la isoterma de enlace obtenida y el termograma. La figura 7-1a muestra el perfil de la titulación del metal con el ligante superpuesta con el perfil de dilución del ligante.

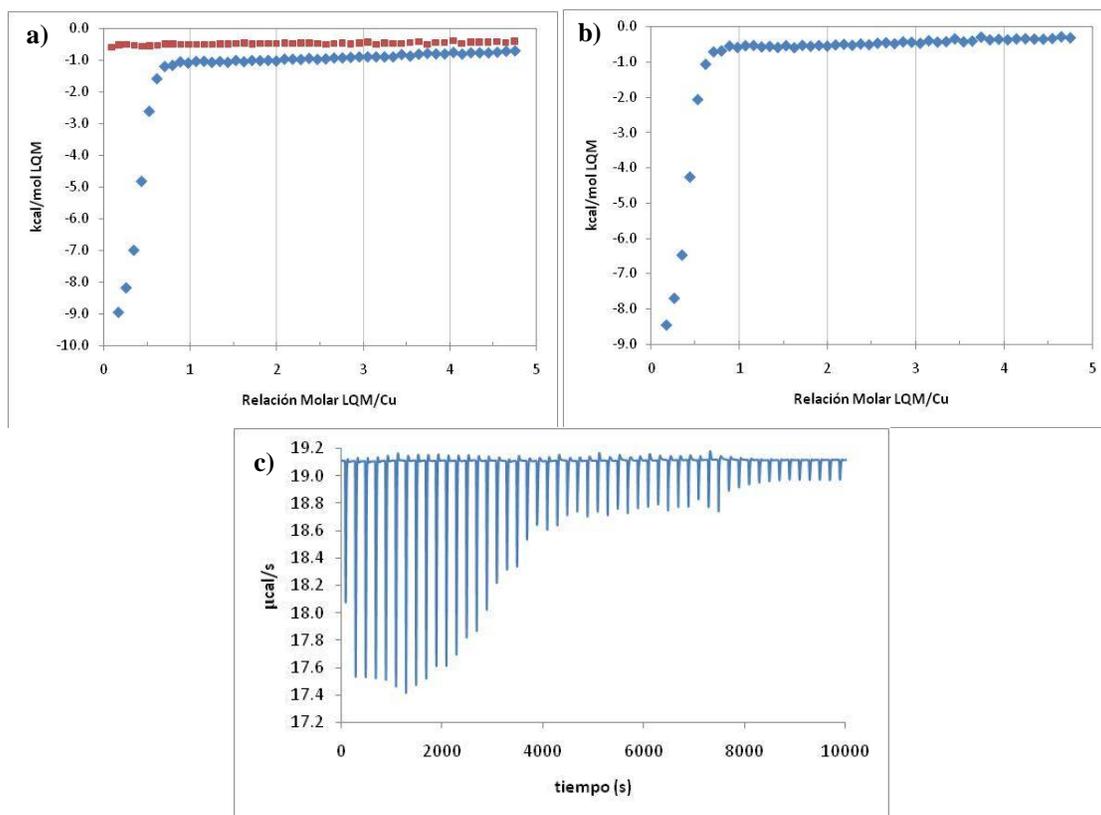


Fig. 7-1. Resultados de la Prueba 01 en metanol. [LQM 314] = 2.5836 mM, [Cu] = 0.1155 mM, 50 inyecciones/5 μ L, 300 s espaciado.

- a) Azul: isoterma de enlace LQM 314-Cu(II), Rojo: isoterma de dilución de LQM314.**
b) isoterma de enlace LQM 314-Cu(II) corregida con la dilución del ligante.
c) Termograma asociado al experimento.

En el termograma se observa que los picos son negativos, es decir, que la diferencia de calor entre la celda de reacción y la de referencia es negativa, esto significa que durante la reacción la celda de reacción estaba más caliente que la celda de referencia y que el sistema disminuyó la temperatura de la celda de reacción para equilibrarla con la de la celda de referencia debido a la generación de calor. En los gráficos de las isotermas de enlace se grafican calores negativos, y con estas observaciones podemos concluir que la reacción entre el compuesto LQM 314 y el acetato de cobre (II) en medio metanólico es exotérmica.

A partir de este primer resultado se trabajaron diferentes concentraciones de LQM314 y Cu(II) para obtener un mejor perfil para la curva. En la figura 7-2 se muestran algunos de los perfiles obtenidos, en los que el cambio de pendiente siempre se presenta en la relación molar de 0.5 y el ΔH es de aproximadamente 6 kcal. Se eliminaron todos los puntos correspondientes a las primeras inyecciones. La primera inyección no se toma en cuenta porque desde el momento en que se pone en contacto la punta de la jeringa de titulación con la disolución en la celda empiezan a reaccionar las especies (el remanente de titulante que haya en la punta de la jeringa) y ese cambio de calor no es medido todavía.

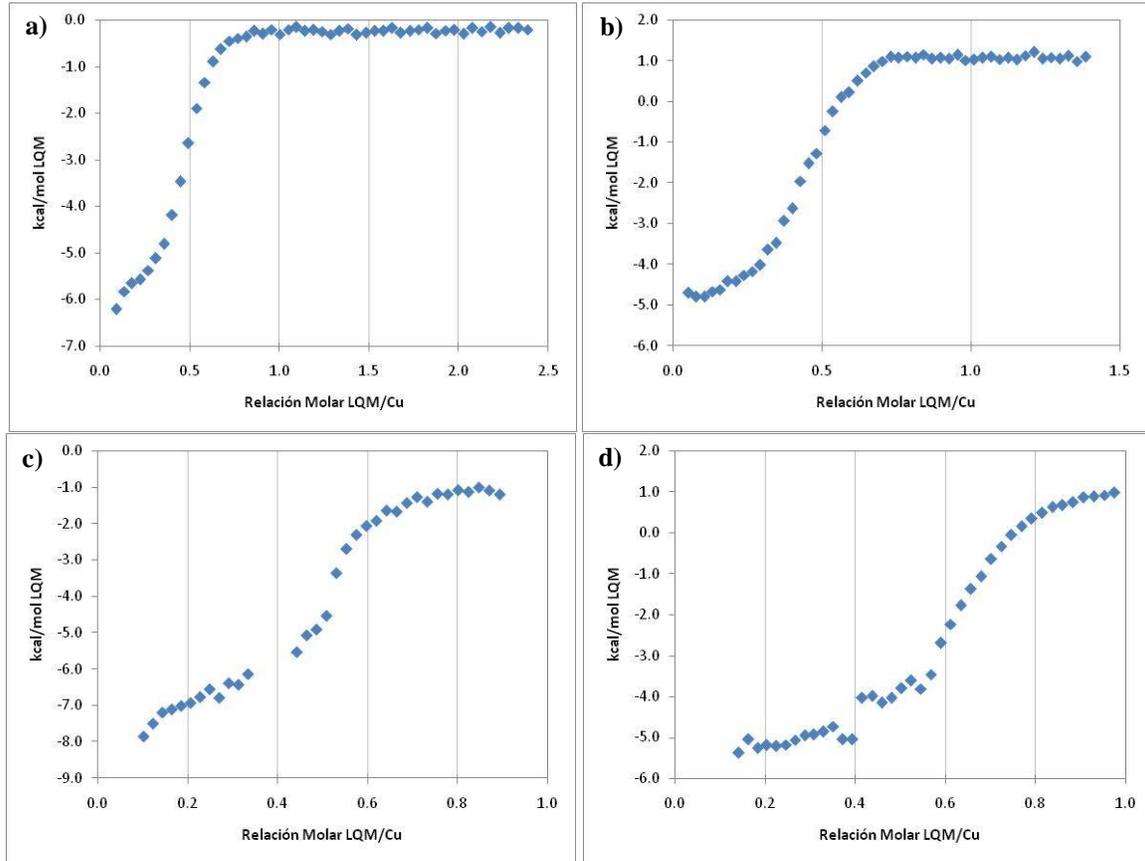


Fig. 7-2. Isothermas de enlace obtenidas para la titulación de Cu(II) con LQM314.

- a) Prueba 02: $[LQM]=1.5123 \text{ mM}$, $[Cu]=0.1206 \text{ mM}$, 50 inyecciones/5 μL , 300 s espera
- b) Prueba 02b: $[LQM]=1.5123 \text{ mM}$, $[Cu]=0.1206 \text{ mM}$, 50 inyecciones/3 μL , 200 s espera
- c) Prueba 04: $[LQM]=0.6301 \text{ mM}$, $[Cu]=0.1105 \text{ mM}$, 41 inyecciones/5 μL , 200 s espera
- d) Prueba 06: $[LQM]=1.3863 \text{ mM}$, $[Cu]=0.2411 \text{ mM}$, 45 inyecciones/5 μL , 200 s espera

La isoterma de enlace para la prueba 02 es muy larga y no se define bien el inicio de la curva, y la de la prueba 06 queda un poco corta, falta definir bien la última parte de la curva que permanece constante. Se realizó una repetición para las pruebas 04 y 06 (Fig. 7-3) ya que el perfil tiene muchos puntos anómalos, sin embargo, las repeticiones fueron muy parecidas, lo que indica que a estas concentraciones se pierde la precisión a lo largo de la curva y no se observa bien definida. Por lo tanto se decidió tomar como el mejor perfil la isoterma de enlace 02b porque se observa bien definida la forma sigmoideal.

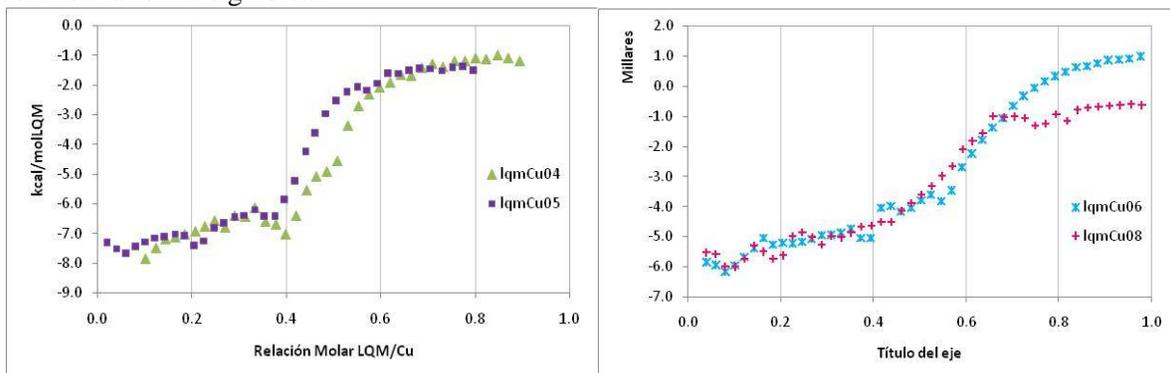


Fig. 7-3. Isothermas de enlace 04 y 06 y sus repeticiones.

- a) $[LQM]\sim 0.6\text{-}0.7 \text{ mM}$, $[Cu]=0.1 \text{ mM}$. b) $[LQM]=1.4 \text{ mM}$, $[Cu]=0.2 \text{ mM}$.

De los diversos experimentos que se hicieron, la figura 7-4 muestra la comparación de 3 de ellos, que difieren entre sí en las concentraciones utilizadas de los reactantes. La isoterma de enlace lqmCu01 se obtuvo con las concentraciones más bajas trabajadas, el perfil es bien definido y la pendiente es la mayor de los 3 experimentos. El experimento lqmCu10 se realizó con las concentraciones más altas trabajadas, y se observa que la pendiente de la sigmoide es la menor de las tres, es decir, que tiene el perfil menos definido. La isoterma de enlace lqmCu02 muestra un comportamiento intermedio, y se observa mejor el perfil sigmoide de inicio a fin.

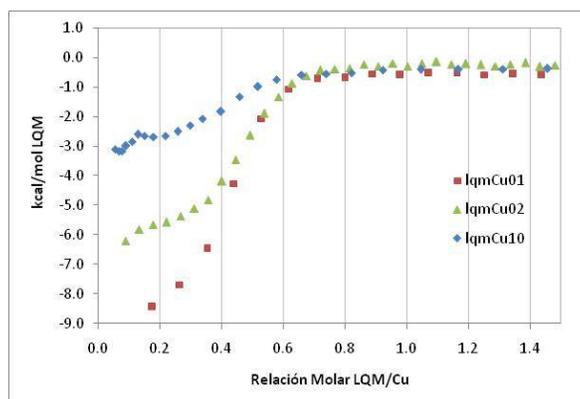


Fig. 7-4. Comparación de las isotermas de enlace obtenidas para la titulación de Cu(II) con LQM314. a) lqmCu01: [LQM]=2.5836 mM, [Cu]=0.1155 mM. b) lqmCu02 [LQM]=1.5123 mM, [Cu]=0.1206 mM. c) lqmCu10: [LQM]=25.5209 mM, [Cu]=0.9043 mM

Esta comparación de las isotermas de enlace en función de la concentración de los reactantes demuestra que, para la reacción entre LQM314 y acetato de cobre(II) en medio metanólico, el perfil es más definido y la pendiente más pronunciada a concentraciones bajas de los reactantes, y menos definido con una pendiente menor a concentraciones altas. Estas observaciones evidencian el comportamiento para una reacción de alta afinidad como se describió anteriormente.

Se evaluó la repetibilidad del método elegido (Fig. 7-5), con el que se obtiene el mejor perfil de la curva, el experimento es repetible, se obtiene el mismo perfil con los parámetros n y ΔH muy similares, aunque no se sobreponen las curvas debido a la diferencia en el termograma obtenido para cada uno de los blancos, ya que los experimentos se realizaron en días diferentes, aún así, como ya se dijo, el perfil y los parámetros son repetibles.

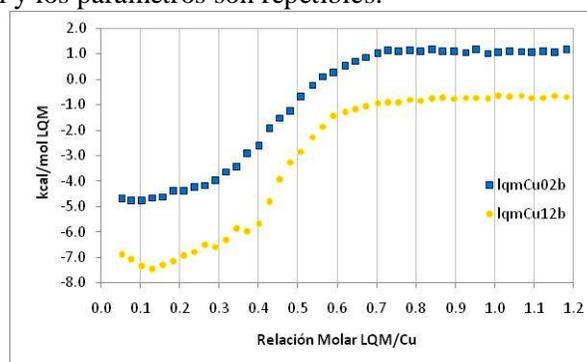


Fig. 7-5. Repetibilidad del método. [LQM]=1.5123 mM, [Cu]=0.1206 mM.

Adicionalmente se realizó un experimento de titulación ligante-metal, que muestra también que la reacción es exotérmica, y se observa un cambio de pendiente evidente aproximadamente en 2.0 (lo que confirma la presencia del complejo Cu_2LQM), pero también se observa un cambio de pendiente

antes de la relación molar 0.5, lo que podría indicar la formación del complejo CuLQM_3 determinado en UV-Vis. Para este último complejo se hizo otro experimento tratando de obtener este intervalo de relación molar pero no se logró obtener una isoterma de enlace sigmoideal ya que, como se explicó anteriormente, la constante de formación es grande ($> 10^8$) y para obtener el perfil deseado necesitaríamos bajar demasiado las concentraciones de los reactantes, o utilizar el método de desplazamiento. El hecho de que no pueda obtenerse un buen perfil en la isoterma de enlace para equilibrios con altos valores de constantes de formación se confirma en la figura 7-6, que muestra un mejor perfil para CuLqmMeOH01 donde se trabajaron concentraciones más pequeñas que en CuLqmMeOH02 .

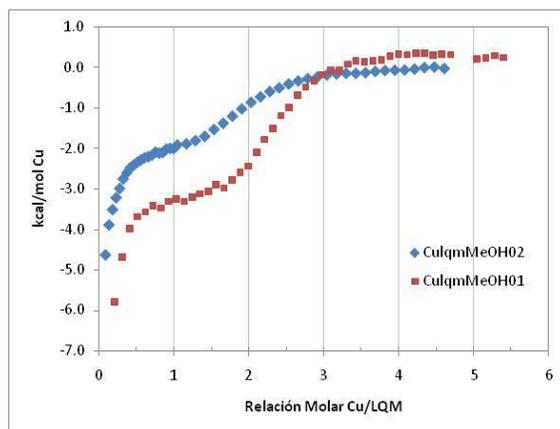


Fig. 7-6. Isotermas de enlace obtenidas para la titulación de LQM314 con Cu(II).

Culqm01: $[\text{Cu}] = 2.4114 \text{ mM}$, $[\text{LQM}] = 0.0832 \text{ mM}$ 50 Inyecciones/5 μL , 200s espera espaciado.

No corregido con el calor de dilución del titulante. **Culqm02:** $[\text{Cu}] = 19.0904 \text{ mM}$, $[\text{LQM}] = 0.5671 \text{ mM}$ 22 Inyecciones/2 μL + 41 Inyecciones/5 μL , 200 s espera espaciado. Corregido con el calor de dilución del titulante.

Este gráfico comparativo confirma también el comportamiento de la isoterma de enlace para una reacción de alta afinidad.

En cuanto al análisis numérico, se realizó en el programa OriginLab y en Excel. En el programa OriginLab se probó el ajuste de la sigmoide con el modelo matemático **One Set of Sites**, incluido para el análisis de los datos como uno de los modelos básicos, sin embargo el ajuste con este modelo no fue satisfactorio. Como siguiente opción se utilizó de la **función sigmoideal de Boltzmann**, que es el modelo matemático que mejor se ajusta a los resultados experimentales y por lo tanto el que se utilizó para el análisis, la ecuación que representa este modelo es la siguiente:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x_0 - x)/dx}}$$

Donde:

y = variable dependiente = calor normalizado (kcal/mol titulante (LQM))

A_1 = valor inicial de la curva

A_2 = valor final de la curva

x_0 = punto de inflexión, valor de x en el centro de la curva

x = variable independiente = relación molar titulante/disolución en celda (LQM/Cu)

dx = pendiente de la curva en el intervalo de cambio, indica la sensibilidad de la curva, qué tan pronunciada o tan plana es

El ajuste se muestra a continuación con los límites de confianza calculados mediante una hoja de cálculo de Excel:

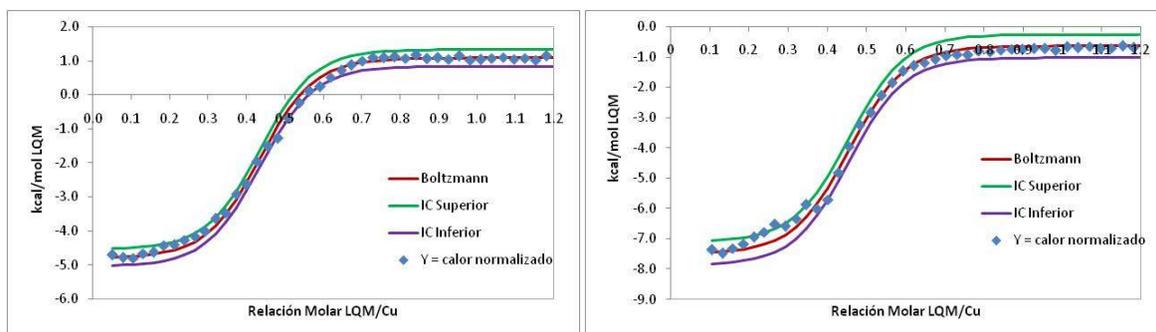


Fig. 7-7. Ajuste de los datos experimentales con el modelo de la Sigmoide de Boltzmann. (a) Prueba 02b, (b) Prueba 12b.

Los valores de n y ΔH calculados para la reacción mediante el programa OriginLab, para los experimentos 02b y 12b se muestran en la tabla 7-1:

Tabla 7-1. Valores de n y ΔH calculados.

ID	n (relación estequiométrica)	ΔH (Kcal/mol)
Prueba 02b	0.44 ± 0.002	-5.871
Prueba 12b	0.46 ± 0.003	-6.464
Promedio	0.45 ± 0.1156	-6.167 ± 3.77

Los valores son muy parecidos y sobre todo, lo que rescatamos es la confirmación de una de las estequiometrías encontradas también en UV-Vis: el complejo $\text{Cu}_2\text{LQM314}$. Este proyecto concluye en esta parte, por lo que el siguiente paso sería profundizar en el análisis matemático para la determinación precisa de la constante de equilibrio, y considerar que el modelo debe involucrar la formación de la especie polinuclear $\text{Cu}_2\text{LQM314}$.

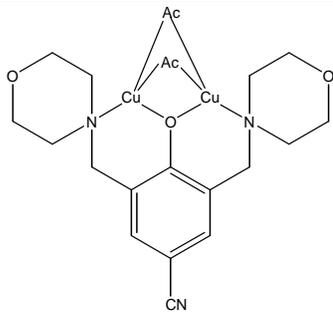
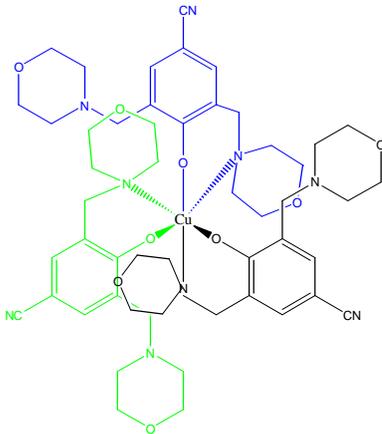
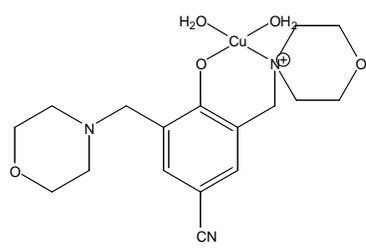
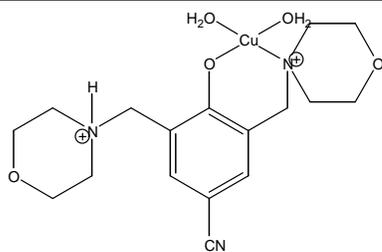
Se realizaron algunos experimentos exploratorios en medio acuoso, sin embargo bajo las condiciones de trabajo no fue posible obtener un perfil sigmoial bien definido ya que, como se mencionó anteriormente, los equilibrios involucrados tienen valores de constantes de estabilidad muy grandes y se hace necesaria la utilización del método de desplazamiento.

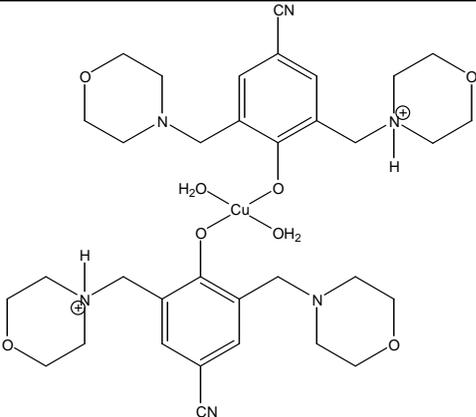
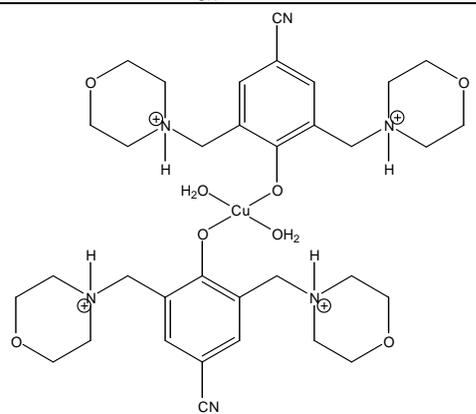
8. Conclusiones y Perspectivas

8.1 Conclusiones

- Mediante el estudio de especiación química del sistema *LQM 314*-acetato de cobre (II) se determinaron los complejos formados y sus respectivos valores de $\log\beta$, aportando con ello una descripción del comportamiento de dicho sistema en disolución.
- Se observó la diferencia en ese comportamiento en los distintos disolventes utilizados, ya que no se determinaron el mismo número de complejos formados ni las mismas estequiometrías en cada caso.
- Mediante la especiación química en metanol por UV-Vis se encontró la formación de dos complejos: Cu_2LQM y CuLQM_3 , resultados reproducibles considerando que se realizaron tres procedimientos experimentales independientes y en los tres se obtienen resultados muy similares con el mismo modelo.
- En medio metanólico se promueve la formación de una especie polinuclear de cobre sin observar la formación de una especie con estequiometría 1:1 metal:ligante. Sin embargo cuando hay exceso del ligante *LQM314*, de acuerdo a los resultados, es mucho más estable la especie CuLQM_3 , logrando disociar completamente al cobre del acetato y desplazando a la especie polinuclear.
- La especiación química del compuesto *LQM314* con acetato de cobre (II) en agua indica la formación de los complejos CuLQM^+ , CuHLQM^{2+} , $\text{Cu}(\text{HLQM})_2^{2+}$ y $\text{Cu}(\text{H}_2\text{LQM})_2^{4+}$. En este caso los acetatos no se encuentran en las estructuras de los complejos formados debido a la baja estabilidad de las especies acetato de cobre en disolución acuosa.
- Dentro de los equilibrios de complejación en agua se observó la presencia de los pares ácido-base $\text{CuHLQM}^{2+}/\text{CuLQM}^+$ y $\text{Cu}(\text{H}_2\text{LQM})_2^{4+}/\text{Cu}(\text{HLQM})_2^{2+}$, y se calcularon los valores de pKa 's de 6.3829 y 3.1939 para cada uno de ellos. Estos equilibrios ácido-base explican los puntos isobéuticos observados en el conjunto de espectros de absorción obtenidos.
- La técnica de calorimetría ITC requiere la obtención de una sigmoide para un buen análisis de los resultados, el perfil logró obtenerse mediante la optimización de las condiciones experimentales. A partir del gráfico se pueden obtener directamente la estequiometría del complejo formado y el valor de entalpía asociado a la reacción, para el cálculo de la constante de equilibrio es necesario desarrollar un modelo matemático más robusto que tome en cuenta la formación de la especie polinuclear, ya que los modelos que se utilizaron sólo toman en cuenta equilibrios sencillos.
- Mediante ITC se comprobó la existencia del complejo Cu_2LQM formado en metanol, encontrado también mediante la especiación química por UV-Vis, y se observó la presencia de un complejo CuLQM_x , donde $x > 1$.
- Se obtuvo además un valor de ΔH promedio asociado a la reacción de -6.1675 kcal/mol, y se inició el camino para estudios de especiación química mediante calorimetría como una nueva técnica en nuestro grupo de trabajo.

- La conclusión final de los estudios de especiación se resume en la siguiente tabla, donde además se ilustra una propuesta de las estructuras de las especies formadas.

Complejo	$\log\beta$	Estructura propuesta
Especiación en metanol		
Cu_2LQM	9.7864 ± 0.0642	
CuLQM_3	12.1713 ± 0.0399	
Especiación en agua		
CuLQM^+	21.0362 ± 0.0273	
CuHLQM^{2+}	27.4191 ± 0.0419	

$\text{Cu}(\text{HLQM})_2^{2+}$	47.5182 ± 0.0550	
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{LQM})_2^{4+}$	53.9060 ± 0.0812	

8.2 Perspectivas

La determinación de las propiedades fisicoquímicas del sistema *LQM 314*-acetato de cobre (II) en disolución forma parte de la investigación que inició el equipo de trabajo del Laboratorio de Química Medicinal de la FESC, los resultados expuestos en el presente trabajo ayudarán a continuar con los estudios del perfil farmacológico, el desarrollo preclínico y clínico del compuesto *LQM 406* (sintetizado a partir de *LQM 314* y acetato de cobre (II)).

Mediante los experimentos exploratorios en calorimetría del sistema *LQM314*-acetato de cobre (II) confirmamos una de las estequiometrías obtenidas por la técnica de referencia UV-Vis en medio metanólico, sin embargo aún falta realizar un análisis matemático detallado del modelo a utilizar para la determinación del valor de $\log \beta$ y de los parámetros termodinámicos, para complementar con ellos la especiación en espectrofotometría. Los resultados obtenidos por ITC permitirán establecer las bases para el inicio de otros estudios de especiación química mediante esta técnica.

9. Referencias

- 1) Adsule S., Barve V., Chen D., Ahmed F., Dou Q. P., Padhye S., Sarkar F.H.. *J. Med. Chem.* **49**, 7242 (2006).
- 2) Aguilar-Hernández A.. *Estudio de la interacción química del compuesto LQM 314 con el ión metálico Cu (II)*, Tesis Licenciada en Química Industrial. UNAM. (2012).
- 3) American Cancer Society, ACS. (2014). <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/index>.
- 4) Ayres G. H.. *Análisis químico cuantitativo*. Oxford. México (1968). pp.: 494-496.
- 5) Bernabé-Pérez O.. *Síntesis de complejos de cobre II con diferentes ligantes tiomorfolínicos*, Tesis Químico. UNAM. (2013). pp. 10-14.
- 6) Bernabé-Pineda M.. *Estudio de especiación química de los compuestos orgánicos diisopropiliminodiacetoamida y curcumina con iones de interés farmacéutico y clínico*, Tesis Doctorado en Ciencias (Químicas). UAM. (2009). pp.: 101-104
- 7) Berthon G.. *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids. Bioinorganic Chemistry*, Vol. 1 y 2. Marcel Dekker, Nueva York. (1995). pp.: 58, 98, 533-541, 546-550, 1024-1026, 1230-1231.
- 8) Bjelić S., Jelesarov I.. *Journal of Molecular Recognition*. **21**, 289-311 (2008).
- 9) Breña-Valle M., Serment-Guerrero J., Ruiz-Azuara L.. *Mecanismos de acción de antineoplásicos de nueva síntesis y su posible uso en terapia combinada con radiación*. Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al avance de la Ciencia y la Tecnología en México. Edición Conmemorativa. (2010). pp. 53-55.
- 10) Bravo-Gómez M. E., García-Ramos J. C., García-Mora I., Ruis-Azuara L.. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **103**, 299-309 (2009).
- 11) Brown A. M.. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. **65**, 191-200 (2001).
- 12) Desoize B.. *Anticancer Research*. **24**, 1529-1544 (2004).
- 13) Escutia-Calzada D.. *Síntesis de complejos de coordinación de Cobre II derivados del fenol con posible actividad antineoplásica y caracterización mediante técnicas espectroscópicas*, Tesis Químico. UNAM. (2011).
- 14) Freire E., Mayorga O. L., Straume M.. *Analytical Chemistry*. **62**, 950A-956A (1990).
- 15) Frías-González S. E., Angeles-Anguiano E., Mendoza-Herrera A., Escutia-Calzada D., Ordaz-Pichardo C.. *Toxicology*. **314**, 155-165 (2013).
- 16) García-Ramos J. C., Galindo-Murillo R., Tovar-Tovar A., Alonso-Saenz A. L., Gómez-Vidales V., Flores-Álamo M., Ortiz-Frade L., Cortes-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Campero A., Ruiz-Azuara L.. *Chemistry - A European Journal*. **20**, 13730-13741 (2014).
- 17) García-Ramos J. C., Tovar-Tovar A., Hernández-Lima J., Cortés-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Ruiz-Azuara L.. *Polyhedron*. **30**, 2697 (2011).
- 18) Gómez-Zaleta B.. *Determinación de las constantes de acidez de la mangiferina y su interacción con algunos iones metálicos en medio acuoso*, Tesis Doctorado. UAM. (2006).
- 19) Guo Z., Sadler P. J.. *Angewandte Chemie International Edition*. **38**, 1512-1531 (1999).
- 20) Hansen L. D., Fellingham G. W., Russell D. J.. *Analytical Biochemistry*. **409**, 220-221 (2011).
- 21) Harris D. C.. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté. España. (2001). pp.: 537-539.
- 22) Hartley F. R., Burgess C., Alcock R. M.. *Solution Equilibria*, John Wiley & Sons. (1980).
- 23) Harvey D.. *Química Analítica Moderna*, McGraw-Hill, Colombia. (2002). pp.: 282-285.
- 24) LQ L., ZX Q., ZM W., YL Z., GS D., GJ H., XY Y.. *Sci Sin*. **22 (10)**, 1220-1228 (1979).
- 25) Ma Z., Qiao X., Xie C., Shao J., Xu J., Qiang Z., Lou J.. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **117**,1 (2012).
- 26) Milev S.. *Isothermal titration calorimetry: Principles and experimental design*. General Electric Company. GE Title or job number: 1/9/2013. (2010).

- 27) Montes-Madrigal G.. *Síntesis de derivados tiomorfolínicos LQM 317, 318, 319, 320, 321 y 326 con actividad antihipertensiva*, Tesis Químico. UNAM. (2005). pp. 1-2.
- 28) Morales-Pérez A.. *Estudio de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa SQUAD y otros métodos computacionales*, Tesis Maestro en Ciencias Fisicoquímica. UNAM. (1993). pp.: 6-28.
- 29) Pelosi G.. *The Open Crystallography Journal*. **3**, 16 (2010).
- 30) Puigdomenech I. <https://www.kth.se/en/che/medusa>.
- 31) Ruiz-Azuara L., Bravo-Gómez M. E., *Current Medicinal Chemistry*, **17(31)**, 3606-3615 (2010).
- 32) Sosa-Durán E. E., García-Rodríguez F. M.. *Panorama epidemiológico del cáncer en México*. Anestesiología en Oncología. **36**. Supl. 1, S130-S32. (2013).
- 33) Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Łobiński R.. *Pure and Applied Chemistry*. **72**, 1455-1456 (2000).
- 34) Velázquez A. Ma., Torres L. A., Díaz G., Ramírez A., Hernández R., Santillán H., Martínez L., Martínez I., Díaz-Barriga S., Abrego V., Balboa M. A., Camacho B., López-Castañares R., Dueñas-González A., Cabrera G., Angeles E.. *ARKIVOC* (ii) 150-161 (2006).
- 35) Velázquez-Campoy A., Ohtaka H., Nezami A., Muzammil S., Freire E.. *Current Protocols in Cell Biology* John Wiley & Sons. **21**, 17.8.1-17.8.24 (2004).
- 36) Vilchis-Martínez R.. *Evaluación in vitro de la citotoxicidad de dos complejos de coordinación de Cu (II) derivados del fenol, en diversas líneas celulares neoplásicas*, Tesis Químico. UNAM. (2011).
- 37) Wiseman T., Williston S., Brandts J. F., Lin L.. *Analytical Biochemistry*. **179**, 131-137 (1989).
- 38) ITC Data Analysis in Origin. Tutorial Guide. Version 5.0, October 1998.

ANEXO 1

Verificación de las constantes de acidez del compuesto LQM314

Como prueba de control de calidad de la materia prima y para tener un parámetro de comparación entre los lotes utilizados del compuesto LQM314, se determinaron las constantes de acidez de dicho compuesto, bajo las mismas condiciones de trabajo manejadas por *Aguilar-Hernández, 2012*.

i. Preparación de disoluciones

Disolución stock LQM314

Se pesó en una balanza analítica, en un matraz volumétrico de 25 mL, aproximadamente 5 mg del compuesto LQM314. Se adicionaron 5 gotas de HCl 0.1 M y se solubilizó el sólido con agua desionizada agitando manualmente. Se colocó la disolución en baño ultrasónico durante 2 minutos. Una vez disuelto completamente, se llevó al volumen de aforo con agua desionizada y se homogeneizó. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. S LQM314*.

Disolución ácida LQM314

Se tomaron 3.5 mL de la *Soln. S* y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 438.3 mg de NaCl y se disolvió con agua desionizada agitando manualmente. Se adicionaron 415 µL de HCl concentrado y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. Ácida LQM314*.

Disolución básica LQM314

Se tomaron 3.5 mL de la *Soln. S* y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 438.3 mg de NaCl y se disolvió con agua desionizada agitando manualmente. Se adicionaron 2 mL de NaOH 5 M y se llevó al volumen de aforo con agua desionizada. La disolución obtenida se etiquetó como *Soln. Básica LQM314*.

Valoración ácido-base

Para realizar la valoración, primero se encendió, se calibró y ajustó el potenciómetro, se montó la celda termostatada y se encendió el recirculador ajustándolo a 37 °C. Se agregó a la celda un volumen de 15 mL de la disolución ácida, manteniéndola en agitación en un sistema cerrado, en una atmósfera de nitrógeno para evitar variaciones en el pH debidas al CO₂ del ambiente.

Se encendió el espectrofotómetro y se seleccionó el método a utilizar; se realizó la calibración y ajuste a cero (autocero) del equipo utilizando agua desionizada como blanco, en un intervalo de longitud de onda de 200 nm a 500 nm.

Se verificó que la temperatura del sistema se encontrara a 37 °C y se midió el pH inicial de la *Soln. ácida*, se tomó una alícuota de la disolución y se colocó en una celda de cuarzo para obtener su espectro de absorción; una vez obtenido, se devolvió la alícuota tomada a la celda termostatada. Se agregaron al sistema volúmenes de la *Soln. básica* en cantidades necesarias para subir el pH cada 0.25 unidades, tomando en cada valor de pH una alícuota de la disolución para obtener el espectro de absorción correspondiente, para después regresar la muestra al sistema. Se registraron los cambios de pH, realizando la valoración hasta pH=12. Ya obtenidos todos los espectros, se realizó el análisis de resultados.

El procedimiento se realizó por triplicado.

ii. Resultados y análisis de resultados

Para los tres experimentos se obtuvieron resultados similares, tanto en las formas de los espectros de absorción, como en los valores de las constantes de equilibrio. A continuación se muestra una selección de los espectros de absorción obtenidos como función del pH (*Fig. A1-1 a A1-3*).

La *Fig. A1-1* muestra los espectros de absorción obtenidos para el intervalo de pH de 1.193 – 4.777. Se observa la presencia de dos puntos isobstéticos, uno a 229 nm y otro a 254 nm; y dos máximos de absorbancia a 244 nm y a 214 nm. Los puntos isobstéticos indican la presencia de al menos un equilibrio ácido-base para estos sistemas.

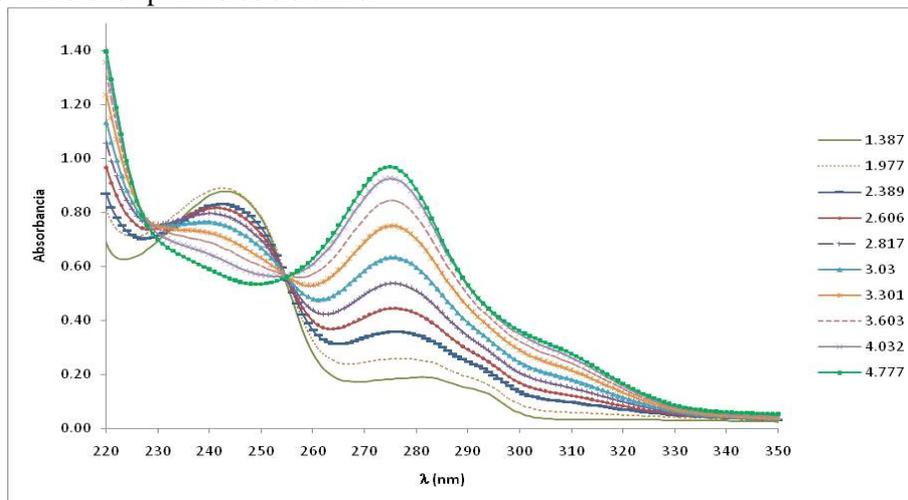


Fig. A1-1. Valoración ácido-base del compuesto LQM314 pH 1.193–4.777. [LQM314]= 4.4×10^{-5} M.

En la *Fig. A1-2* se observa un punto isobstético en 263 nm, mientras que el máximo de absorbancia se encuentra a 273 nm. La *Fig. A1-3* muestra dos puntos isobstéticos, a 241 nm y 266 nm, y un máximo de absorbancia, a 280 nm.

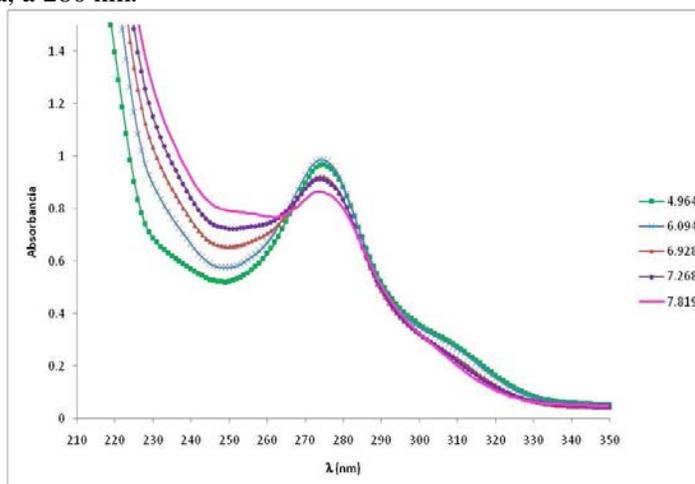


Fig. A1-2. Valoración ácido-base del LQM314 pH 4.964 – 7.819. [LQM314]= 4.4×10^{-5} M.

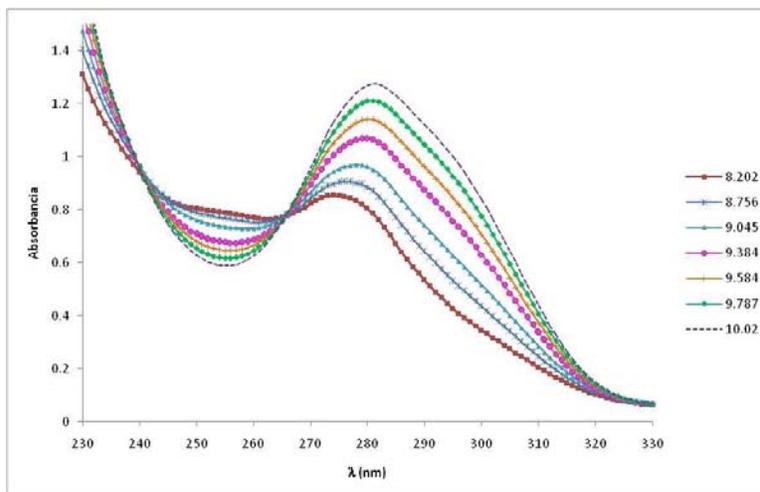


Fig. A1-3. Valoración ácido-base del LQM314 pH 8.202 – 10.020. $[LQM314]= 4.4 \times 10^{-5} M$.

En la **Fig. A1-4**, donde se grafica la absorbancia como función del pH a cuatro determinadas longitudes de onda, se observan tres cambios de pendiente, uno en un intervalo de pH entre 2.5 y 3.0, el siguiente está alrededor de pH 6 y pH 7 y uno último se observa alrededor de pH = 9. Estos cambios de pendiente indican la existencia de un equilibrio ácido-base con valores de pKa's aproximados de 3, 6 y 9. Los cambios de pendiente observados corresponden a los valores de pH encontrados por Aguilar-Hernández. Las comparaciones finales se realizarán a continuación con los valores de las constantes de acidez refinados.

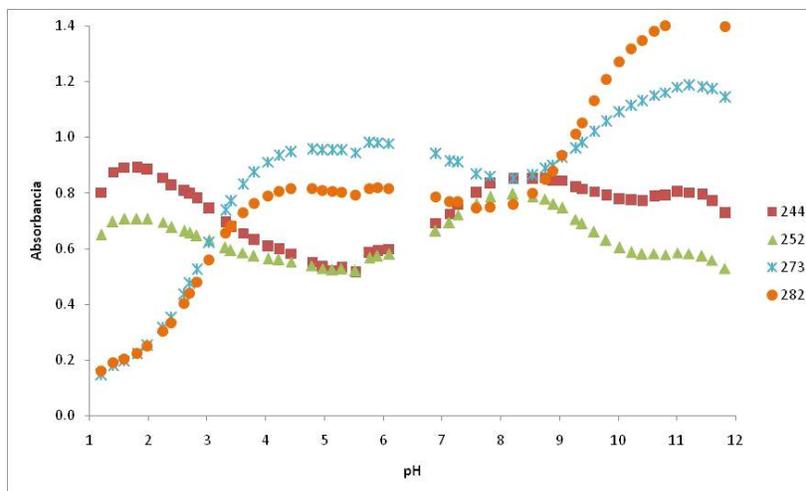


Fig. A1-4. Gráfico absorbancia = $f(pH)$ a determinadas longitudes de onda pH 1.193 – 12.001.

Con el programa SQUAD se refinaron las constantes de acidez para cada uno de los tres experimentos. Se trabajó con 16 espectros tomando los valores de absorbancia en un intervalo de longitud de onda de 240 nm a 332 nm cada 2 nm. Se muestran los valores con la mejor estadística obtenida:

Tabla A1-1. Valores de las constantes de formación obtenidos para el compuesto LQM314.

Especie	log β			pKa	$\sigma_{\text{Datos Abs}}$	U
<i>HL</i>	9.3719	\pm	0.0041	9.3719	5.5857E-02	1.7503E-02
<i>H₂L</i>	16.4452	\pm	0.0101	7.0733		
<i>H₃L</i>	19.3334	\pm	0.0107	2.8882		

Los reportados por Aguilar-Hernández, 2012 son:

Tabla A1-2. Resultados reportados por Aguilar-Hernández.

Especie	log β			pKa	$\sigma_{\text{Datos Abs}}$	U
<i>HL</i>	8.8640	\pm	0.0028	8.8640	3.03E-03	8.26E-03
<i>H₂L</i>	15.5910	\pm	0.0056	6.7270		
<i>H₃L</i>	18.2710	\pm	0.0039	2.6800		

Para verificar si los valores obtenidos son iguales a los reportados anteriormente, se realizaron pruebas de hipótesis para cada uno. Se utilizó el valor reportado por Aguilar-Hernández como referencia para la comparación de las medias, con los resultados obtenidos en cada uno de los tres experimentos. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

$$H_0: \mu_i = \mu_{\text{ref}}$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_{\text{ref}}$$

Siendo μ_i los valores de log β obtenidos en el presente trabajo (los tres resultados obtenidos), y μ_{ref} el valor reportado por Aguilar-Hernández (**Tabla A1-2**).

La hipótesis alterna se plantea de esta forma ya que queremos saber si los resultados son diferentes.

$$\text{La Hipótesis nula se rechaza si } t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$$

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla A1-3. Resultados de las pruebas de hipótesis para los log β obtenidos para el compuesto LQM314.

	μ_i promedio	Incertidumbre	μ_{ref}	t_{exp}	t_{tablas}	Decisión	Conclusión
log β_3	9.3253	0.489	8.8640	4.058	4.303	Se acepta H_0 , $\alpha = 0.05$	Los valores de log β_3 son iguales
log β_2	15.9281	1.353	15.5910	1.072	4.303	Se acepta H_0 , $\alpha = 0.05$	Los valores de log β_2 son iguales
log β_1	18.7764	1.214	18.2710	1.791	4.303	Se acepta H_0 , $\alpha = 0.05$	Los valores de log β_1 son iguales

Estos resultados indican que los valores obtenidos de log β_3 , log β_2 y log β_1 se confirman, a pesar de no haber obtenido una estadística tan buena como la de Aguilar-Hernández, y de que a simple vista el valor de log β_3 sea un poco mayor al tomado como referencia. Pero de acuerdo a las pruebas de hipótesis se concluye que todos los valores son iguales. Las diferencias existentes entre los resultados del presente trabajo y los expuestos por Aguilar-Hernández pueden deberse a la diferencia de lote del compuesto trabajado.

Estas pruebas se llevaron a cabo para evaluar la calidad del compuesto, y con la determinación de valores de pKa's estadísticamente iguales se confirma su identidad. Se realizó también una prueba de identidad del sólido por espectroscopia de infrarrojo y el perfil obtenido muestra los picos característicos mencionados por Escutia-Calzada, 2011.