



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA AUTO ASOCIACIÓN DE LA CASIOPEÍNA III-IA EN
DISOLUCIÓN ACUOSA**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

ALEJANDRO MARÍN MEDINA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Ernesto Carrillo Nava**

VOCAL: **Profesor: Luis Fernando Olguín Contreras**

SECRETARIO: **Profesor: María Guadalupe Lemus Barajas**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Juvenal Flores De la Rosa**

2°. SUPLENTE: **Profesor: Juan Carlos García Ramos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 303 de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ernesto Carrillo Nava

SUSTENTANTE:

Alejandro Marín Medina

“En la ciencia, como en la vida, el fruto viene siempre después del amor”

Santiago Ramón y Cajal

Médico Español (1852 – 1934)

Este trabajo fue presentado en:

- Jornada de la investigación de la Facultad de Química, el 9 de octubre del 2015 en la Facultad de Química. En la modalidad de cartel.
- 1er Simposio en Química Inorgánica y Medicinal, el 13 de noviembre del 2015 en la ciudad de Taxco, Guerrero. En la modalidad de exposición oral.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido	4
Resumen	7
Hipótesis y Objetivos	8
Capítulo 1 Introducción	9
1.1 Características y propiedades de las Casiopeínas.....	10
1.1.1 Casiopeína III-ia.....	12
Capítulo 2 Antecedentes generales	14
2.1 Descripción teórica de la formación de agregados en disolución.....	15
2.2 Técnicas experimentales.....	16
2.2.1 Calorimetría de titulación isotérmica.....	16
2.2.1.1 Funcionamiento e instrumentación.....	17
2.2.1.2 Interacciones molécula-molécula.....	19
2.2.1.3 Interacciones homodiméricas.....	20
2.2.2 Conductimetría.....	21
2.2.2.1 Transporte eléctrico.....	22
2.2.2.2 Electrolitos.....	24
2.2.2.3 Conductividad en disoluciones iónicas.....	26
2.2.2.4 Disociación electrolítica y ley de Kohlrausch.....	30
2.2.2.5 Aproximaciones al cálculo.....	34
2.2.2.6 Estudio de la formación de agregados por conductimetría.....	36
2.2.3 Mediciones de la tensión superficial.....	38

2.2.3.1 Energía superficial y tensión superficial.....	38
2.2.3.2 Tensión superficial en líquidos puros.....	39
2.2.3.3 Tensión superficial como función de la temperatura.....	40
2.2.3.4 Tensión superficial en disoluciones.....	41
2.2.3.5 Método del anillo de Du Noüy para medir la tensión superficial.....	42
2.2.4 Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	44
2.2.4.1 Relaciones fundamentales.....	45
2.2.4.2 Instrumentación.....	46
2.2.4.3 Condiciones operatorias.....	47
2.2.4.4 Aplicaciones de la espectrofotometría ultravioleta y visible y ley de Lambert Beer Bouguer.....	48
2.2.5 Dispersión de la luz.....	51
2.2.5.1 Dispersión de la luz dinámica.....	52
2.2.5.2 Dispersión de la luz estática.....	54
2.2.5.3 Instrumentación y condiciones operatorias.....	57
Capítulo 3 Experimental.....	59
3.1 Materiales, disoluciones e instrumentos.....	60
3.2 Calorimetría de titulación isotérmica.....	61
3.3 Conductimetría.....	61
3.4 Mediciones de tensión superficial.....	62
3.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	62
3.6 Dispersión de la luz dinámica y estática.....	63

Capítulo 4	Resultados y discusión	64
4.1	Calorimetría de titulación isotérmica	65
4.2	Conductimetría	68
4.3	Mediciones de tensión superficial	72
4.4	Espectrofotometría ultravioleta y visible	75
4.5	Dispersión de la luz dinámica	78
4.6	Dispersión de la luz estática	83
Capítulo 5	Conclusiones y expectativas	85
5.1	Conclusiones	86
5.2	Expectativas	86
	Referencias	88

Resumen

A partir de estudios con diferentes técnicas experimentales empleadas para determinar la presencia de agregados en disolución como lo son: calorimetría de titulación isotérmica, conductimetría, mediciones de la tensión superficial, espectrofotometría ultravioleta y visible y dispersión de la luz, se ha demostrado que el compuesto [Cu(4, 4'- dimetil- 2, 2'- bipyridina)(acetilacetonato)H₂O]NO₃ (Casiopeína III-ia), miembro de una prometedora familia de compuestos de nueva generación para el tratamiento de cáncer, es capaz de auto asociarse en medios acuosos.

Se presentan los resultados en los que el compuesto es disuelto en agua pura y en un medio amortiguado de fosfatos que simula las condiciones fisiológicas. A partir de los resultados de calorimetría de titulación isotérmica se reporta la constante de disociación de los agregados, K_D , el cambio en entalpía por disociación, ΔH_D , el cambio en la energía libre de Gibbs por disociación, ΔG_D , el cambio en entropía por disociación, ΔS_D , y el número de monómeros, n , que participan en la formación del agregado. Mientras que de los resultados de conductividad se reporta K_D y n . De las mediciones de la tensión superficial, conductividad eléctrica y espectrofotometría ultravioleta y visible se reporta la concentración de agregación crítica (cac). De las mediciones de dispersión de la luz dinámica se aporta el diámetro hidrodinámico de los agregados y de las mediciones de dispersión de la luz estática se determinó el peso molecular de los agregados de Casiopeína III-ia y calcular el número de monómeros que participan en la formación de los agregados. Para todas las técnicas en las que se determinó el número agregación se encontró un valor de $n = 2$.

Hipótesis

La formación de agregados en disolución modifica ciertas propiedades fisicoquímicas como: el calor de dilución, la conductividad eléctrica, la tensión superficial, la absorbancia y la luz dispersada.

Objetivos

Estudiar la formación de los agregados de la Casiopeína III-ia en disoluciones acuosas, obtener toda la información termodinámica del proceso de disociación de los agregados, la concentración a la cual se forman, el tamaño de los mismos y el número de monómeros que participan en la formación de dichos agregados utilizando diferentes técnicas experimentales.

Capítulo 1
Introducción

1.1 Características y propiedades de las Casiopeínas

En las últimas décadas los compuestos de coordinación con centro metálico han ganado un creciente interés como productos farmacéuticos para su uso como agentes de diagnóstico o como fármacos quimioterapéuticos.^[1-3] En este campo, una de las principales tareas es el desarrollo de compuestos con actividad anticancerígena que posean un centro metálico diferente al platino, algunos ejemplos son: Sn [IV], Ti [IV], Au [III], Ru [II], Ru [III], Pd [II], Rh [I] y Cu [II].^[4-20] Estos compuestos tienen que satisfacer una serie de requisitos, como tener la toxicidad más baja posible, aumentar su actividad con respecto a compuestos ya conocidos y desde luego reducir los costos de producción.^[21]

A finales de la década de los 80's el grupo de investigación dirigido por la doctora Lena Ruíz perteneciente al departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM trabajaba sintetizando compuestos de coordinación de cobre (II),^[22] los cuales debido a sus propiedades particulares fueron registrados y patentados en la década de los 90's bajo el nombre de Casiopeínas.^[23, 24]

Las Casiopeínas son compuestos de coordinación mixtos que en su estructura involucran ligantes bidentados con átomos donadores de nitrógeno y oxígeno los cuales tienen como fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, donde (N-N) = X-fenantrolina o X-bipiridina, (O-O) = acetilacetato y (N-O) = α -aminoacido o péptido, donde el átomo de cobre está formando cinco enlaces de coordinación, un par con cada ligante bidentado y uno extra con una molécula de agua. Sus estructuras generales se muestran en la figura 1.1.

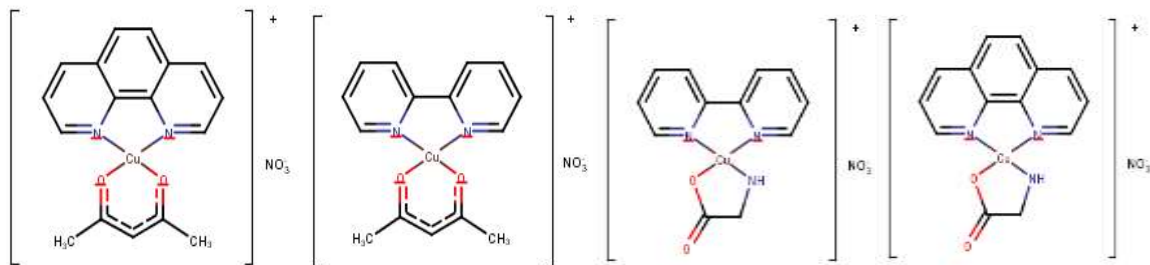


Figura 1.1. Estructuras generales de las Casiopeínas. Todas las estructuras presentan una molécula de agua coordinada con el cobre, la cual no se muestra en estas estructuras.

Actualmente estos compuestos suman más de cien los cuales están englobados en familias mostradas en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Clasificación de las Casiopeínas (adaptada).^[22]

Clave	Formula general
Casiopeína I	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{N-O})^{\text{a}}\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína II	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína III a	$[\text{Cu}(\text{N-N})^{\text{b}}(\text{acetilacetato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína III s	$[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{salicilaldehidato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína IV	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína V	$[\text{Cu}(5,6\text{-R-1,10-fenantrolina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína VI	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína VII	$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína VIII	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína IX	$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$
Casiopeína X	$[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{péptido})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$

a. N-O = α -aminoacidato.

b. N-N = R-1,10-fenantrolina o R-2,2'-bipiridina.

Las propiedades y características especiales de las Casiopeínas es que su diseño cumple con algunos postulados establecidos por Rosenberg de acuerdo con la evidencia experimental que obtuvo estudiando el *cis*-platino,^[25] compuesto popular en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer, los cuales a grandes rasgos son:

- Tener ligantes que favorezcan una configuración *cis* en la esfera de coordinación del metal.
- La fuerza de enlace de los ligantes al centro metálico debe ser diferente, uno debe estar fuertemente enlazado, mientras que el otro o los otros deben tener fuerza que facilite su intercambio por biomoléculas.
- La molécula en cuestión debe ser neutra.

La síntesis y diseño de las Casiopeínas se hizo tomando en cuenta estas características y un extra más, el uso de un metal que se encuentre en el cuerpo humano de manera esencial, como lo es el cobre, realizando funciones biológicas como reacciones redox en las que el cobre reacciona directamente ya sea con el oxígeno molecular o H_2O_2 para producir radicales libres.^[26] La toxicidad de cobre proviene de su capacidad para producir especies reactivas de

oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species). Sin embargo, el cuerpo tiene un mecanismo natural de eliminación disminuyendo así su toxicidad, puede desplazar a otros iones metálicos, participar en la peroxidación lipídica y/o unirse directamente al ADN y ARN,^[27, 28] y otra ventaja al ser un metal abundante en el planeta es más barato que algunos ejemplos mencionados anteriormente lo cual generaría un gasto menor de producción.

Las Casiopeínas han sido sometidas a diversas caracterizaciones, no solo estructurales,^[29] sino también de constantes de formación, estabilidad en disolución,^[30] estudios teóricos,^[21, 31] parámetros electroquímicos^[21] y mecanismos de reacción anticancerígenos.^[32] Por otra parte en cuanto a los estudios de su interacción con macromoléculas se tiene resultados en cuanto a la interacción con el ADN,^[28] adenina, guanina, citosina y tirosina^[33] y la sustitución del ligante acetilacetato por metionina (aminoácido esencial).^[34]

Las pruebas para la evaluación de la actividad de las Casiopeínas mediante modelos biológicos *in vivo* e *in vitro* no se han quedado atrás puesto que se ha demostrado que tienen actividad citotóxica, antineoplásica y citostática.^[35, 36] Se cuenta también con estudios en células CH1 donde se demostró muerte celular por apoptosis,^[37] mientras que en células de glioma C6 se observó inhibición de la proliferación celular, un incremento en la producción de especie reactivas con el oxígeno y la inducción de apoptosis,^[38] estudios de hemotoxicidad en ratas,^[39] producción de especies reactivas de oxígeno,^[40, 41] la demostración de que algunas Casiopeínas inhiben la respiración celular y la síntesis de ATP^[42] y que esta es dependiente de la concentración, por lo que se han generados métodos de cuantificación cromatográficos para su detención.^[43, 44] Aunque se presentan solo algunos ejemplos de los estudios realizados a estos compuestos se puede notar la gran cantidad de conocimiento que se ha generado y el que falta por generar. La Casiopeína que se caracterizó por su capacidad para formar agregados en disolución acuosa pertenece a la familia III y se describe en el siguiente apartado.

1.1.1 Casiopeína III-ia

La Casiopeína III-ia (Figura 1.2) es uno de los compuestos del grupo de las Casiopeínas más prometedor para ser usado como fármaco quimioterapéutico o agente de diagnóstico y como consecuencia es uno de los más estudiados. Actualmente se encuentra en la fase 1 de

ensayos clínicos. Aunque su mecanismo de acción a nivel molecular no se conoce con gran detalle, varios resultados experimentales establecen dos factores principales para la inducción citotóxica sobre las células tumorales humanas: i) la generación de especies reactivas del oxígeno y ii) la interacción directa con el ADN.^[45, 46]

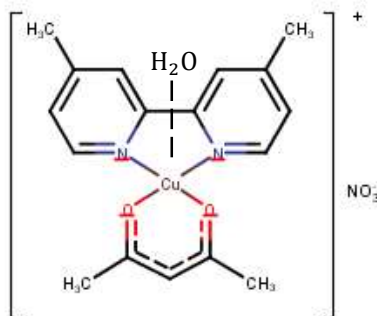


Figura 1.2. Compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-ia).

El objetivo de los estudios relacionados con las interacciones específicas de las Casiopeínas con dianas biológicas importantes, tales como el ADN o proteínas, es guiar un desarrollo inteligente de fármacos con una mayor especificidad y la reducción de efectos secundarios indeseables.

Al inicio de este trabajo y durante el curso de los estudios que implican la formación de complejos de proteína (HSA por sus siglas en inglés, Human Serum Albumin) con Casiopeína III-ia. Se encontró que a las concentraciones a las que se estaban llevando a cabo los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica, la Casiopeína III-ia era capaz de auto asociarse en el medio amortiguado empleado para simular las condiciones fisiológicas, una característica que no había sido identificada. Por tanto, es de interés determinar la concentración de agregación crítica, cac , la constante de equilibrio de la disociación, K_D , la información termodinámica asociada al proceso de disociación y el número de monómeros, n , que participan en el agregado utilizando diferentes técnicas experimentales.

Capítulo 2
Antecedentes generales

2.1 Descripción teórica de la formación de agregados en disolución

La formación de agregados en disolución, cuando el monómero participante tiene una carga eléctrica con valor 1+, se puede expresar como un equilibrio y como consecuencia tendrá una constante de formación, descrita por las siguientes ecuaciones:^[47]



$$K_A = \frac{\gamma_A}{(\gamma_m)^n} \times \frac{C_A}{(C_T - nC_A)^n} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde:

m^+ : monómero.

$(m_n)^{n+}$: agregado.

n : número de agregación.

K_A : constante de equilibrio.

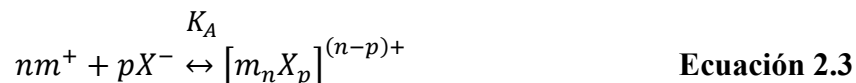
γ_A : coeficiente de actividad del agregado.

γ_m : coeficiente de actividad del monómero.

C_A : concentración del agregado.

C_T : concentración total de compuesto en la disolución.

Si el contraión participa en la formación del agregado las ecuaciones 2.1 y 2.2 se modifican como:^[48]



$$K_A = \frac{\gamma_A}{(\gamma_m)^n (\gamma_X)^p} \times \frac{C_A}{(C_T - nC_{cac*})^n (C_T - pC_A)^p} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

donde:

X^- : contraión.

p : número de aniones que participan en el agregado.

γ_X : coeficiente de actividad del contraión.

Para este trabajo se consideró que el contraión no participa en la formación de los agregados.

2.2 Técnicas experimentales

Toda vez que la formación de agregados en disolución causa cambios en las propiedades fisicoquímicas de la disolución como el calor de dilución, la conductividad eléctrica, la tensión superficial, la absorbancia y la luz dispersada como función de la concentración total del compuesto en disolución.^[49] Se escogieron las siguientes técnicas experimentales para estudiar la formación de los agregados de la Casiopeína III-ia en disoluciones acuosas.

- Calorimetría de titulación isotérmica.
- Conductimetría.
- Mediciones de tensión superficial (método del anillo de Du Noüy).
- Espectrofotometría ultravioleta y visible.
- Dispersión de la luz dinámica y estática.

2.2.1 Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés, Isothermal Titration Calorimetry) es una técnica experimental que permite determinar cuantitativamente y de manera directa el calor liberado o adsorbido durante un proceso o reacción química, que a presión constante es el cambio de entalpía (ΔH) del sistema. Ya que en cualquier proceso químico existe un cambio en energía, esta técnica permite el estudio de diversos sistemas y como consecuencia su aplicación en distintas áreas de investigación como: química, física, farmacia, bioquímica, biofísica y biofisiológica, así como en industrias alimentarias y de cosméticos.

En cuanto a las áreas químicas y biológicas esta técnica es aplicable al estudio de interacciones intermoleculares e intramoleculares de biomoléculas^[50] en el estudio de las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-ARN y en moléculas de menor peso molecular para el estudio de la formación de especies autoasociables en disolución con estructuras definidas, como micelas^[51] o liposomas,^[52] y sin estructura definida,^[47, 48] las cuales son de interés para este trabajo.

Si el efecto térmico neto de la interacción, en cualquiera de los sistemas mencionados anteriormente, es suficientemente grande se puede determinar la estequiometría, la entalpía de formación y la constante de unión o disociación del proceso de estos complejos moleculares. Consecuentemente, se puede calcular la energía libre de Gibbs del complejo.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Ecuación 2.5}$$

y por último la entropía del proceso,^[53]

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

2.2.1.1 Funcionamiento e instrumentación

La figura 2.1 muestra un esquema de un calorímetro de titulación isotérmica que funciona por compensación de potencia. La señal obtenida es directamente proporcional a la potencia requerida para mantener una diferencia de temperatura entre la celda de referencia y la celda de reacción igual a cero.^[54] Estas dos celdas se encuentran dentro de una cámara adiabática en la unidad del calorímetro. La celda de referencia únicamente contiene el medio en el que se llevara a cabo la reacción (disolución amortiguadora, disolvente orgánico, disolución salina, disolución con sustrato, disolución con proteína o simplemente agua), es decir, todo menos el analito. Mientras que en la celda de reacción estará contenido el medio de reacción y mediante una jeringa especializada, la cual además funciona como agitador para mantener

homogéneo el sistema durante la titulación, se hacen adiciones escalonadas del analito (también en disolución) como función del tiempo. Este tiempo dependerá de la cinética de la reacción o proceso, el cual debe ser seleccionado por el analista mediante experimentos exploratorios.

El sistema calorimétrico mantiene la celda de referencia a una temperatura constante, seleccionada por el analista, mientras se aplica una potencia constante a la celda de reacción para activar un mecanismo de control por retroalimentación cuyo propósito es mantener la $\Delta T = 0$. Toda vez que la reacción se lleva a cabo en la celda denominada de reacción, el sistema aplica a esta una potencia o se deja de aplicar dependiendo de si el proceso es endotérmico o exotérmico, respectivamente. El cambio en energía es registrado por una computadora observando una señal característica con forma de pico. El área bajo este pico corresponde al calor liberado o absorbido durante el proceso después de cada inyección.^[55]

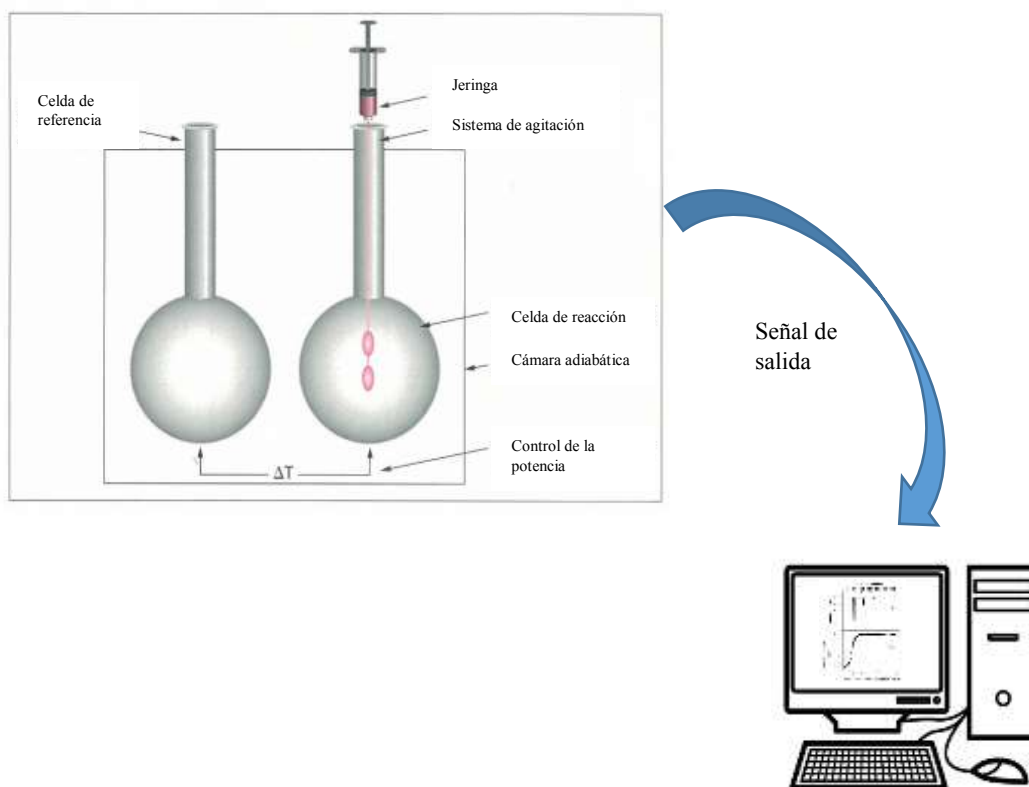


Figura 2.1. Esquema de las celdas y procesador de datos de un calorímetro de titulación isotérmica (adaptada).^[50]

Hoy en día los calorímetros de titulación isotérmica son simples de usar, compactos y son controlados desde una computadora, tienen una alta sensibilidad y es posible obtener la caracterización termodinámica de un sistema en un corto tiempo.^[55]

2.2.1.2 Interacciones molécula-molécula

El estudio de las interacciones intermoleculares entre moléculas similares tiene como base una asociación química reversible y puede ser entre moléculas idénticas o diferentes:^[55]



donde M_1 y M_2 son las moléculas que van interactuar. La fuerza de interacción estará descrita por una constante de asociación K_A o de disociación K_D :

$$K_A = \frac{[M_1M_2]}{[M_1][M_2]} = \frac{1}{K_D} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

donde $[M_1]$ y $[M_2]$ son las concentraciones libres y $[M_1M_2]$ es la concentración del agregado. Esta constante se puede asociar directamente con la energía libre de Gibbs de asociación, ΔG_A , y de disociación, ΔG_D , las cuales se pueden escribir en términos del cambio en entalpía, ΔH , y en entropía, ΔS , del proceso:

$$\Delta G_A = -RT \ln K_A \quad \text{Ecuación 2.9}$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D \quad \text{Ecuación 2.10}$$

donde:

R: constante de los gases ideales, [8.314 J mol⁻¹ K⁻¹].

T: temperatura absoluta, [K].

2.2.1.3 Interacciones homodiméricas

La auto asociación de una molécula que conduce a la formación de homodímeros se le puede medir la fuerza de la interacción mediante experimentos de dilución. Una disolución de reactivo se coloca en la jeringa mientras que el disolvente sin el reactivo se encuentra en la celda calorimétrica. La adición gradual de la disolución con la jeringa de inyección en la celda trae como consecuencia la dilución de la molécula, promoviendo el proceso de disociación (lo que lleva el sistema a través de una secuencia de equilibrio de estados) y la composición de cada uno de ellos esta dictada por la constante de disociación K_D . Dada la concentración total de la molécula $[M]_T$ en la celda del calorimétrico, la constante de disociación determina la división entre los monómeros $[M]$ y el dímero $[M_2]$:^[55]

$$K_D = \frac{[M]^2}{[M_2]} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

El calor q_i asociado con cada adición es proporcional al aumento de monómero $[M]$ en la celda del calorímetro después de la adición i :^[55]

$$q_i = V\Delta H_D \left([M]_i - [M]_{i-1} - F_0[M]_0 \frac{v}{V} \right) \quad \text{Ecuación 2.12}$$

donde:

ΔH_D : entalpía de disociación por monómero.

V : volumen en la celda del calorímetro la calorimétrico.

v : volumen de adición.

$[M]_0$: concentración total de molécula por monómero en la jeringa.

F_0 : fracción de monómero en la disolución concentrada colocada en la jeringa.

El último término en el paréntesis es una corrección que tiene en cuenta el incremento de la concentración de monómero en la celda debido a la inyección de monómeros de la jeringa y, por lo tanto, no contribuyen al calor. A medida que la concentración de molécula en la celda calorimétrica aumenta progresivamente, el proceso de disociación es menos favorecido y la secuencia de adiciones procede hasta que no se detecte ningún calor significativo. En todo el experimento la concentración total de reactivo $[M]_T$ es conocida. El análisis de regresión no lineal del q_i , permite la estimación de los parámetros termodinámicos K_D y ΔH_D , y por lo tanto, ΔG_D y ΔS_D .^[55]

2.2.2 Conductimetría

El estudio del conjunto de eventos que ocurren en disoluciones iónicas al ser sometidas a un campo eléctrico alterno, así como su aplicación en la caracterización de los fenómenos en disolución y el monitoreo de especies, constituye una parte fundamental del análisis electroquímico, conocido como conductimetría.^[56]

Así, las aplicaciones de la conductimetría pueden agruparse en dos grandes áreas de estudio:

- Estudio de los fenómenos en disolución: disociación electrolítica, equilibrio químico y formación de agregados moleculares iónicos.^[49]
- Cuantificación y monitoreo de especies en disolución: curvas de calibración y titulaciones volumétricas con monitoreo conductimétrico.

Es posible generalizar los fenómenos gracias a leyes fisicoquímicas ya establecidas: la ley de Kohlrausch de la migración independiente de iones y la ley de dilución de Ostwald.^[57] Puesto que su conocimiento permite establecer las condiciones adecuadas de trabajo experimental.

Mientras que la predicción cuantitativa de los fenómenos puede llevarse a cabo gracias a que actualmente es posible encontrar en la literatura datos de parámetros termodinámicos tales como los valores de conductividad molar límite de diversos iones, tanto en disolución

acuosa como no acuosa. Por lo que si se domina la información y se controlan las condiciones operatorias es posible correlacionar la información experimental con los principios teóricos con gran precisión.

En general, la práctica de la conductimetría no especializada requiere de las siguientes condiciones de trabajo experimental:

- Concentraciones bajas de los analitos, pues a concentraciones elevadas, se hace necesario efectuar correcciones al evaluarse los coeficientes de actividad.
- La imposición de potencial alterno (con una frecuencia de 60 a 1000 Hz) se efectúa por medio de electrodos inatacables e indistinguibles, (por ejemplo de platino, acero inoxidable o carbón) de posición fija. Esta característica evita que se experimenten reacciones electroquímicas.
- Control adecuado de la temperatura, sobre todo si se persigue la determinación de parámetros termodinámicos.

2.2.2.1 Transporte eléctrico

La corriente eléctrica se puede definir como la cantidad de carga eléctrica que pasa por cualquier punto de un conductor por unidad de tiempo. Es posible describir a la densidad de corriente como la corriente que pasa a través de un área perpendicular a la dirección de esta.^[57]

$$j = I/A \quad \text{Ecuación 2.13}$$

Mientras que la densidad de corriente en un contexto unidireccional es proporcional al gradiente de potencial interno:

$$j = -k \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \quad \text{Ecuación 2.14}$$

El término k es la constante de proporcionalidad, tiene unidades de $\Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$ y recibe el nombre de conductividad. El inverso de la conductividad es la resistividad, ρ , y ambas son características de cada conductor. Es posible utilizar la definición de campo eléctrico, $E = -\left(\frac{\partial\varphi}{\partial x}\right)$, y sustituirla en la ecuación 2.14 obteniendo así la ley de Ohm.

$$j = kE \quad \text{Ecuación 2.15}$$

O lo que sería lo mismo una expresión que haga uso de la resistividad:

$$\rho j = E \quad \text{Ecuación 2.16}$$

Si se considera un conductor eléctrico de longitud l , con área transversal A , en cuyos extremos se manifieste una diferencia de potenciales interno, $\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$; entonces el campo eléctrico puede ser expresado como $E = \frac{\varphi_2 - \varphi_1}{l} = \frac{\Delta\varphi}{l}$. Esta última expresión se sustituye en la ecuación 2.15, a la par de la densidad de corriente, ecuación 2.13 y se despeja la corriente.

$$I = \left(\frac{kA}{l}\right) \Delta\varphi \quad \text{Ecuación 2.17}$$

Los términos en la ecuación 2.17 se agrupan para definir la conductancia, $L = \frac{kA}{l}$, con unidades de Ω^{-1} .

$$I = L\Delta\varphi \quad \text{Ecuación 2.18}$$

La forma más convencional de expresar la ley de Ohm se obtiene de la ecuación anterior, dado que la conductancia es el inverso de la resistencia, $L = R^{-1}$.

$$IR = \Delta\varphi \quad \text{Ecuación 2.19}$$

Considerando que las ecuaciones 2.17 y 2.19 se puede explicar la resistencia en términos de A y l .

$$R = \frac{l}{kA} = \frac{\rho l}{A} \quad \text{Ecuación 2.20}$$

Por lo tanto se puede concluir que la resistencia es dependiente de la geometría del conductor. Si este último aumenta su longitud la resistencia aumenta. Por lo contrario si se engrosa la resistencia disminuye. Por otro lado las expresiones que utilizan la conductancia o la resistividad reflejan propiedades inherentes al material y son útiles dado que no dependen de la geometría del conductor.^[57]

2.2.2.2 Electrolitos

La conductividad en disoluciones iónicas es algo más complejo que en los metales donde el transporte de carga se lleva a cabo por electrones de masa despreciable, mientras que en disoluciones iónicas la conducción se realiza por el movimiento de iones positivos y negativos, en consecuencia hay un aporte de transporte de materia además de que no todos los iones transportan igual cantidad de corriente, generando así un gradiente de concentración en la solución.^[57]

Las disoluciones iónicas se comportan como conductores eléctricos bajo un campo eléctrico debido a que conducen cargas, gracias al transporte de éstas por la presencia de los iones en el medio, es decir, al medio iónico. Los medios iónicos pueden estar formados por:

- Electrolitos verdaderos o ionóforos: Son sustancias que en estado puro están formadas por iones unidos por fuerzas electrostáticas, en una red cristalina bien definida. Estas sustancias no necesitan interaccionar con otras para estar en forma ionizada. Tal es el caso de los haluros de metales alcalinos.
- Electrolitos potenciales o ionógenos: Son sustancias que en estado puro no están ionizadas, o bien presentan una ionización despreciable. Estas sustancias por si solas, no producen un medio iónico, por lo que necesitan interaccionar con un ionóforo, o bien con otro ionógeno para generar un medio iónico adecuado.

En electroquímica, los medios iónicos de interés están constituidos por la combinación de dos o más electrolitos y se conocen como disoluciones electrolíticas. Éstas se forman por la combinación de:

a) Uno o varios electrolitos verdaderos, disueltos en un electrolito potencial líquido, generalmente un disolvente disociante. El medio conductor se genera por la separación de la red cristalina iónica debido a las propiedades eléctricas del disolvente (interacción fisicoquímica); tal es el caso de una disolución de NaCl en agua.

b) Uno o varios electrolitos potenciales, disueltos en un electrolito potencial líquido, generalmente un disolvente disociante. El medio conductor se genera por el intercambio de partículas en disolución, generando iones con una cuantitatividad determinada por la fuerza relativa de los donadores y receptores (interacción química); tal es el caso de los ácidos y las bases no niveladas en el agua.

c) Uno o varios electrolitos verdaderos, disueltos en un electrolito verdadero. El medio iónico lo proporcionan los mismos iones que constituyen los componentes mezclados.

En agua, las disoluciones electrolíticas pueden clasificarse de la manera siguiente:

a) Disoluciones de electrolitos verdaderos o ionóforos, en éstas los electrolitos están totalmente disociados.

b) Disoluciones de electrolitos potenciales o ionógenos, en las cuales los electrolitos pueden encontrarse casi totalmente disociados (electrolitos fuertes); disociados muy poco

(electrolitos débiles); o bien presentar una disociación moderada (electrolitos de fuerza media).

En la literatura se encuentra que la clasificación de los electrolitos incluye dentro de los electrolitos fuertes a los verdaderos. Dicha clasificación no es muy conveniente, ya que no considera las reacciones químicas entre el soluto y el disolvente. La clasificación presentada arriba obedece a criterios de estructura química por lo que es más general y no excluye todas las posibilidades de interacciones entre los electrolitos, tanto químicas como fisicoquímicas.^[56]

2.2.2.3 Conductividad en disoluciones iónicas

La conductimetría se basa en el hecho de que las soluciones electrolíticas se comportan como conductores eléctricos donde los iones en solución son los responsables del transporte de carga. Como un conductor obedece a la ley de Ohm, dicha conducción se verifica en el volumen de solución delimitado por la distancia entre dos electrodos de posición fija. Esta condición experimental se cumple en arreglos denominados celdas conductimétricas, como se observa en la figura 2.2.

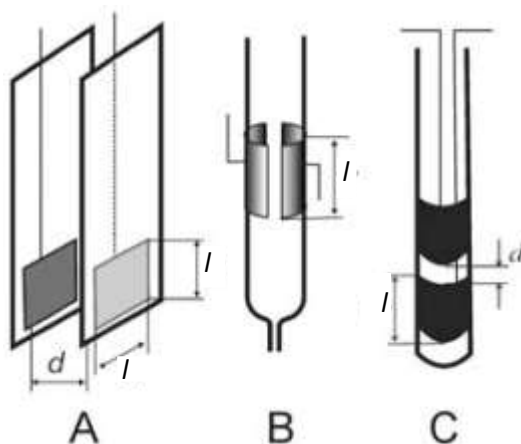


Figura 2.2. Celdas para determinaciones conductimétricas. Donde d es la separación entre los electrodos y l la longitud geométrica del electrodo. A es una celda con electrodos planos orientados uno frente al otro, B representa una celda para mediciones en flujo con electrodos semitubulares en la pared del tubo y C es una celda de inmersión con electrodos cilíndricos colocados uno seguido del otro (adaptada).^[58]

La resistencia eléctrica de una disolución se mide con una celda conductimétrica montada sobre un puente de Wheatstone para corriente alterna con una frecuencia aproximada de 1 MHz para así evitar los efectos de electrólisis al impedir que los electrodos se polaricen puesto que en cada semiperiodo cada electrodo se comportará como ánodo y después como cátodo cada 1/500 segundos.^[59] En estas condiciones la identidad de cada electrodo cambiará con la suficiente rapidez para eliminar efectos de difusión, haciéndose despreciable la polarización electroquímica.

La medida con una celda conductimétrica está dada por:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad \text{Ecuación 2.21}$$

donde:

R : resistencia eléctrica de la disolución, [Ω].

ρ : resistividad eléctrica de la disolución, [$\Omega \text{ cm}$].

l : longitud entre los electrodos, [cm].

A : área traslapable de los electrodos, [cm^2].

La relación longitud/área es característica de cada arreglo de electrodos y se denomina constante de celda conductimétrica, k_{celda} . Es muy importante la integridad de esta entidad durante un experimento si se desea precisión en los resultados.^[60]

Se define la conductancia como el inverso de la resistencia de la solución, $L = R^{-1}$, y la conductividad específica como el inverso de la resistividad, $\kappa = \rho^{-1}$. Las unidades de la conductancia están dadas en siemens, $S = \Omega^{-1}$, y la conductividad específica en $S \text{ cm}^{-1}$.

$$L = \frac{1}{R} = \frac{\kappa}{k_{\text{celda}}} \quad \text{Ecuación 2.22}$$

Experimentalmente la constante de celda se puede determinar indirectamente midiendo la resistencia cuando la celda conductimétrica contiene una disolución estándar de conductividad conocida. Para este fin suele utilizarse KCl $C_0 = 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ en disolución acuosa, dicha disolución presenta los siguientes valores de conductividad de acuerdo a la temperatura experimental (tabla 2.1).^[61] De manera práctica los fabricantes de conductímetros incluyen el valor de la constante de celda en las especificaciones de sus equipos, para así usar la disolución de KCl $C_0 = 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ para verificar la calibración del conductímetro. Sin embargo, es preferible usar diversas disoluciones de KCl de concentración conocida para la verificación de la calibración del conductímetro. La tabla 2.1 muestra como cambia la conductividad específica de la disolución de KCl de la misma concentración con la temperatura, por eso la importancia de controlarla.

Tabla 2.1: Valores de conductividad específica (κ) de KCl 0.01 mol L^{-1} a distintas temperaturas.

Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	$\kappa[\mu\text{S cm}^{-1}]$
18	1225
19	1251
20	1278
21	1305
22	1332
23	1359
24	1386
25	1413
26	1441
27	1468
28	1496
29	1524

Si R_{sp} es la resistencia (o cualquier otra medición eléctrica) de una celda conductimétrica que contiene una disolución patrón de conductividad conocida κ_{sp} , entonces:

$$k_{celda} = \frac{l}{A} = R_{sp} \kappa_{sp} \quad \text{Ecuación 2.23}$$

De modo que de acuerdo con la ecuación 2.22:

$$\kappa = \kappa_{sp} \left(\frac{R_{sp}}{R} \right) \quad \text{Ecuación 2.24}$$

La relación que existe entre la conductividad y la concentración se define por medio de la conductividad molar, como lo describe la relación siguiente:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C_0} \quad \text{Ecuación 2.25}$$

donde:

Λ : conductividad molar, [$\text{S cm}^{-2} \text{mol}^{-1}$].

C_0 : concentración molar, [mol L^{-1}].

En las expresiones anteriores es conveniente expresar las concentraciones en mol cm^{-3} para así simplificar las unidades de Λ . Si partimos de que $1 \text{ L} = 1000 \text{ cm}^3$ entonces, si dividimos la concentración entre 1000 se tendrá un adecuado análisis dimensional.^[62]

La relación de la resistencia eléctrica de una disolución electrolítica y la concentración del soluto iónico en disolución, se establece gracias a las ecuaciones 2.22 y 2.25:

$$\frac{1}{R} = L = \frac{\Lambda C_0}{k_{celda}} \quad \text{Ecuación 2.26}$$

De tal manera, que si se mide la conductancia o la resistencia de alguna disolución, es fácil calcular la conductividad de éstas por medio de la concentración y el valor de constante de celda:

$$\Lambda = \frac{Lk_{celda}}{C_0} = \frac{k_{celda}}{RC_0} \quad \text{Ecuación 2.27}$$

2.2.2.4 Disociación electrolítica y ley de Kohlrausch

Kohlrausch demostró empíricamente que la conductividad de las disoluciones de electrolitos verdaderos y fuertes varía linealmente con la raíz cuadrada de la concentración total del electrolito, $C_0^{1/2}$, según la siguiente relación:^[56, 57]

$$\Lambda = b - mC_0^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.28}$$

La ecuación anterior muestra el comportamiento típico de una línea recta cuya pendiente, m , es una constante que depende de la naturaleza del electrolito y la ordenada al origen, b , es un parámetro que representa la conductividad a dilución infinita, es decir, cuando $C_0 \rightarrow 0$.

Se establece el siguiente límite funcional:

$$\lim_{C_0 \rightarrow 0} \Lambda = \Lambda^\infty \quad \text{Ecuación 2.29}$$

Kohlrausch también demostró que para disoluciones muy diluidas cada ion constituyente del electrolito conduce cargas de manera independiente puesto que están lo suficientemente separados como para no interactuar entre ellos, por lo que la conductividad molar equivalente límite puede expresarse como la suma de los valores de conductividad molar límite de cada ion:



$$\Lambda^\infty = m\lambda_\infty^+ + x\lambda_\infty^- \quad \text{Ecuación 2.30}$$

Donde λ_∞ es la conductividad molar iónica límite de cada ion. Sus valores se encuentran registrados en la literatura para un número importante de cationes y aniones en diversos disolventes.

La relación de Kohlrausch se expresa de la siguiente manera, en analogía con la ecuación 2.28:

$$\Lambda = \Lambda^\infty - \mathcal{K}C_0^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.31}$$

donde:

Λ : conductividad molar, [$\text{S cm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$].

Λ^∞ : conductividad molar límite, [$\text{S cm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$].

\mathcal{K} : constante de Kohlrausch, [$\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ L}^{1/2}$] o [$\text{S cm}^{-1/2} \text{ mol}^{-3/2}$].

C_0 : concentración molar, [mol L^{-1}].

En el caso de los electrolitos de fuerza media o débil, es necesario considerar la concentración efectiva de los iones en disolución, ya que a diferencia de los electrolitos verdaderos la disociación iónica no es total.

La conductividad molar de electrolitos débiles desciende de manera abrupta con el aumento de la concentración. En la figura 2.3 se aprecia la representación gráfica de la conductividad molar en función de la raíz cuadrada de la concentración de diversos electrolitos.^[57] Para el ácido acético no es posible extrapolar la curva a un valor límite

definido, la gran pendiente que presenta ésta se debe al hecho de que la disociación de los electrolitos débiles aumenta de forma notable con la dilución, en consecuencia, aumentará también el número de iones capaces de transportar la corriente.

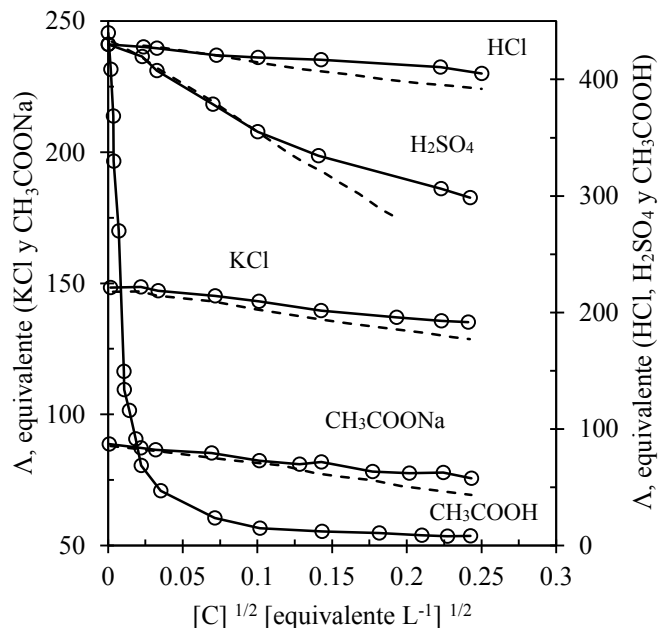


Figura 2.3: Conductividad equivalente de electrolitos fuertes y débiles en solución acuosa a 25 °C (adaptada).^[57]

La Ecuación 2.31 es válida siempre, con la condición de que se debe usar en la concentración molar efectiva de los iones, es decir, con αC_0 . De esta manera puede escribirse la ecuación de Kohlrausch para electrolitos potenciales.

$$\frac{\kappa}{\alpha C_0} = \Lambda^\infty - \mathcal{K} \alpha^{1/2} C_0^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.32}$$

Como el valor de α no se conoce *a priori*, es conveniente llamar Λ siempre al cociente de la conductividad específica y la conductividad molar, de esta manera se obtiene la siguiente relación.^[63]

$$\Lambda = \alpha\Lambda^\infty - \mathcal{K}\alpha^{3/2}C_0^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.33}$$

Debido a que α es función de C_0 , se tiene una función compleja de ésta que varía muy pronunciadamente en las proximidades de la dilución infinita. El problema del modelo reside en la complejidad matemática para determinar Λ^∞ .

La determinación de parámetros termodinámicos por métodos conductimétricos requiere de la intervención de otros postulados. Arrhenius sugirió que el grado de disociación de un electrolito estaba condicionado con la conductividad molar por:^[57]

$$\alpha = \frac{\Lambda}{\Lambda^\infty} \quad \text{Ecuación 2.34}$$

Ostwald por su parte empleó esta relación junto con la ley de acción de masas para explicar la variación de la conductividad molar de los electrolitos débiles con la concentración. Considerando la disociación de un electrolito de estequiometría 1:1, el grado de ésta estará condicionado a la concentración:

$$\frac{K_d}{C_0} = \frac{\alpha^2}{(1-\alpha)} \quad \text{Ecuación 2.35}$$

Sustituyendo la ecuación 2.34 en la ecuación 2.35 se obtiene:

$$K_d = \frac{C_0\Lambda^2}{\Lambda^\infty(\Lambda^\infty - \Lambda)} \quad \text{Ecuación 2.36}$$

La ecuación anterior se conoce como la ley de dilución de Ostwald. Aplicando los valores de Λ a varias concentraciones y el valor de Λ^∞ , se tiene que el lado derecho de la ecuación

2.36 es casi constante; en consecuencia, se tiene una forma razonable de determinar el valor de la constante de disociación de un electrolito débil. Un método alternativo para obtener K_d y Λ^∞ , para un electrolito débil, consiste en reordenar la ecuación 2.36:

$$K_d \Lambda^{\infty 2} - K_d \Lambda \Lambda^\infty = C_0 \Lambda^2 \quad \text{Ecuación 2.37}$$

Si se divide cada término entre $K_d \Lambda^{\infty 2}$ y trasladando el segundo término al lado derecho de la ecuación, se obtiene:

$$\frac{1}{\Lambda} = \frac{1}{\Lambda^\infty} + \frac{C_0 \Lambda}{K_d \Lambda^{\infty 2}} \quad \text{Ecuación 2.38}$$

Entonces, si se grafica $1/\Lambda$ en función de $C_0 \Lambda$, se obtiene una línea recta, con una ordenada al origen $1/\Lambda^\infty$ y una pendiente igual a $1/K_d \Lambda^{\infty 2}$. A partir de los valores de la pendiente y la ordenada al origen, pueden obtenerse los valores individuales de K_d y Λ^∞ . Este método requiere sólo los datos de conductividad del electrolito débil.^[60]

2.2.2.5 Aproximaciones al cálculo

Rigurosamente, el cálculo teórico de la conductividad de una disolución de un electrolito verdadero requiere del conocimiento del valor de Λ^∞ , así como la constante \mathcal{K} de la relación de Kohlrausch (Ecuación 2.31).

$$\kappa = C_0 \Lambda^\infty - \mathcal{K} C_0^{3/2} \quad \text{Ecuación 2.39}$$

Para disoluciones muy diluidas es posible despreciar el término de $\mathcal{K} C_0^{3/2}$ y confundir Λ con Λ^∞ .

Un ejemplo concreto para el KCl. El valor de la conductividad molar límite es de $149.8 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ y el valor de su constante de Kohlrausch es de $91.71 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ L}^{1/2}$, a 25°C . En la tabla 2.2 se observa el cálculo para Λ a diferentes concentraciones molares.^[56]

Tabla 2.2: Error entre valores de conductividad teóricos y reales.

Concentración [mol L ⁻¹]	$C_0^{1/2}$ [mol ^{1/2} L ^{1/2}]	Conductividad molar teórica, Λ [S cm ² mol ⁻¹]	Diferencia real $\Delta\Lambda = (\Lambda^\infty - \Lambda)$	% diferencia
0.0001	0.01	149.88	0.92	0.61
0.001	0.03	146.90	2.90	1.94
0.01	0.10	140.63	9.17	6.12
0.1	0.32	120.80	29.00	19.36

De los datos anteriores, se observa que a medida que la concentración aumenta, el valor de la conductividad molar de la disolución se aleja del valor de $\Lambda^\infty = 149.8 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Los valores de conductividad molar calculados con la ecuación de Kohlrausch son menores a los obtenidos experimentalmente, ya que no consideran los efectos de interacción ion – ion y ion – disolvente. Dicha influencia es predecible por la relación de Debye-Hückel-Onsager:

$$\Lambda = \Lambda^\infty - (\mathcal{A} + \mathcal{B}\Lambda^\infty)C_0^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.40}$$

Los valores de \mathcal{A} y \mathcal{B} son constantes determinadas empíricamente.

Para disoluciones diluidas, la diferencia entre el valor calculado con la relación de Kohlrausch y la relación de Debye-Hückel-Onsager no excede el 10%. Sin embargo, los valores determinados experimentalmente son mayores a los calculados con la ecuación más exacta (Ecuación 2.40), por lo que confundir Λ con Λ^∞ no implica errores significativos en la predicción de los valores de conductividad molar de las disoluciones electrolíticas. Es posible, en consecuencia, proponer la siguiente expresión:

$$\kappa = \Lambda^{\infty} M_m X_x C_0 = (m\lambda_+^{\infty} + x\lambda_-^{\infty}) C_0 \quad \text{Ecuación 2.41}$$

Si se conocen los valores de λ° molares o equivalentes, es posible calcular el valor de la conductividad de las disoluciones electrolíticas para predecir o explicar los fenómenos en disolución, involucrados en los diversos sistemas conductimétricos de caracterización, monitoreo y medida.^[56]

2.2.2.6 Estudio de la formación de agregados por conductimetría

La conductimetría como técnica para el estudio de la formación de agregados iónicos y moleculares tanto en disolución acuosa^[49, 64-66] como no acuosa^[67-69] limita su aplicación a compuestos^[47, 48, 70-72] y tensoactivos de carácter iónico.^[49, 66, 68, 69]

La razón por la cual es posible estudiar la formación de agregados en disolución con la técnica de conductimetría es que, el agregado y el monómero presentan diferencias significativas en cuanto a movilidad y carga. Por lo tanto la conductividad de la disolución se va a ver modificada por efecto de la formación de agregados. Entonces de un experimento donde se monitoree la conductividad de la disolución como función de la concentración total del compuesto (en cualquiera de sus modalidades, titulación o curva de calibración) se puede extraer la siguiente información fisicoquímica del proceso de agregación:

- Concentración de agregación crítica, cac , o concentración micelar crítica, cmc , si el agregado presenta forma micelar.
- Constante de formación del agregado, K_A .
- Número agregación, n .

En 1996 Streng y colaboradores^[47, 48] propusieron un modelo para el tratamiento de los datos experimentales de conductimetría para obtener la información fisicoquímica mencionada anteriormente de dos compuestos iónicos que forman agregados en disolución acuosa. En uno de sus trabajos^[47] desarrollan un modelo en el cual se toma en cuenta al contraión como participe del agregado y en otro de sus trabajos^[48] desarrollan el modelo donde el contraión no forma parte del agregado, lo cual simplifica mucho el ajuste de los datos.

El presente trabajo uso el modelo donde se presume que el contraión no es pieza del agregado para el tratamiento de los datos experimentales por lo que este se describe a continuación.

Se considera al monómero y al agregado como dos electrolitos distintos, por lo tanto la conductividad total de la disolución (κ_T) estará dada por la contribución de ambos como:

$$\kappa_T = \kappa_m + \kappa_A \quad \text{Ecuación 2.42}$$

donde:

κ_m : conductividad del monómero.

κ_A : conductividad del agregado.

Reescribiendo la ecuación 2.42 en términos de la conductividad molar (Λ):

$$\Lambda = \frac{\kappa}{c_T} = \frac{c_m}{c_T} \Lambda_m + \frac{c_A}{c_T} \Lambda_A = \frac{(c_T - n c_A)}{c_T} \Lambda_m + \frac{c_A}{c_T} \Lambda_A \quad \text{Ecuación 2.43}$$

donde:

Λ : conductividad molar total.

Λ_m : conductividad molar del monómero.

Λ_A : conductividad molar del agregado.

Si se considera que tanto el monómero como el agregado son electrolitos fuertes, entonces Λ_m y Λ_A se pueden expresar como funciones lineales de la raíz cuadrada de la concentración de C_m y C_A de acuerdo con la relación de Kohlrausch, ecuación 2.31, por lo tanto la ecuación 2.43 se puede reescribir como:

$$\Lambda = \frac{(c_T - n c_m)}{c_T} (a - b \sqrt{c_T - n c_A}) + \frac{c_A}{c_T} (a' - b' \sqrt{c_A}) \quad \text{Ecuación 2.44}$$

donde:

a : conductividad molar a dilución infinita del monómero.

b : constante para el monómero.

a' : conductividad molar a dilución infinita para el agregado.

b' : constante para el agregado.

En la ecuación 2.45 C_A es función de n y K_A como se definió en la ecuación 2.2, por lo que teóricamente los valores de K_A , n , a , b , a' y b' son obtenidos de un ajuste de mínimos cuadrados no lineal a los resultados experimentales de conductividad molar observada ($\Lambda_{obs.i}$) como función de la raíz cuadrada de la concentración total ($\sqrt{C_T}$).

2.2.3 Mediciones de la tensión superficial

A través de la determinación de la tensión superficial de una disolución, ya sea acuosa^[49] u orgánica,^[73] como función de la concentración de soluto es la manera más común de estudiar la formación de agregados. De los datos experimentales se puede obtener información termodinámica del proceso, así como la concentración de soluto a la cual se comienzan a formar dichos agregados. Conocida como concentración micelar crítica, si es que el agregado en el bulto de la disolución tiene una forma micelar, o concentración de agregación crítica si el agregado tiene otro arreglo geométrico.

2.2.3.1 Energía superficial y tensión superficial

Dentro del seno de un líquido alrededor de una molécula actúan atracciones casi simétricas. En la superficie, sin embargo, dicha molécula se encuentra sólo parcialmente rodeada por otras, tanto que la energía total de unión para una molécula que se encuentra en la superficie es aproximadamente 25% mayor a la energía para una molécula en el interior del líquido,^[57] y en consecuencia experimenta una atracción hacia el interior del líquido. Esta atracción tiende a jalar las moléculas superficiales hacia el interior, y al hacerlo el líquido se comporta como si estuviera rodeado por una membrana invisible. A este fenómeno se le conoce como tensión superficial (siempre y cuando se encuentre al líquido en contacto con su vapor).

Desde un punto de vista termodinámico, la tensión superficial, γ , puede considerarse como la tendencia de un líquido a disminuir su superficie hasta un punto en que su energía de superficie potencial es mínima, condición necesaria para que un equilibrio sea estable.^[74] La tensión superficial también se puede definir como la energía necesaria para aumentar el área de una superficie, por lo que estará expresada en unidades del Sistema Internacional como J m^{-2} , aunque comúnmente se reporta en la literatura como mN m^{-1} siendo estas unidades equivalentes.

2.2.3.2 Tensión superficial de líquidos puros

Las propiedades termodinámicas de un líquido están dictadas por la naturaleza de las fuerzas intermoleculares del líquido, por lo que para entenderlas e interpretarlas primero se debe entender la naturaleza de sus fuerzas intermoleculares.^[75] Por lo tanto la tensión superficial también estará en función de la naturaleza de las fuerzas intermoleculares del líquido puro.

La mayoría de los líquidos tanto orgánicos como inorgánicos presentan, a temperatura ambiente, valores de tensión superficial que oscilan entre los 15 y 50 mN m^{-1} . Mientras que el agua presenta un valor más alto, de 72.8 mN m^{-1} debido a las intensas fuerzas intermoleculares asociadas a los puentes de hidrógeno. Solo siendo superada por el mercurio, (metal líquido) ya que su tensión superficial es de aproximadamente 490 mN m^{-1} .^[75] La siguiente tabla muestra el valor de la tensión superficial de distintos líquidos a 25 °C.

Tabla 2.3: Tensión superficial de líquidos puros a 25 °C.^[77]

Líquido	γ [mN m ⁻¹]
Agua	72.82
Formamida	57.02
Anilina	42.67
Fenol	39.27
Piridina	37.21
Benceno	28.88
Tetracloruro de carbono	27.65
Ácido acético	27.59
Ciclohexano	25.24
Acetona	24.04
Acetato de etilo	23.97
n-butano	23.31
Ciclopentano	22.61

2.2.3.3 Tensión superficial como función de la temperatura

La temperatura es la variable más importante para el cambio de la tensión superficial de un líquido en equilibrio con su vapor, toda vez que al aumentar la temperatura del líquido las dos fases serán cada vez más parecidas hasta que a la temperatura crítica, T_c , la interface líquido vapor desaparece y como consecuencia la tensión superficial obtenga un valor de cero. Fenómeno que fue descrito empíricamente por Katayama y Guggenheim.^[76, 78] La figura 2.4 muestra el fenómeno descrito anteriormente para el agua, etanol y naftaleno.

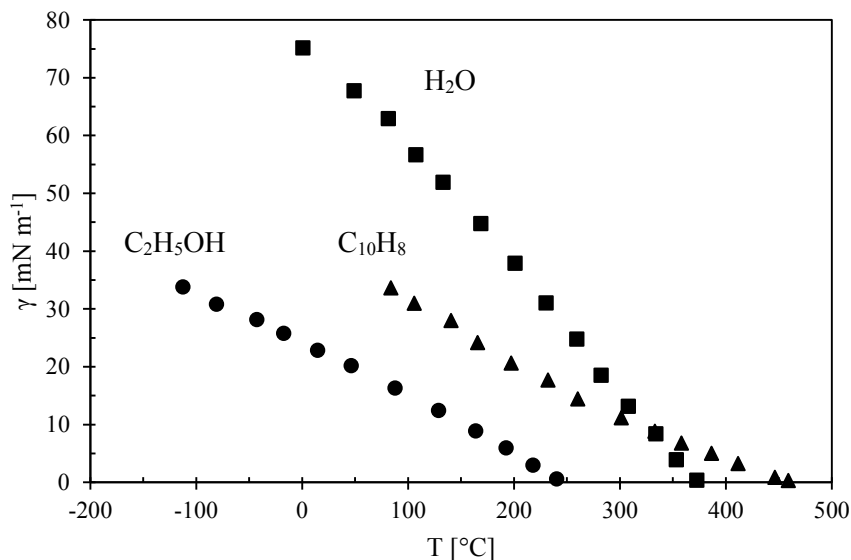


Figura 2.4: Tensión superficial como función de la temperatura para varios líquidos. La tensión superficial toma el valor de cero en el punto crítico (adaptada).^[76]

La ecuación que representa el comportamiento de la tensión superficial como función de la temperatura para muchos líquidos es:^[78]

$$\gamma = \gamma_0 \left(1 - \frac{T}{T_c}\right)^{\frac{9}{11}} \quad \text{Ecuación 2.45}$$

donde el exponente 9/11 es cercano a la unidad por lo que se puede considerar que la tensión superficial disminuye de manera lineal conforme aumenta la temperatura.

2.2.3.4 Tensión superficial en disoluciones

El efecto de la concentración del soluto en la tensión superficial del disolvente se puede manifestar de tres formas.^[74] Lo perfiles de las curvas tensión superficial como función de la concentración del soluto se ejemplifican en la figura 2.5.

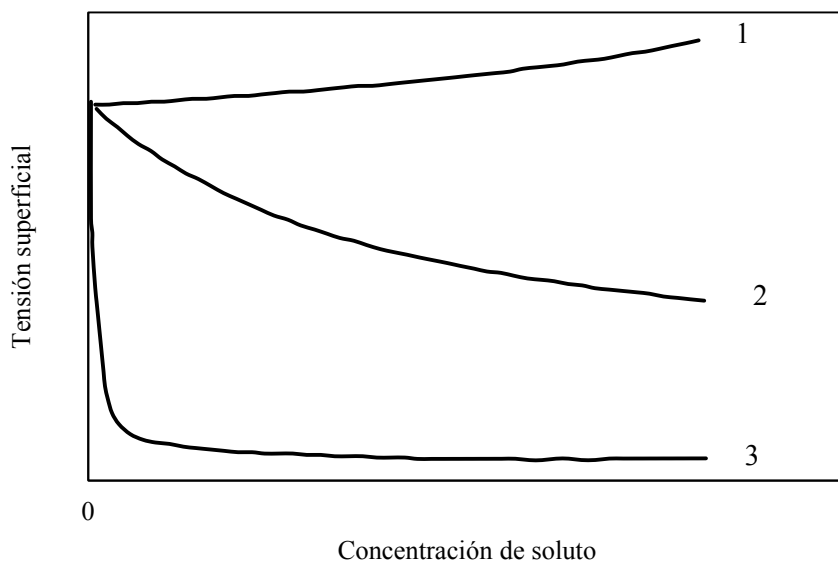


Figura 2.5: Tensión superficial de disoluciones como función de la concentración de soluto y tipo de soluto (adaptada).^[74]

1. Aumento de la tensión superficial, este aumento no es grande y tal comportamiento se puede observar en agua para electrolitos verdaderos, sacarosa y ácido benzoico. En ciclohexano este efecto se observa con anilina. Presentan actividad superficial negativa.

2. Disminución de la tensión superficial, esta disminución no es drástica pero si periódica con concentración, observado para no electrolitos o electrolitos potenciales en agua. Presentan actividad superficial positiva.

3. Disminución drástica de la tensión superficial con la concentración hasta cierto punto, conocido como concentración de agregación crítica (cac), para después mantenerse prácticamente constante. Este comportamiento es observado para compuestos denominados tensoactivos.

Esta actividad superficial se debe a que el arreglo de las moléculas del soluto en la superficie es distinto al arreglo en el seno de la disolución.^[74]

2.2.3.5 Método del anillo de Du Noüy para medir la tensión superficial

Existen diversos métodos para la medición de la tensión superficial en líquidos y disoluciones que se ajustan no solo a necesidades sino también a distintos propósitos como:

placa de Wilhelmy, estalagmómetro, gota rotatoria, ascenso capilar, presión máxima de burbuja, perfil de gota y el tensiómetro o anillo de Du Noüy. Este último se describe a continuación ya que, fue el elegido para el desarrollo del presente trabajo.

El método del anillo se viene usando desde las primeras décadas del siglo XX y se comenzó a usar porque podía determinar pequeñas impurezas en el proceso de refinación del petróleo.^[79] Es un método sencillo, pero la sencillez está en función de la precisión que se desee obtener. Los elementos esenciales para el uso de este método son, un anillo hecho de una aleación de platino e iridio donde el contenido de iridio es del 10%.^[80] Este es capaz de ser mojado por el líquido al que se va a determinar su tensión superficial y se encuentra suspendido horizontalmente a la superficie plana de ese líquido, además de una balanza de torsión para medir la fuerza necesaria para separar el anillo del líquido.^[81]

Esta fuerza es el dato experimental que se obtiene directamente al usar un tensiómetro analógico y como consecuencia no es el valor de la tensión superficial del líquido en cuestión. En la literatura se pueden encontrar expresiones simples para obtener en concreto el valor de la tensión superficial que conllevan a errores de hasta el 30 %.^[80, 81] Zuidema y Waters en 1941 propusieron una expresión para realizar la corrección de manera más atinada y así obtener mejores resultados. Dicha expresión se muestra en la ecuación 2.46.^[79]

$$(F - a)^2 = \left(\frac{4b}{\pi^2 R^2} \right) \times \frac{P}{\rho_1 - \rho_2} + C \quad \text{Ecuación 2.46}$$

donde:

F : es el factor de corrección γ/P .

γ : tensión superficial.

P : máxima tracción del anillo, $[\text{mN m}^{-1}]$.

ρ_1 : densidad de la fase inferior.

ρ_2 : densidad de la fases superior.

R: radio del anillo.

C: constante que depende de la relación r/R , donde r es el radio del alambre del anillo. Esta expresada como: $C = 0.04534 - 1.679 \frac{r}{R}$.

a: constante universal para todos los anillos, tiene un valor de 0.7250.

b: constante universal para todos los anillos, tiene un valor de 0.0009075.

Los equipos conectados a un ordenador digital tienen ya programado el algoritmo de la ecuación y únicamente ingresando los datos de la densidad para las dos fases arroja directamente el valor de la tensión superficial.

2.2.4 Espectrofotometría ultravioleta y visible

Históricamente los descubrimientos de dispersión de la luz, así como el conocimiento de los espectros de absorción de cada uno de los elementos químicos y la determinación de metales minerales mediante espectrofotometría de emisión atómica datan de los siglos XVIII y XIX, pero el avance tecnológico para el desarrollo instrumental de las técnicas de la espectrofotometría de absorción molecular tuvo lugar solo a partir de los primeros 30 años del siglo XX.^[82]

La espectrofotometría ultravioleta y visible se basa en la interacción de la radiación electromagnética, en una región característica, que puede absorber o transmitir una muestra de materia de interés químico. Todas las técnicas de adsorción suponen que cuando un tipo radiación incide sobre la muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición electrónica entre los niveles energéticos de la sustancia (átomo, molécula o ion) X, pasando esta al estado excitado, X*, el resto de radiación es transmitida. Así analizando una u otra podemos relacionar la cantidad de especie activa presente en la muestra.

La región para el ultravioleta se extiende desde 1 hasta 400 nm, esta a su vez está subdividida en el ultravioleta cercano de 200 a 400 nm y el lejano o ultravioleta al vacío que va de 1 a 200 nm. Mientras que la región del visible va desde 400 hasta 800 nm.^[83]

2.2.4.1 Relaciones fundamentales

La longitud de onda, λ , es la distancia entre dos valles o dos crestas de dos ondas continuas.

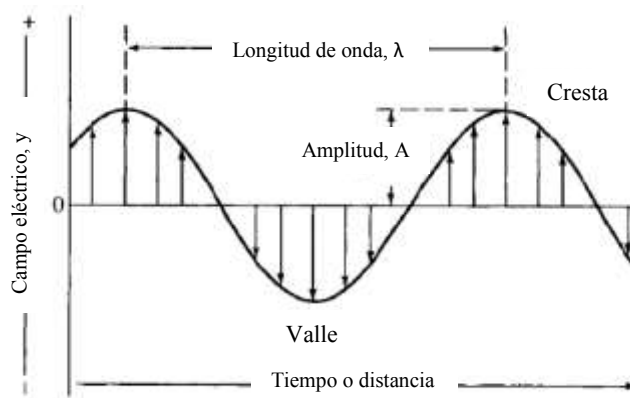


Figura 2.6: Representación bidimensional de un vector eléctrico (adaptada).^[84]

La frecuencia, ν , es el número de oscilaciones de una onda por unidad de tiempo.^[85] Como se muestra en la siguiente expresión.

$$\nu\lambda = c$$

Ecuación 2.47

donde:

ν : frecuencia, [s^{-1}].

λ : longitud de onda, [m].

c : velocidad de la luz en el vacío, [$2.998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$].

Para un medio distinto al vacío se corrige c/n , donde n es el índice de refracción de la luz en ese medio.

Debido a la naturaleza dual de la radiación electromagnética permite concebirla como partículas, fotones. Entonces el transporte de energía de un fotón está dado por la siguiente ecuación:^[85]

$$E = h\nu \quad \text{Ecuación 2.48}$$

donde:

ν : número de onda, [m^{-1}].

h : constante de Planck, [6.6262×10^{-34} J s].

E : energía asociada a la radiación, [J].

Si se combinan las ecuaciones 2.47 y 2.48 se tiene la ecuación 2.49.

$$E = h \frac{c}{\lambda} = hc\nu \quad \text{Ecuación 2.49}$$

2.2.4.2 Instrumentación

La instrumentación para el estudio de muestras de interés químico mediante el uso de la espectrofotometría ultravioleta y visible tiene algunos componentes principales los cuales se describen a continuación:^[82, 83]

- Fuente de radiación: su función es generar radiación policromática intensa en toda la región de interés. Se utilizan dos fuentes de radiación para cubrir toda la región. Para la zona ultravioleta cercana (200 – 350 nm) se utiliza un tubo de descarga de hidrógeno o deuterio. Mientras que para la región entre 350 y 1100 nm se utiliza una lámpara incandescente de tungsteno.
- Monocromador: se utiliza para seleccionar de la radiación incidente un haz monocromático. Como elementos dispersivos pueden utilizarse prismas o redes de difracción.
- Fotómetro: la radiación monocromática que entra es descompuesta en dos haces de igual intensidad mediante el separador de haces y pasan hacia las muestras.

- Porta muestras: los dos haces concentrados por unos lentes atraviesan las celdas que contienen las muestras, la referencia o blanco y la muestra, pasando hacia el detector como dos haces monocromáticos de diferente intensidad.
- Detector: los dos haces monocromáticos de diferente intensidad llegan al detector, cuya función es convertir estos estímulos luminosos en una señal de tipo eléctrico.
- Amplificador: compensa electrónicamente que resta la absorción del disolvente, medio o blanco y de la disolución con la muestra de manera electrónica.
- Registrador: registra automáticamente el espectro como una curva de longitud de onda de las radiaciones absorbidas como función de la absorbancia, A , o absorptividad molar, ϵ .

La figura 2.7 muestra de manera muy simplificada un esquema de la instrumentación de espectrofotómetro.

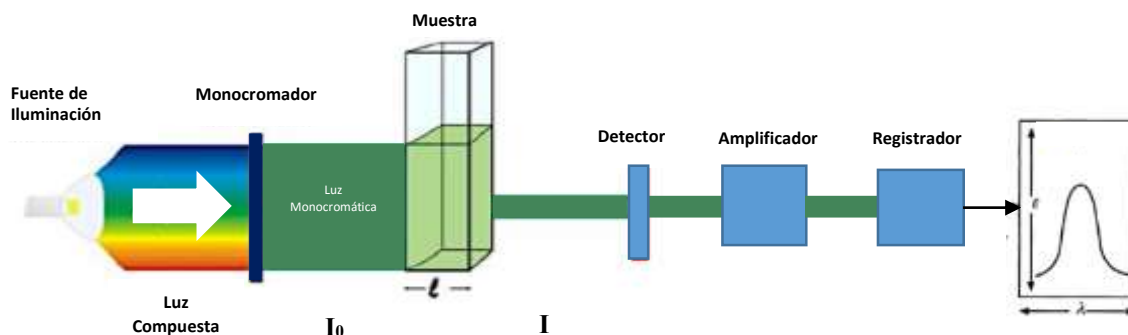


Figura 2.7: Representación esquemática de un espectrofotómetro.

2.2.4.3 Condiciones operatorias

La obtención experimental de un espectro de absorción es relativamente sencillo ya que los espectrofotómetros están altamente automatizados y permiten la digitalización de la información. Lo realmente interesante es la selección de los disolventes, medios de reacción, celdas, y longitudes de onda según lo que se desee estudiar. A continuación se describen algunos ejemplos sobre la selección de la instrumentación óptica.^[82]

Para el trabajo en la región del ultravioleta lejano, 1 a 200 nm

- Es imprescindible el uso de equipos al vacío, toda vez que el aire absorbe en esta zona.
- Los materiales de los que están contruidos normalmente los componentes ópticos, celdas, lentes y elementos dispersivos, vidrio o cuarzo también absorben fuertemente en la zona del ultravioleta lejano. Por lo que se requieren materiales más especializados como LiF, CaF₂ o zafiros.
- Muchos disolventes también absorben en esta zona por lo que se recomienda el uso de hidrocarburos saturados o perfluorados.
- Se debe tener especial cuidado porque los detectores no son muy sensibles a esta zona y tampoco existe mucha selectividad, muchos compuestos presentan absorción en esta zona.

Si se desea utilizar la zona del ultravioleta cercano, 200 a 400 nm.

- Presenta mucho menos inconvenientes que la región del lejano puesto que se pueden utilizar celdas de cuarzo solo si se quiere acceder a regiones inferiores a los 350 nm pero si no, es suficiente con una celda de vidrio.

Por ultimo para el trabajo en la región del visible, 400 a 800 nm. Es la zona más simple instrumentalmente para trabajar, toda vez que es la región capaz de impresionar la vista del ojo humano y las transiciones electrónicas son de muy baja energía. Y todos los compuestos coloreados absorben de manera selectiva en esta región.

- Por lo tanto con una celda de vidrio es más que suficiente, pero en su defecto se puede usar una celda de plástico solo con precaución de que el disolvente del medio de reacción no sea abrasivo al plástico.

2.2.4.4 Aplicaciones de la espectrofotometría ultravioleta y visible y ley de Lambert Beer Bouguer

La espectrofotometría de ultravioleta y visible tiene aplicación en diversas ramas e intereses de la química como:

- La elucidación de estructuras de compuestos orgánicos e inorgánicos.
- Determinación de constantes fisicoquímicas.
 - Equilibrios de disociación ácido-base.
 - Equilibrios tautoméricos.
- Estudios de efectos estéricos.
- Cinéticas de reacción.
- Análisis químico cuantitativo.
- Estudio de la formación de agregados en disolución.

Estos dos últimos son los más importantes para el desarrollo del presente trabajo por lo que se describen de manera más detallada a continuación.

El uso de la espectrofotometría de ultravioleta y visible en los análisis químicos cuantitativos es bien difundido no solo en los laboratorios de investigación sino también a nivel industrial y en laboratorios de análisis clínicos debido a su sensibilidad, rapidez, precisión, selectividad y relativos bajos costos de los espectrofotómetros. Los métodos analíticos se basan en el uso de la ley de Lambert Beer Bouguer, la cual dice que si se hace incidir una luz monocromática de intensidad incidente I_0 a través de una disolución que contiene un íesimo analito de concentración $[i]$ durante una longitud de paso óptico l , la intensidad de la luz en cualquier punto del paso óptico de la disolución es función de $[i]$ y de l , y dicha función tiene una forma diferencial total:^[86]

$$dI = \left(\frac{\partial I}{\partial l}\right)_{[i]} dl + \left(\frac{\partial I}{\partial [i]}\right)_l d[i] \quad \text{Ecuación 2.50}$$

La cual después de un tratamiento matemático conduce a la escritura de la expresión de la ley de Lambert Beer Bouguer más conocida.^[86]

$$-\log T = A = \varepsilon_i l [i] \quad \text{Ecuación 2.51}$$

donde:

T : transmitancia.

A : absorbancia.

ε_i : coeficiente de absortividad molar de la especie i a una longitud de onda λ , [$\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$].

l : longitud del paso óptico, [cm].

$[i]$: concentración molar efectiva de la especie i que absorbe a la longitud de onda λ , [mol L^{-1}].

Para que la aplicación de esta ley conserve la linealidad entre la absorbancia y la concentración deben satisfacerse determinadas condiciones:

- Es una ley límite que aplica solo para disoluciones diluidas.
- Debe utilizarse luz monocromática. Esta condición puede considerarse satisfecha cuando la anchura espectral de radiación que abandona el monocromador sea sensiblemente menor que la anchura media de las bandas de absorción a utilizar.
- Los errores en la determinación de absorbancia son aceptables en el rango 0.2 - 1.0 unidades de absorbancia siendo recomendable trabajar en el rango 0.3 - 0.8. En los equipos más modernos la precisión espectrofotométrica que se alcanza permite extender estos límites.

Esta técnica puede utilizarse para el análisis de mezclas siempre y cuando las sustancias posean espectros apreciablemente diferenciables.

El estudio de la formación de agregados en disolución mediante la técnica de espectrofotometría de ultravioleta y visible se basa en el cambio que experimenta el espectro ultravioleta y visible de un colorante o cromóforo añadido en la disolución. Con este método se puede determinar la concentración a la cual se forman los agregado en el seno de la

disolución a través del cambio de pendiente en una curva de absorbancia como función de la concentración del compuesto que forma agregados.^[65, 87, 88]

Este método, como todos, tiene sus ventajas y desventajas. La principal ventaja es que, se puede usar poco volumen de disolución y la principal desventaja es que se tiene que añadir un cromóforo, el cual evidentemente modifica el ambiente en disolución y como consecuencia las propiedades de la disolución. Este cromóforo se debe añadir en una baja e igual concentración para cada experiencia.

El presente trabajo estudia un compuesto de coordinación con un centro metálico de cobre, el cual provoca una coloración azul, tanto en sólido como en disolución, de tal suerte que es innecesario el uso de un cromóforo para la determinación de la concentración de agregación crítica de este compuesto.

2.2.5 Dispersión de la luz

La dispersión de la luz es el fenómeno mediante el cual la radiación electromagnética, al chocar con pequeñas partículas de tipo coloidal, micelar o incluso molecular, es desviada en su dirección de propagación, de forma aparentemente caótica, en cada uno de los núcleos de dispersión, por tener un índice de refracción diferente al del medio.^[89] La medida de la luz dispersada da lugar a técnicas muy útiles en la determinación de la concentración de sustancias en suspensión, así como en la caracterización de la forma y del tamaño de las partículas coloidales, micelares, agregados y macromoleculares. Estas técnicas son de dos tipos: turbidimetría y nefelometría.

La aparición de turbidez en un medio en el que tiene lugar cierta reacción química, es un hecho que ha sido explotado, como medio de identificación de determinadas sustancias. Desde hace mucho tiempo. Se sabía, por ejemplo, que la acidificación de una disolución de proteínas provoca su precipitación (floculación, coagulación), y por lo tanto, genera turbidez. La medida de esta turbidez se utiliza en la actualidad para la determinación cuantitativa de proteínas en líquidos biológicos.

Los métodos turbidimétricos y nefelométricos, con los que, de forma diferente pero análoga, se mide la turbidez de un medio, se utilizan indistintamente en medidas de concentración.

Cuando el objetivo es la determinación de la forma y tamaño de las partículas en suspensión, los métodos nefelométricos son indudablemente mucho más ventajosos.

Cualquier medio sólido, líquido o gaseoso es capaz de dispersar luz en mayor o menor grado. Este fenómeno se conoce como efecto Tyndall descrito por primera vez por John Tyndall.^[90] Sin embargo, fue Lord Rayleigh quien propuso el primer modelo físico que interpreta de forma notable el fenómeno de dispersión en sistemas diluidos, y que constituye la base fundamental de los métodos de dispersión de la luz.^[91]

Durante la propagación de la luz en un medio cualquiera, la acción del vector campo eléctrico de la onda electromagnética produce la polarización del medio, es decir, las moléculas adquieren un momento dipolar cuya polaridad cambia de forma oscilante con la misma frecuencia que la del campo. De acuerdo con las leyes de la electrodinámica clásica, los dipolos oscilantes se convierten en fuentes emisoras de radiación. La radiación emitida, sin embargo, puede tener la misma o distinta frecuencia que la radiación incidente.^[88] En este sentido, la dispersión se describe como:

- Dispersión clásica, elástica o estática, si la frecuencia no cambia sensiblemente.
- Dispersión cuasi elástica, o dinámica, si la frecuencia se modifica ligeramente (normalmente en el margen de unas decenas de Hz).
- Dispersión inelástica, o Raman, si la frecuencia se modifica de forma importante, involucrando normalmente otros tipos de energía molecular en el proceso.

2.2.5.1 Dispersión de la luz dinámica

La técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering) es una técnica ampliamente usada para determinar el tamaño de partícula en disolución de coloides, micelas, polímeros, macromoléculas, suspensiones y emulsiones. Las partículas en la disolución son sometidas a un haz de luz monocromática la cual es dispersada hacia un detector colocado en un ángulo, θ , por las partículas bajo la influencia del movimiento Browniano dando lugar a fluctuaciones de la banda de frecuencia de la luz dispersada, las cuales se utilizan para determinar el radio hidrodinámico y el coeficiente de difusión de las partículas mediante la ecuación de Einstein-Stokes.^[89-91]

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 2.52}$$

donde:

d_H : diámetro hidrodinámico de las partículas en disolución, esto se refiere a la partícula de tamaño X más la esfera de solvatación provista por el disolvente, [nm].

k_B : constante de Boltzmann, [$1.3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$].

T : temperatura, [K].

η : viscosidad dinámica del disolvente, [N s m^{-2}].

D : coeficiente de difusión, [$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$].

En el experimento de dispersión dinámica de la luz se mide la luz dispersada en intervalos de tiempo, τ , pudiéndose observar que la intensidad fluctúa alrededor de un valor medio como consecuencia del movimiento aleatorio de las partículas. Este comportamiento puede racionalizarse a través de la denominada función de autocorrelación, $g(\tau)$,^[92-94]

$$g(\tau) = \frac{I(t)I(t+\tau)}{I(t)^2} \quad \text{Ecuación 2.53}$$

donde:

I : intensidad de la luz dispersada a los tiempos t y $t + \tau$, respectivamente.

Esta representa el promedio de los valores de la intensidad de luz medida a diferentes valores del intervalo de tiempo, τ . Puede demostrarse que la evolución $g(\tau)$ es decreciente de forma exponencial a medida que crece el valor de τ , de la siguiente forma:

$$g(\tau) = g(0)e^{-\Gamma\tau} \quad \text{Ecuación 2.54}$$

donde $\Gamma = Dq^2$, D es el coeficiente de difusión mencionado anteriormente y q es la magnitud del vector de dispersión de onda. El cual se define como la diferencia entre el vector de onda incidente y el de dispersión, la cual está descrita por la ecuación 2.55.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Ecuación 2.55}$$

donde:

n : índice de refracción del disolvente.

λ_0 : longitud de onda del láser incidente en el vacío, [nm].

θ : ángulo de dispersión.

2.2.5.2 Dispersión de la luz estática

La técnica de dispersión de la luz estática (SLS por sus siglas en inglés, Static Light Scattering) así como la dispersión de la luz dinámica, mide la intensidad de la luz dispersada. La gran diferencia es que en la técnica de la luz dinámica se miden las fluctuaciones en la luz dispersada con respecto al tiempo, mientras que en la técnica de la luz estática se mide la intensidad promedio en la luz dispersada con respecto al tiempo. Para esta última, las mediciones de la luz dispersada se realizan para determinar el peso molecular promedio de una macromolécula, polímero o agregado en disolución;^[95] aunque también se puede determinar el radio o diámetro hidrodinámico conocido como el radio de giro.^[96] En el caso de la formación de agregados moleculares es de interés determinar al número de monómeros que participan en la formación de dicho agregado y, toda vez que esta técnica permite determinar el peso molecular del agregado si se conoce el peso molecular del monómero, con una simple relación del peso molecular del agregado con el peso molecular del monómero se puede determinar el número de monómeros que participan en la formación del agregado.^[97]

Para la determinación del peso molecular, y como consecuencia el número de agregación, se mide la intensidad de la luz dispersada de la muestra a distintas concentraciones y se aplica

la ecuación de Rayleigh (ecuación 2.56).^[92, 95] La cual describe la intensidad de luz dispersada por las partículas en disolución.

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{PM} + 2A_2C_i \right) P(\theta) \quad \text{Ecuación 2.56}$$

donde:

R_{θ} : relación de Rayleigh, es la relación de la luz dispersada y la luz incidente de la muestra.

PM : peso molecular de la muestra, [g mol^{-1}].

A_2 : segundo coeficiente virial de la muestra, [$\text{mol g}^{-2} \text{L}^{-1}$].

C_i : concentración de la muestra i , [mol L^{-1}].

P_{θ} : dependencia angular con la intensidad de la luz dispersada por la muestra.

K : constante óptica, definida como:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{Ecuación 2.57}$$

donde:

N_A : constante de Avogadro, [$6.0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$].

λ_0 : longitud de onda del láser incidente, [nm].

n : índice de refracción del disolvente.

$\frac{dn}{dc}$: incremento diferencial del índice de refracción. Es el cambio en el índice de refracción como función de la concentración.

El término P_θ depende de la interferencia constructiva y destructiva de la luz dispersada por la misma partícula en diferentes posiciones.^[98, 100] Sin embargo, cuando las partículas en disolución son mucho más pequeños que la longitud de onda de la luz incidente, se evitará la dispersión múltiple de fotones. Bajo estas condiciones, P_θ se reducirá a 1 y la dependencia angular de la dispersión con la intensidad se pierde. Este tipo de dispersión es conocido como dispersión de Rayleigh y como consecuencia la ecuación 2.56 se reduce a:

$$\frac{KC_i}{R_\theta} = \left(\frac{1}{PM} + 2A_2C_i \right) \quad \text{Ecuación 2.58}$$

Antes de realizar las mediciones de la muestra es importante realizar la determinación de la relación de Rayleigh de un líquido puro y conocido. El estándar más ampliamente usado para las determinaciones de dispersión de la luz estática es el tolueno, ya que este está bien reportado a diferentes temperaturas y longitudes de onda y es fácil de obtener con una alta precisión;^[98] además de que el tolueno es relativamente fácil de conseguir. La expresión para obtener la relación de Rayleigh de una muestra a partir de la determinación para el estándar se muestra en la siguiente ecuación.

$$R_\theta = \frac{I_A n^2}{I_T n_T^2} R_T \quad \text{Ecuación 2.59}$$

donde:

I_A : intensidad residual de la luz dispersada de la muestra (i.e. intensidad de la muestra – intensidad del disolvente).

I_T : intensidad de la luz dispersada por el tolueno.

n : índice de refracción del disolvente.

n_T : índice de refracción del tolueno.

R_T : relación de Rayleigh del tolueno.

Los instrumentos de la marca Malvern Instruments (Worcestershire, UK), como el usado para el desarrollo de este trabajo, pueden medir la intensidad de la luz dispersada ($K C_i / R_\theta$) de varias disoluciones con distintas concentraciones de la muestra con respecto a la dispersión del estándar.^[98] La representación gráfica de este experimento es conocida como gráfico de Debye que describe la ecuación 2.58 y está a su vez es la representación de una línea recta,^[95, 97, 100] por lo que se puede determinar el peso molecular promedio de la muestra de la intersección con el origen y el segundo coeficiente virial, el cual ofrece información sobre el carácter hidrofóbico e hidrofílico de la muestra, de la pendiente de esta recta.

2.2.5.3 Instrumentación y condiciones operatorias

La instrumentación así como la obtención de una determinación, tanto en luz dinámica como estática, es relativamente simple. La instrumentación es básicamente, el láser como fuente de luz monocromática, el compartimiento para las muestras, el atenuador que es usado para reducir la intensidad del láser y por lo tanto la intensidad de la luz dispersada, el detector para medir la intensidad de la luz dispersada, el procesador digital de la señal que convierte la intensidad de la luz dispersada en una señal digital y una computadora con el software adecuado, para registrar la información. La figura 2.8 muestra de manera esquemática un equipo para la determinación de la dispersión de la luz estática y dinámica.

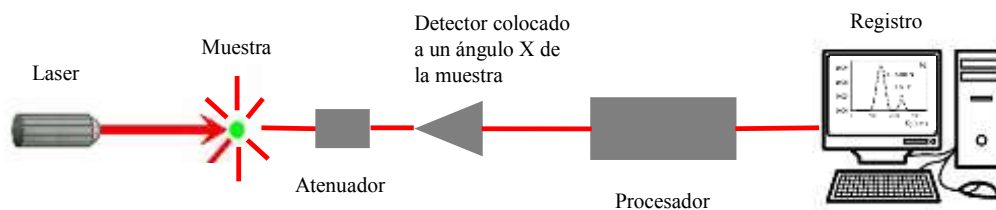


Figura 2.8: Representación esquemática de un equipo para medir la dispersión de la luz.

Las técnicas de dispersión de la luz tiene diversas ventajas, como, no son técnicas invasivas, las mediciones son rápidas ya que se pueden obtener en cuestión de minutos, aunque la calidad de los resultados dependerá de una mayor adquisición de datos así como

de la complejidad de la muestra, la medición se efectuá sobre millones de partículas por lo que no existe problema de muestreo, las mediciones de luz dinámica son absolutas (no requieren de un estándar), por otro lado las de luz estática requieren estándares relativamente sencillos. Mientras que las principales desventajas radican en la preparación de las muestra toda vez que se deben eliminar cualquier tipo de partículas ajenas a la muestra, filtrándola varias veces y con antelación al día de la medición. Para el caso de la luz dinámica se obtienen resultados como distribuciones con respecto a la intensidad del coeficiente de difusión, y las resoluciones son especialmente bajas cuando en una misma muestra se presentan tamaños de partícula distintos; lo cual puede mejorar haciendo determinaciones a varios ángulos de adquisición, pero el que un equipo puede realizar estas determinaciones encarecen el instrumento.

Capítulo 3
Experimental

3.1 Materiales, disoluciones e instrumentos

La Casiopeína III-ia se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la literatura y se obtuvo con una pureza superior al 99 %, ^[23,24] con un peso molecular de 444.92 g mol⁻¹. Para la preparación de todas las disoluciones acuosas se utilizó agua tipo 1 con una resistividad de 18.1 MΩ cm⁻¹ a 25 °C y con un contenido de carbono orgánico menor a los 5 µg L⁻¹. Las sales usadas para preparar las dos disoluciones amortiguadoras estudiadas en este trabajo fueron Na₂HPO₄ • 7H₂O con un peso formula de 268.07 g mol⁻¹ y una pureza del 99.6%, NaH₂PO₄ • H₂O de peso formula igual a 137.99 g mol⁻¹ con una pureza de 99.9%, KNO₃ con un peso formula de 101.10 g mol⁻¹ y pureza igual al 99.8%, NaOH de peso formula 39.99 g mol⁻¹ y con una pureza del 99% y KCl con un peso formula de 74.55 g mol⁻¹ con una pureza del 99.9%, todas de la marca J.T. Baker. Como estándar para las mediciones de dispersión de la luz estática se utilizó tolueno grado HPLC de peso formula igual a 92.14 g mol⁻¹, con una pureza del 99.8 % y un contenido de agua menor al 0.015 %, de la marca Sigma Aldrich.

Balanza analítica AT250 (Mettler-Toledo, Intl.) con una precisión de 0.1 mg para el rango de 1.0 a 50.0 mg y de 0.01 mg para el rango de 0.1 a 1.0 mg.

Potenciómetro digital Orion Star A211 (Thermo Scientific, EUA) en modo de determinación de pH con hasta cinco puntos de calibración con disoluciones amortiguadoras. Con un rango desde -2.00 a 20.00 con resolución de 0.01 y una precisión en la determinación del pH = ± 0.002.

Micropipeta (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de 20 a 200 µL con una incertidumbre de ± 3%. Micropipeta (Gilson, Middleton, EUA) de 200 a 1000 µL con una incertidumbre de ± 3%.

Disolución amortiguadora de fosfatos a pH = 7.40 ± 0.01 a 25 °C, preparada pesando la cantidad adecuada de cada una de las sales de fosfatos y disueltas en el agua desionizada tipo 1 cuanta baste para obtener una concentración de 0.1 mol L⁻¹, ajustando el valor de pH con una disolución de NaOH con una concentración de 2.0 mol L⁻¹ preparada previamente. Misma que simula un medio fisiológico. Además de una disolución amortiguadora de fosfatos a pH = 7.40 con KNO₃ tal que la concentración de esta sal sea de 0.1 mol L⁻¹. Se realizaron determinaciones tanto en agua pura como en el medio amortiguado para estudiar

si el efecto de la agregación de la Casiopeína III-ia era a causa del medio salino o una característica propia del compuesto.

Disolución de KCl, $C_0 = 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ para la verificación de la calibración del conductímetro.

La serie de concentraciones estudiadas se limitó a partir de 0.5 y hasta 10.0 mmol L⁻¹ debido a la baja solubilidad que tiene la Casiopeína III-ia en agua y medios acuosos. Estas disoluciones fueron preparadas a partir de una disolución madre de Casiopeína III-ia de 10 mmol L⁻¹, tanto en los medios amortiguados como en agua pura con un volumen cuanto baste para 10 mL, tomando las alícuotas con las micropipetas.

3.2 Calorimetría de titulación isotérmica

Los calores de disociación se midieron a $[25.0 \pm 0.1] \text{ }^\circ\text{C}$ por triplicado utilizando un instrumento VP ITC (Microcal, Northampton, EUA) en agua pura y medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4. Las disoluciones de Casiopeína III-ia fueron preparadas de modo que la concentración de Casiopeína III-ia disuelta en el medio amortiguado descrito anteriormente fuera de 10 mmol L⁻¹. Las diferentes disoluciones Casiopeína III-ia fueron colocados en la jeringa y se titularon en una celda que sólo contiene el medio acuoso con el fin de evitar el desarrollo de un calor adicional debido al desajuste del medio acuoso y el calor de dilución correspondiente. Las disoluciones de Casiopeína III-ia y de medio acuoso se desgasificaron en un sonicador durante 30 minutos antes de ser colocadas en el calorímetro y en la jeringa. Las titulaciones fueron de 5 µL cada 700 s. Las señales calorimétricas se integraron para obtener los calores correspondientes con el software Origin 7.0 proporcionado por el fabricante del equipo.

3.3 Conductimetría

La conductividad eléctrica de las disoluciones de Casiopeína III-ia en agua pura y en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, 0.1 mol L⁻¹ KNO₃ a pH = 7.4 se determinó por triplicado utilizando un conductímetro CON 110 (Oakton Instruments, Vernon Hills, EUA) a $[25.0 \pm 0.1] \text{ }^\circ\text{C}$. Con una constante de celda $k_{celda} = 1 \text{ cm}^{-1}$, sensor y regulador automático de temperatura así como dos electrodos de 16 mm de acero inoxidable. La celda conductimétrica fue sumergida en el agua tipo 1 durante 10 minutos antes verificar su

calibración con una disolución de KCl 0.01 mol L^{-1} por quintuplicado, obteniendo un valor de conductividad de $[1413.0 \pm 0.3] \mu\text{S cm}^{-1}$.

Las disoluciones de Casiopeína III-ia se agitaron durante el transcurso del experimento y entre cada medición para las diferentes disoluciones la celda se limpió con el agua tipo 1 para después enjuagarse con una pequeña cantidad de la muestra de la nueva disolución a medir.

3.4 Mediciones de tensión superficial

Las determinaciones de la tensión superficial para cada una de las disoluciones de Casiopeína III-ia en el agua y en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ se realizaron por quintuplicado empleando un tensiómetro K12 Krüss (Hamburgo, Alemania), que emplea el método del anillo de Du Noüy. Con un anillo de una aleación de platino e iridio, con iridio al 10 %, el cual fue limpiado con acetona y flameado con un mechero Bunsen. Para después verificar su calibración utilizando agua tipo 1 por quintuplicado obteniendo un valor de la tensión superficial de $[72.81 \pm 0.35] \text{ mN m}^{-1}$. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura constante de $[25.0 \pm 0.1] \text{ }^\circ\text{C}$ y se obtuvieron a partir de tres preparaciones independientes.

3.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible

La determinación de absorbancia de las disoluciones coloridas de Casiopeína III-ia se realizó por triplicado utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, Australia) a $[25.0 \pm 0.1] \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizando una celda de vidrio. Determinando primero el espectro de absorbancia para el agua y el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$, para después ser restado a cada uno de los espectros de absorbancia de las disoluciones de diferente concentración de Casiopeína III-ia mediante el software del equipo. Entre cada medición de las diferentes disoluciones de la celda óptica se limpió con el agua tipo 1 y se enjuago con una pequeña cantidad de la muestra de la nueva disolución a medir.

Se trazaron los espectros de absorbancia en la región del ultravioleta y visible desde 800 a 400 nm en ambos medios y el valor de la absorbancia se determinó en el máximo de absorción que presentó la disolución de Casiopeína con una concentración de 0.5 mmol L^{-1} ,

aunque este se movió 5 nm hasta la concentración de 10 mmol L⁻¹, en cada uno de los medios acuosos estudiados.

3.6 Dispersión de la luz dinámica y estática

Las determinaciones de dispersión de la luz dinámica fueron realizadas usando un equipo Zetasizer μ V (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipado con un láser de 60 mW de He-Ne que emite a una longitud de onda de 830 nm con ángulo de detección de 90° en una celda de cuarzo equilibrada a una temperatura de [25.0 \pm 0.1] °C durante 5 minutos. La distribución del tamaño de partícula fue obtenida a partir de quince mediciones de 40 s cada una con un total de cuatro repeticiones. Las muestras se encontraban una en agua desionizada tipo 1, la otra en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4 y una más en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4, todas a una concentración de Casiopeína III-ia de 10 mmol L⁻¹, mismas que fueron filtradas a través de un filtro de 450 nm de diámetro de poro 24 horas antes de realizar las determinaciones.

La viscosidad y el índice de refracción utilizado para cada medio dispersante fueron de 1.000 cP, 1.330 para el agua pura y 0.899 cP, 1.331 para los dos medios amortiguados, provistos por el software Zetasizer V. 7.11, mismo con el que se realizó el análisis de datos para el diámetro hidrodinámico.

Las mediciones de dispersión de la luz estática se realizaron con el mismo equipo que para la técnica de dispersión de la luz dinámica, con un ángulo de detección de 90° en una celda de cuarzo equilibrada a una temperatura de [25.0 \pm 0.1] °C durante 5 minutos. Estas determinaciones solo se realizaron para la Casiopeína III-ia disuelta en agua pura y las concentraciones que se seleccionaron fueron solo las que están por arriba de la concentración de agregación crítica, determinada por otras técnicas experimentales. Para cada concentración la adquisición de datos fue de 10 mediciones con una duración de 30 s cada una, con un total de cinco repeticiones. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 220 nm de diámetro de poro 48 horas antes de realizar las determinaciones. El análisis de los datos también se llevó a cabo con el software Zetasizer V. 7.11, proporcionado por el fabricante del instrumento.

Capítulo 4
Resultados y discusión

4.1 Calorimetría de titulación isotérmica

A partir de los resultados obtenidos con la calorimetría de titulación isotérmica se determinó la energética asociada con la disociación de los agregados de Casiopeína III-ia en agua pura y en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$. En ambos medios la Casiopeína fue diluida dentro de la celda del calorímetro a una concentración a la cual presenta su máxima solubilidad en medios acuosos y como consecuencia es predominante el agregado en disolución. La figura 4.1 muestra los resultados de la potencia como función del tiempo obtenidos a partir de los experimentos de la calorimetría de titulación isotérmica en ambos medios acuosos, mientras que la figura 4.2 muestra el termograma resultante de la integración de las diferencias de potencia para ambos disolventes donde se puede ver que el proceso de disociación es endotérmico. A medida que la concentración de Casiopeína III-ia se incrementó progresivamente en la celda calorimétrica, el calor resultante de la disociación disminuye, proceso que tiende a un valor de cero indicando que el equilibrio de disociación se ha desplazado hacia la formación de los agregados.

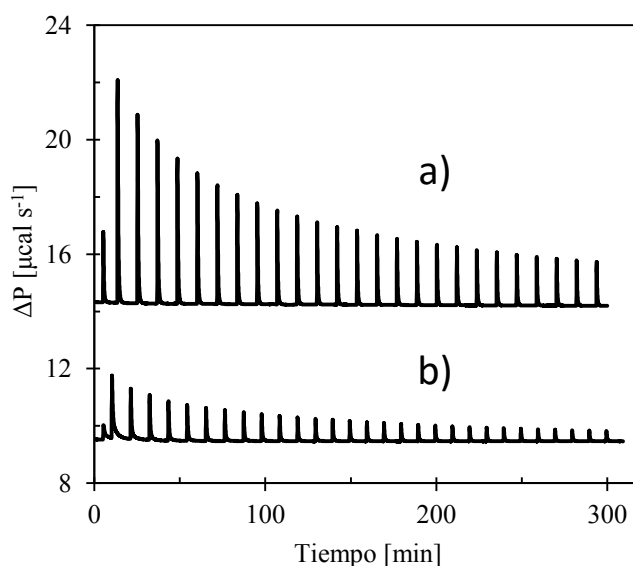


Figura 4.1: Resultados experimentales del estudio con calorimetría de titulación isotérmica a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. a) corresponde a la Casiopeína III-ia 10 mmol L^{-1} disuelta en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ titulada en el mismo medio y b) representan los resultados experimentales obtenidos para la Casiopeína III-ia 10 mmol L^{-1} disuelta en agua pura y titulada en agua pura.

Sé puede observar que el proceso de disociación de los agregados de Casiopeína III-ia sigue la misma tendencia en ambos medios acuosos, pero la energía de disociación es muy diferente para cada caso. La cantidad de calor absorbido después de cada adición del soluto en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ es alrededor de cuatro veces mayor en comparación con los obtenidos en la titulación en agua pura.

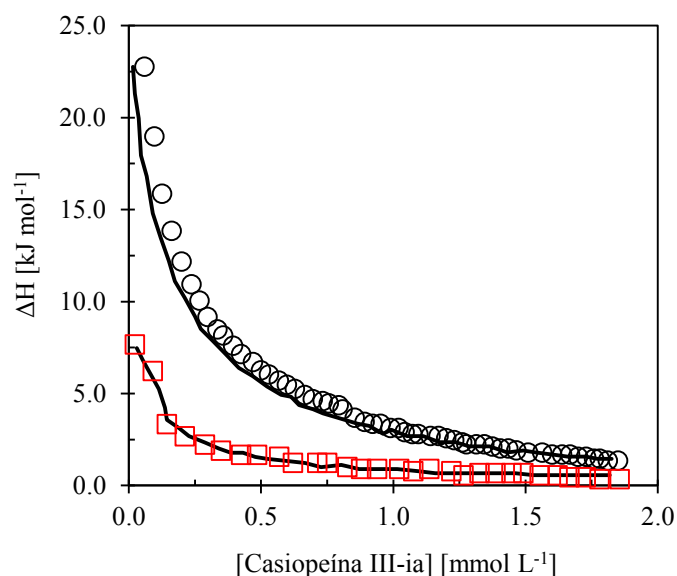


Figura 4.2: Calor de dilución como función de la concentración de Casiopeína III-ia a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los cuadros rojos representan los resultados experimentales obtenidos para la Casiopeína (disuelta en agua pura a 10 mmol L^{-1}) titulada en agua pura, mientras que los círculos negros corresponden a los resultados experimentales obtenidos para la Casiopeína (disuelta en medio amortiguado a 10 mmol L^{-1}) titulada en medio amortiguado y las líneas continuas de color negro representan los cambios en el calor de dilución calculados a partir de una optimización en los valores de K_D , ΔH_D y la estequiometría del equilibrio de formación de los agregados. Utilizando la ecuación 2.12.

En ambos casos la forma de la curva indica que el número de monómeros que participan en la formación de los agregados es bajo, dado que los agregados con un alto número de monómeros normalmente presenta un alto grado de cooperatividad durante el proceso de disociación y el termograma sigue una tendencia sigmoidea que está centrada cerca de la concentración agregación crítica.^[55]

Con el fin de obtener los parámetros termodinámicos del proceso de disociación a partir de los datos experimentales estos se analizaron a través de un algoritmo no lineal de mínimos

cuadrados iterativo utilizando un modelo de disociación, donde los parámetros de ajuste son: K_D , ΔH_D y el número de agregación (Ecuación 2.12).^[101] En la figura 4.2 se muestra como el modelo teórico tiene una buena descripción de los datos experimentales con un χ^2 (ji-cuadrado) de 719 para el sistema en agua pura y 372 para el sistema en medio amortiguado. Los valores resultantes para K_D y ΔH_D , mismos con los que se calcularon los valores ΔG_D y ΔS_D de acuerdo con las ecuaciones 2.5 y 2.6, así como el número de agregación, n , se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos calor de dilución como función de la concentración para la Casiopeína III-ia a 25 °C.

Parámetro	Valor	
	Agua	Medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L ⁻¹ a pH = 7.4
n	2.20	2.00
$\ln K_D$	- 8.20	- 7.68
ΔH_D [kJ mol ⁻¹]	+ 18.79	+ 70.48
ΔG_D [kJ mol ⁻¹]	+ 20.33	+ 19.04
ΔS_D [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	- 5.16	+ 172.53

El ajuste de los datos indica que el número de monómeros que participan en los agregados es muy baja, como es de esperar de acuerdo con el perfil de la curva de titulación y con la literatura,^[72, 102] donde se demuestra que una gran cantidad de fármacos que son capaces de auto asociarse en disolución presentan un número de agregación, n , bajo (si se compara con el número de agregación para las micelas de tensoactivos) el cual está entre 2 y 19.

El análisis de los datos muestra que los agregados de Casiopeína III-ia son dímeros que poseen bajas constantes de disociación en ambos medios acuosos, el valor para ΔG_D también es muy similar, y como era de suponerse la energía de disociación es no espontánea toda vez que presenta un valor positivo. La principal diferencia entre los dos sistemas estudiados es la

entalpía, hecho ya mencionado, y la entropía involucrada en la disociación de los agregados en los diferentes medios acuosos. Esta última es la que presenta el cambio más dramático puesto que la entropía de disociación para el sistema en agua pura presenta un valor negativo exhibiendo que una vez que el agregado es desarticulado el sistema adquiere un mayor orden. Mientras que el sistema estudiado en el medio amortiguado pierde orden al ser desarticulado. Por lo tanto la presencia del fosfato en el medio parece estabilizar los dímeros, y se podría especular que los fosfatos participan directamente en el proceso de agregación. De hecho, a partir de los estudios de dispersión de la luz dinámica se encontró que los agregados en los medios con fosfatos son más grandes que en agua, lo cual se muestra y analiza más adelante.

4.2 Conductimetría

El perfil de las curvas de la conductividad eléctrica como función de la concentración de Casiopeína III-ia utilizando como disolventes el agua pura y el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ se muestran en las figuras 4.3 y 4.4. En el caso de las disoluciones preparadas en agua pura la conductividad aumenta de forma regular con la concentración del soluto, que es una tendencia común observada para disoluciones de electrolitos. Un análisis cuidadoso de la curva completa de la figura 4.3 muestra que existen dos tendencias lineales diferentes que describen los datos observados en el rango de concentración del estudio. La primera región en el intervalo de concentraciones de $0.5 - 4.0 \text{ mmol L}^{-1}$, indicada en color rojo, esta descrita por la ecuación, $\kappa = 77.75 [\text{Casiopeína III-ia}] + 17.14$ con un coeficiente de correlación lineal, $r^2 = 0.998$. Mientras que la segunda tendencia que se encuentra entre 5.0 y hasta 10.0 mmol L^{-1} , indicada en color verde, esta descrita por la ecuación, $\kappa = 71.73 [\text{Casiopeína III-ia}] + 33.33$ con un coeficiente de correlación lineal, $r^2 = 0.996$.

Dado que no se está favoreciendo ninguna reacción química en el seno de la disolución este comportamiento se asocia con la formación de agregados puesto que la movilidad y la carga de los iones individuales y los agregados no son iguales.^[48, 65, 70-72] Por lo tanto el cambio en la conductividad eléctrica como función de la concentración corresponde entonces a la concentración de agregación crítica que para Casiopeína III-ia disuelta en agua (obtenida después de resolver el punto de intersección entre las dos regiones lineales descritas anteriormente) es de 2.6 mmol L^{-1} .

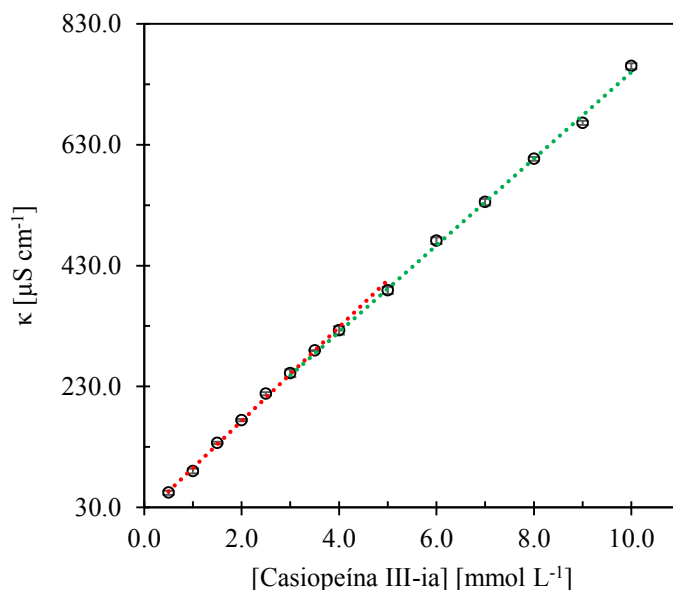


Figura 4.3: Conductividad como función de la concentración de Casiopeína III-ia en agua pura a 25 °C. Por triplicado (las barras de error son más pequeñas que los símbolos).

En el caso del medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4, la tendencia observada es dramáticamente diferente. Los valores de conductividad son mil veces mayores a los observados para Casiopeína III-ia disuelta en agua pura debido a la presencia del KNO₃, el cual es un electrolito verdadero en disoluciones acuosas. Como se puede observar en la figura 4.4 a bajas concentraciones de Casiopeína III-ia se observa un aumento normal de la conductividad eléctrica como función de la concentración, pero entre el 3.0 y 4.0 mmol L⁻¹ la conductividad eléctrica cae dramáticamente para después mantenerse prácticamente constante con el aumento de la concentración de soluto. El fenómeno observado es una mera consecuencia del cambio dramático en la carga y la movilidad de los agregados en comparación con los observados para las moléculas de Casiopeína III-ia libres. Este intervalo de concentración donde la conductividad cambió drásticamente es donde se asignó la concentración de agregación crítica.

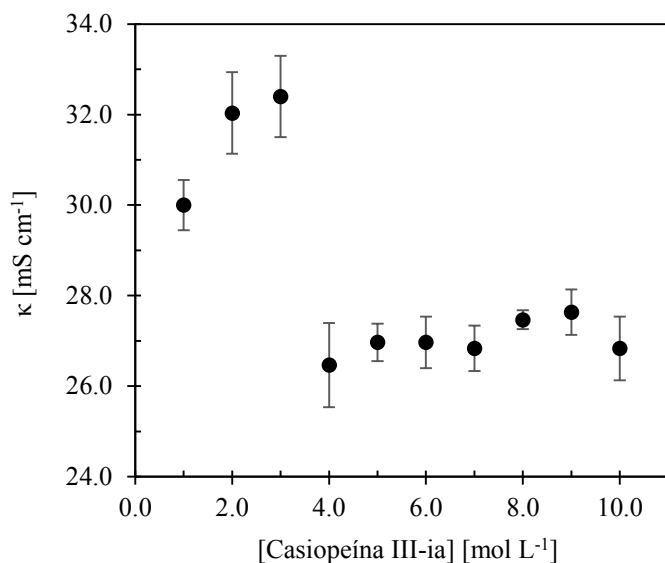


Figura 4.4: Conductividad como función de la concentración de Casiopeína III-ia en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH= 7.4, a 25 °C.

Para ambos disolventes la conductividad molar observada, Λ_{obs} , como una función de la raíz cuadrada de la concentración se muestran en la figura 4.5; y de acuerdo con el perfil que esta presenta se determinó que la Casiopeína III-ia es un electrolito potencial en disoluciones acuosas. Ajustando los datos de conductividad molar observada como función de la raíz cuadrada de la concentración y siguiendo el procedimiento descrito en detalle en la sección de los antecedentes generales propuesto por Streng, Yu y Zhu se obtuvo la constante de disociación, K_D , de los agregados, así como el número de agregación, n .^[48] Resultados que se presentan en la tabla 4.2.

Se puede observar en la figura 4.5 que hay una buena concordancia entre los datos experimentales observados y la descripción teórica. En la tabla 4.2 se resumen los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la conductividad molar observada. El número de agregación, n , obtenido a partir de este análisis se encuentra en acuerdo, de la misma manera con lo descrito en la literatura para otros fármacos^[72] y con el obtenido a partir de los resultados de disociación mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica. Ambos indican que los agregados se forman con un bajo número de monómeros. También se puede ver en la

tabla 4.2 que los valores obtenidos de K_D son bajos y también concilian con los obtenidos mediante el análisis por calorimetría de titulación isotérmica.

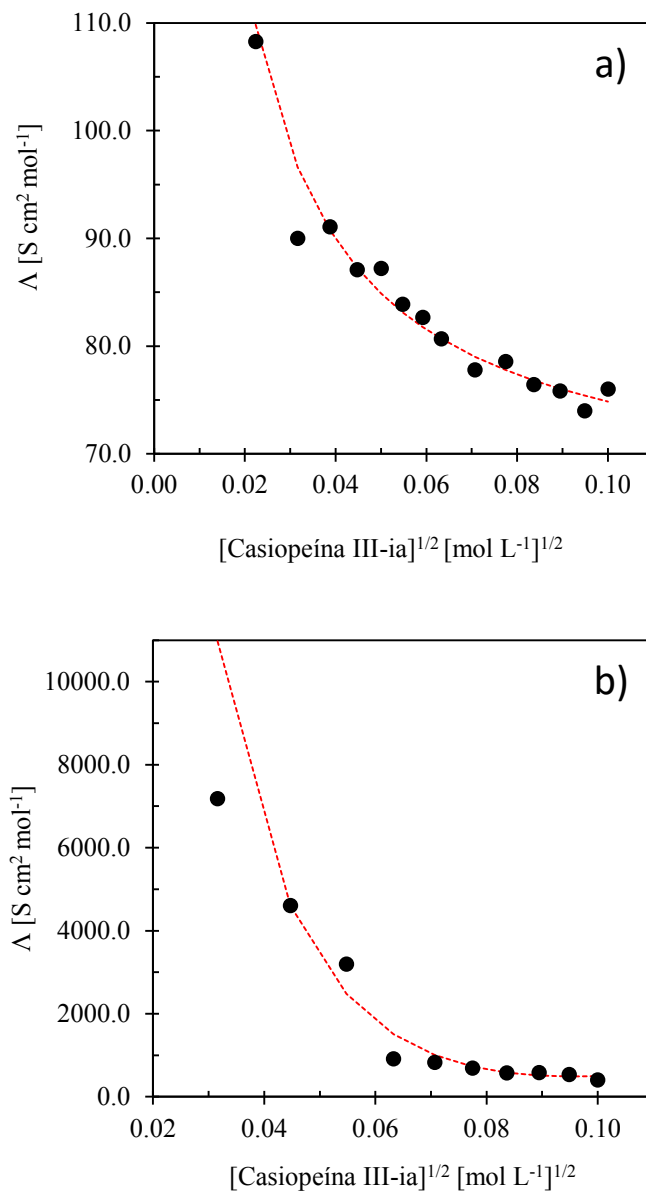


Figura 4.5: Conductividad molar como función de la raíz cuadrada de la concentración para la Casiopeína III-ia disueltos en dos medios acuosos diferentes. a) corresponde al soluto disuelto en agua pura y b) a la Casiopeína disuelta en el medio amortiguado de fosfatos $0.1\ mol\ L^{-1}$, $KNO_3\ 0.1\ mol\ L^{-1}$ a $pH = 7.4$. Los círculos de color negro corresponden a los datos experimentales mientras que las líneas punteadas en color rojo al mejor ajuste obtenido con los parámetros resumidos en la tabla 4.2. Utilizando la ecuación 2.44.

Tabla 4.2: Parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos conductividad molar como función de la concentración para la Casiopeína III-ia a 25 °C.

Parámetro	Valor	
	Agua	Medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L ⁻¹ , KNO ₃ 0.1 mol L ⁻¹ a pH=7.4
n	2.0	2.0
$\ln K_D$	-7.43	-6.46
a [S cm ² mol ⁻¹]	102.6	1020.0
b [S cm ^{-1/2} mol ^{-3/2}]	38.6	14961.0
a' [Scm ² mol ⁻¹]	0.0017	0.0690
b' [S cm ^{-1/2} mol ^{-3/2}]	0.109	0.870

n : número de agregación, K_D : constante de disociación, a y b : constantes de conductividad del monómero, a' y b' : constantes de conductividad del agregado.

4.3 Mediciones de tensión superficial

Para los dos medios acuosos estudiados a través de las mediciones de tensión superficial se encontró que la Casiopeína III-ia presenta actividad superficial del tipo II.^[74] Esta es capaz de disminuir la tensión superficial del agua pura y de la disolución amortiguadora en 23 y 19 mN m⁻¹, respectivamente. Su actividad superficial no es tan fuerte como la que presentan las moléculas de surfactantes típicos, pero el hecho de que presente actividad superficial para después agregarse en el seno de la disolución es una característica interesante, puesto que esta nos dice que la molécula presenta una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, como consecuencia la manera en la que la Casiopeína III-ia interactúe con la pared celular, medios salinos, biomoléculas y tensoactivos estará también en función de estas propiedades.^[72] De la estructura de la Casiopeína III-ia (figura 1.2), se puede ver que los ligantes que rodean el centro metálico de cobre son una unidad de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina y otra más de acetilacetato, el primero de estos tiene una pobre solubilidad en medios acuosos en comparación con la que presenta el acetilacetato. Sobre esa base, la unidad de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina es la parte que proporciona la característica hidrofóbica, mientras que la unidad de acetilacetato la hidrofílica.

La dependencia de la tensión superficial con la concentración de Casiopeína se muestra en la figura 4.6, en ambos sistemas sigue una tendencia diferente. Para el agua pura se ve que la tensión superficial disminuye dramáticamente de 0.0 a 1.5 mmol L⁻¹, seguido de una pequeña región entre 1.5 y 3.0 mmol L⁻¹ cuando la tensión superficial permanece constante lo que podría ser consecuencia de alguna impureza puesto que las mediciones de la tensión superficial son muy sensibles a este tipo de cosas. La tensión superficial continúa disminuyendo una vez más a partir de esta región y se mantiene prácticamente constante a partir de 4.0 mmol L⁻¹ y hasta la concentración final. Para la disolución en medio amortiguado se puede ver como la tensión superficial disminuye dramáticamente de 0.0 a 3.0 mmol L⁻¹ de soluto y partir de este valor la tensión superficial permanece prácticamente constante.

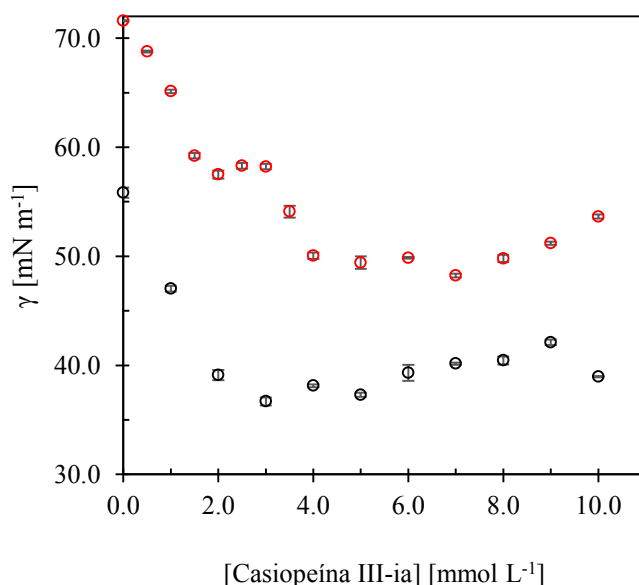


Figura 4.6: Tensión superficial como función de la concentración de Casiopeína III-ia en agua (círculos rojos) y en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4 (círculos negros), a 25 °C.

La falta de un cambio en la tensión superficial después de una cierta concentración se asocia con la capacidad del soluto a agregarse en el seno de la disolución, a esta concentración para los surfactantes declarados se le conoce como concentración micelar crítica (cmc). Para solutos que forman agregados que no son micelas es más apropiado llamar a esta concentración como de agregación crítica (cac). Como se muestra en la figura 4.6, la Casiopeína III-ia muestra diferentes valores de cac para cada uno de los medios acuosos

estudiados. Mediante un análisis de los datos de tensión superficial, empleando la isoterma de adsorción de Gibbs se determinó el valor de la concentración de agregación crítica para cada medio acuoso.^[103, 104] Gráficos que se muestran en la figura 4.7.

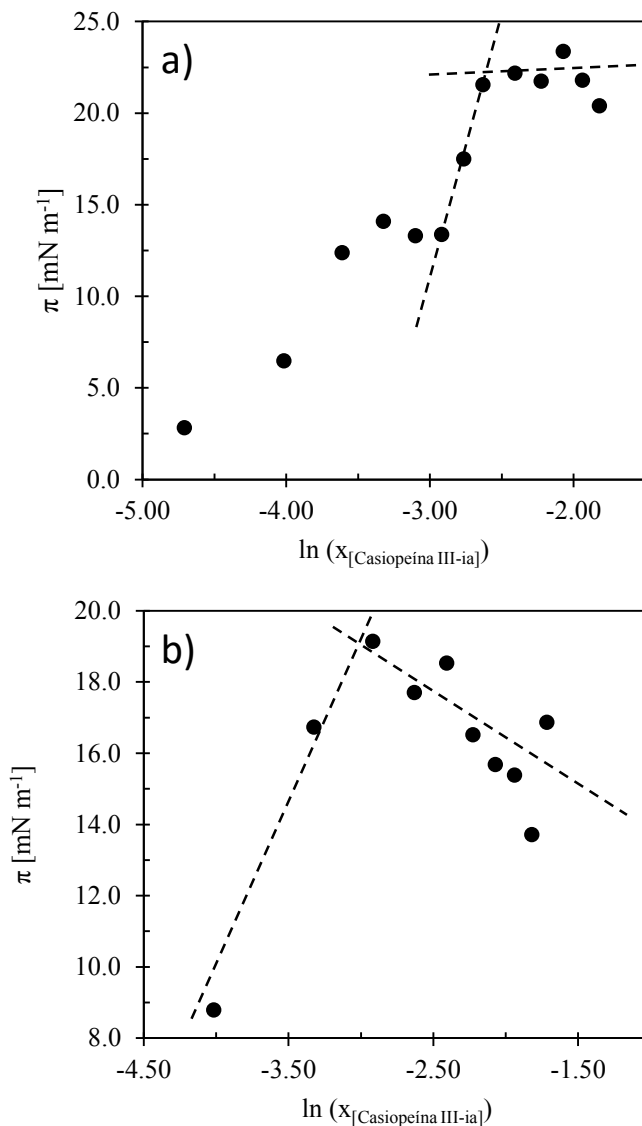


Figura 4.7: Gráficos de presión superficial como función del logaritmo natural de la fracción mol de la Casiopeína III-ia donde a) es para la Casiopeína disuelta en agua pura y b) en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4, ambas a 25 °C.

En la figura 4.7 se puede observar el aumento continuo de la presión superficial conforme aumenta la concentración en disolución del soluto para ambos sistemas acuosos. Para el caso donde la Casiopeína es disuelta en agua pura este aumento se observa hasta el punto de ingresar a una meseta de valor máximo y una presión superficial prácticamente constante que

evidencia la incapacidad de la superficie para aceptar más moléculas de Casiopeína. Para el sistema en medio amortiguado el aumento en presión superficial también es progresivo con el aumento de soluto hasta un punto máximo seguido de una caída ligera de la presión superficial. Comportamiento que podría ser explicado por un efecto combinado entre la actividad superficial del tipo II que se observa para la Casiopeína (figura 4.6) y la actividad superficial de tipo I que presentan los electrolitos verdaderos en disolución acuosa,^[71] en este caso el KNO_3 . En ambos casos cuando el cambio de régimen es máximo e intersecta con las dos regiones de comportamiento distinto observadas, es el logaritmo natural de la concentración de agregación crítica. Para el agua pura el valor c_{ac} obtenido fue de 4.1 mmol L^{-1} , mientras que para medio amortiguado fue de 2.9 mmol L^{-1} .

4.4 Espectrofotometría ultravioleta y visible

Para ambos medios acuosos se obtuvo un espectro de absorbancia ultravioleta y visible con el fin de determinar la mejor longitud de onda para seguir la variación de absorbancia con la concentración de Casiopeína, ambos se muestran en las figuras 4.8 y 4.9. Para el agua pura se mostró un máximo de absorción centrado en 598 nm , mientras que para los medio de amortiguado fue a 627 nm .

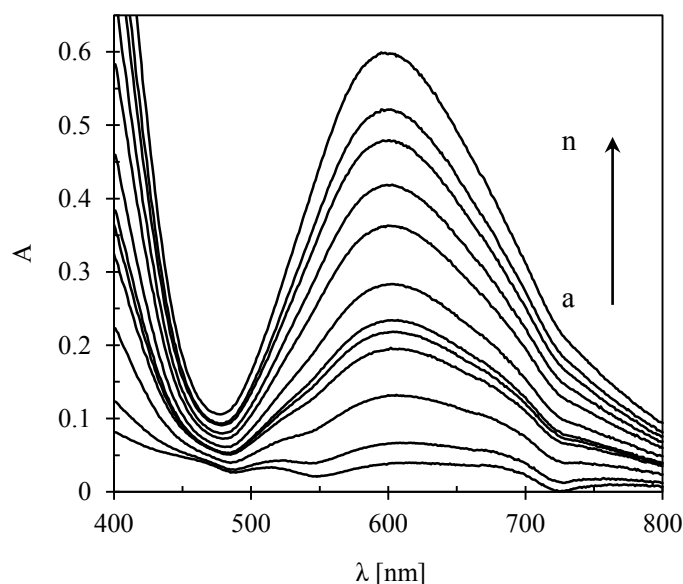


Figura 4.8: Espectros de absorbancia de ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína III-ia en agua pura, a) 0.5, b) 1.0, c) 1.5, d) 2.0, e) 2.5, f) 3.0, g) 3.5, h) 4.0, i) 5.0, j) 6.0, k) 7.0, l) 8.0, m) 9.0, n) 10.0 mmol L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

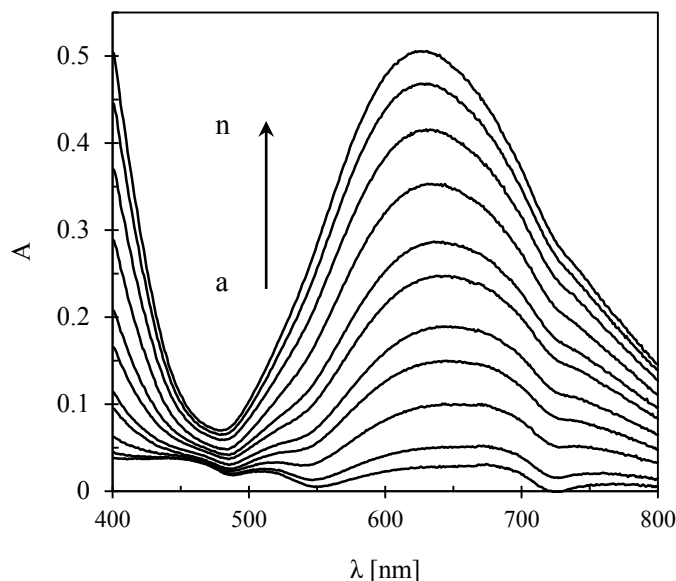


Figura 4.9: Espectros de absorbancia de ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína III-ia en el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$, a) 0.5, b) 1.0, c) 1.5, d) 2.0, e) 2.5, f) 3.0, g) 3.5, h) 4.0, i) 5.0, j) 6.0, k) 7.0, l) 8.0, m) 9.0, n) 10.0 mmol L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A continuación, la absorbancia a las longitudes de onda del máximo se siguió para cada sistema como una función de la concentración de la Casiopeína III-ia. Se observó la típica dependencia lineal creciente de la absorbancia con la concentración,^[86] pero como en el caso de la conductividad eléctrica donde se observan diferentes comportamientos que no son descritos en todo el intervalo de concentración con una sola línea recta, tal como se muestra en la figura 4.10, entonces el cambio observado en la absorbancia se debe a los efectos sobre la constante dieléctrica efectiva de los agregados que modifican los estados excitados de las moléculas y no a la presencia de turbidez, puesto que esta no se observó.^[49, 65] Toda vez que, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante un mes y no había ninguna indicación de precipitación.

La concentración a la cual ocurre el cambio en la dependencia de absorbancia con la concentración se considera entonces como la concentración de agregación crítica. Para el medio acuoso puro esta corresponde a $3.0 - 3.5 \text{ mmol L}^{-1}$ y $3.5 - 4.0 \text{ mmol L}^{-1}$ para el medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$.

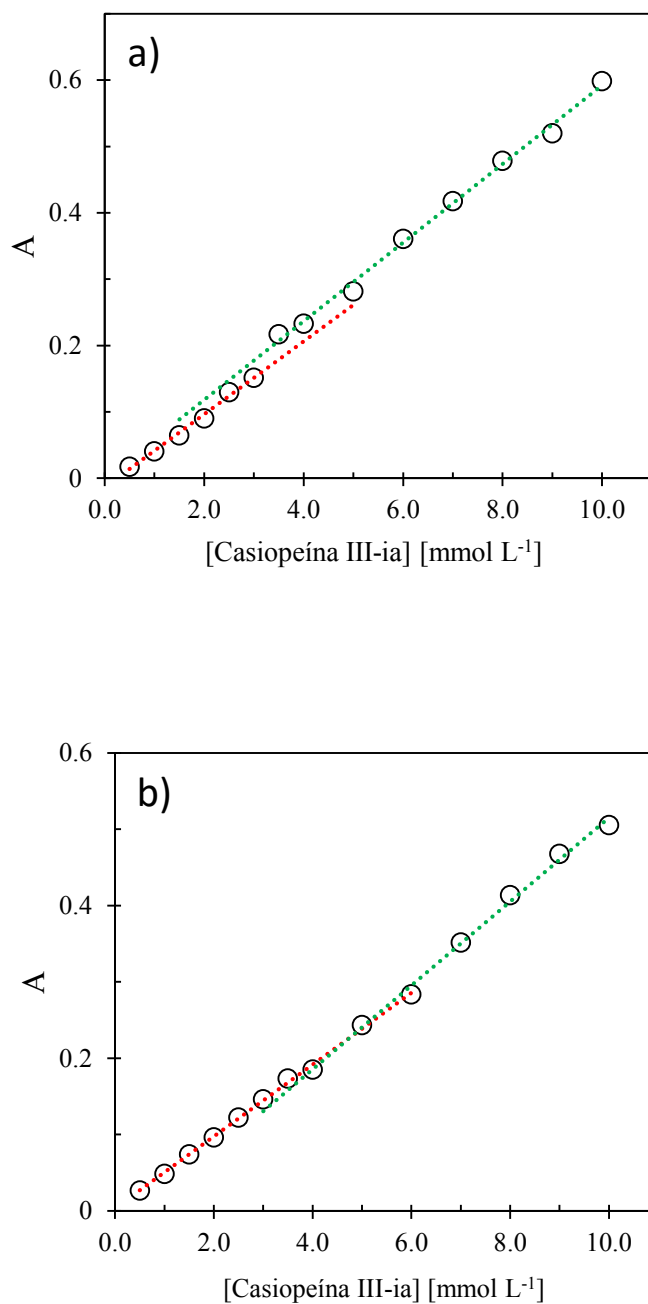


Figura 4.10: a) absorbancia, 598 nm y en función de la concentración de Casiopeína III-ia agua y b) absorbancia, 627 nm, como función de la concentración de Casiopeína III-ia en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH =7.4.

En la tabla 4.3 se muestra una comparación de la concentración de agregación crítica (cac) para la Casiopeína III-ia determinada por diversas técnicas instrumentales, donde se puede

ver que en todos los casos se encontraron valores muy similares tanto en el agua como en el medio amortiguado. El valor de la concentración de agregación crítica encontrado fue de un orden de 10^{-3} molar. Los valores de cac para fármacos de origen orgánico que son capaces de auto asociarse en disoluciones acuosas están entre 10^{-1} y 10^{-5} molar.^[72]

Tabla 4.3: Concentración de agregación crítica para la Casiopeína III-ia a 25 °C, determinada por distintas técnicas instrumentales.

Técnica	cac [mol L ⁻¹]	
	Agua	Medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L ⁻¹ , KNO ₃ 0.1 mol L ⁻¹ a pH=7.4
Conductimetría	2.6×10^{-3}	$3.0 - 4.0 \times 10^{-3}$
Mediciones de la tensión superficial	4.1×10^{-3}	2.9×10^{-3}
Espectrofotometría ultravioleta y visible	$3.0 - 3.5 \times 10^{-3}$	$3.5 - 4.0 \times 10^{-3}$

4.5 Dispersión de la luz dinámica

A partir de los experimentos de dispersión de la luz dinámica a una concentración de Casiopeína III-ia de 10 mmol L⁻¹ se comprobó una vez más, que ésta forma agregados y que el tamaño de estos no es homogéneo. El tamaño de los agregados también es diferente para cada uno de los medios acuosos estudiados en este trabajo: i) agua pura, ii) disolución acuosa de fosfatos 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4 y iii) disolución acuosa de fosfatos 0.1 mol L⁻¹, KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4. El comportamiento general observado muestra que existe polidispersidad en los tamaños de los agregados de Casiopeína en los tres medios estudiados. Pero dentro de esta polidispersidad se encuentran señales del diámetro hidrodinámico bien diferenciadas, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera (ver figuras 4.11, 4.12 y 4.13).

i) Existe para todos los medios acuosos estudiados una población con un diámetro hidrodinámico medio alrededor de 0.62 y 0.97 nm que corresponde a los monómeros de Casiopeína. Estos valores corresponden con el diámetro molecular estimado a partir del diámetro de máxima proyección de la molécula calculado con la ayuda de los descriptores

geométricos del software Marvin V. 15/8/31, 2015 (ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>) el cual es de 1.34 nm y a lo reportando en The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) por Tovar-Tovar en 2004 donde a partir de la estructura cristalina de la molécula de Casiopeína III-ia y los experimentos de difracción de rayos X se concluye que el diámetro de ésta es de 0.82 nm.^[105]

ii) Existen también poblaciones de agregados presentes sólo en los sistemas en los en que la Casiopeína III-ia se disolvió en agua pura y en la disolución de fosfatos 0.1 mol L⁻¹ a pH = 7.4, mismos que presentan un diámetro hidrodinámico entre de 1.32 y 2.73 nm. Poblaciones que sugieren describir la formación del dímero de la Casiopeína. En el medio amortiguado de fosfatos a pH = 7.4 que además contiene KNO₃ a una concentración de 0.1 mol L⁻¹, esta población de agregados moleculares no está presente, lo que indica que la fuerza iónica del medio tiene un papel importante en el tamaño de los agregados.

iii) Por ultimo existen agregados de mayor tamaño, los cuales van desde los 8.70 y hasta los 62.16 nm que están presentes en los sistemas donde Casiopeína III-ia se disolvió en medio amortiguado, pero que se vieron favorecidos al aumentar la fuerza iónica con la sal de KNO₃.

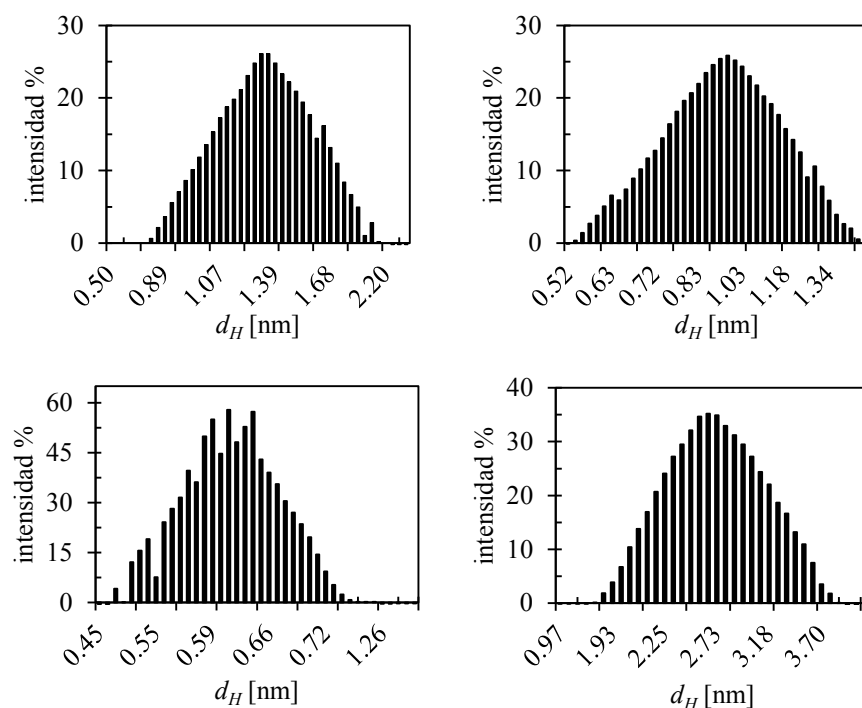


Figura 4.11: Análisis de dispersión de la luz dinámica para los monómeros de Casiopeína III-ia y sus agregados en agua pura a 25 °C. Por cuadruplicado.

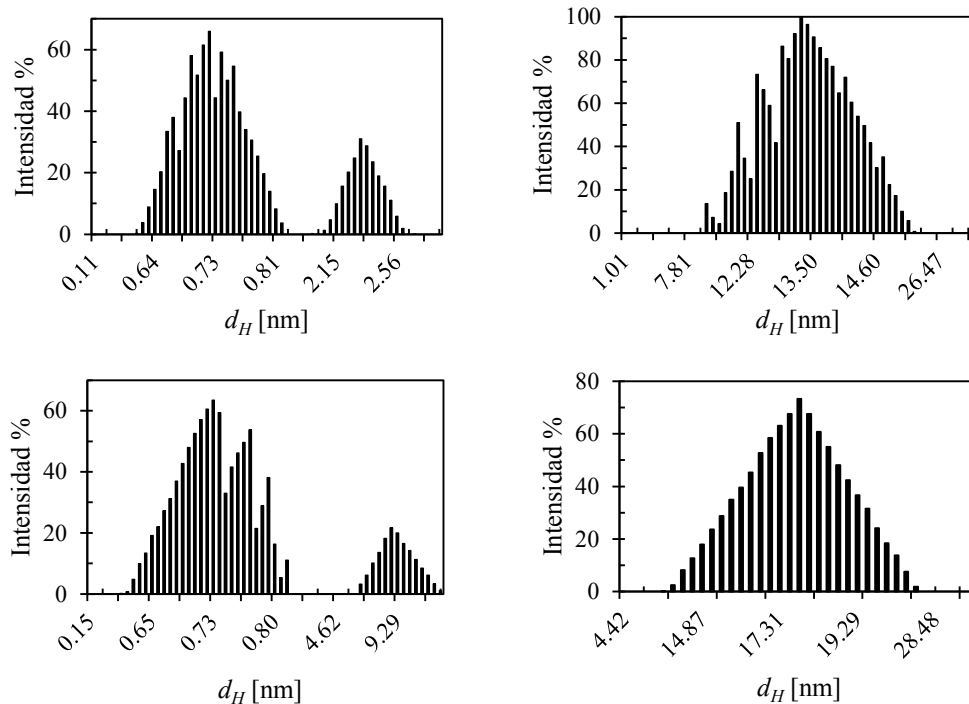


Figura 4.12: Análisis de dispersión de la luz dinámica para los monómeros de Casiopeína III-ia y sus agregados en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Por cuadruplicado.

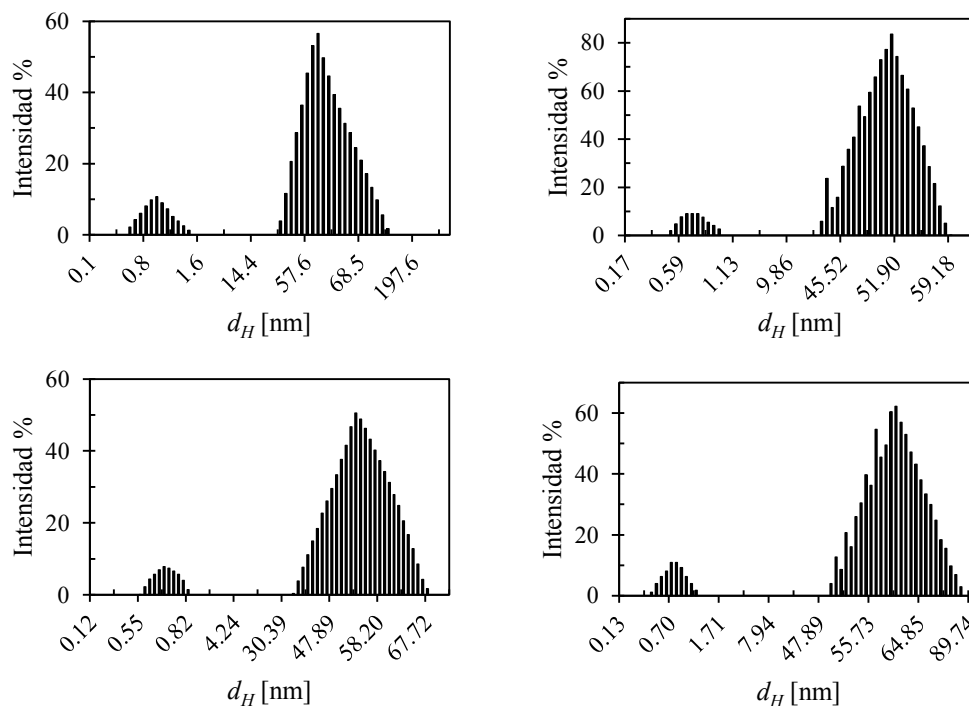


Figura 4.13: Análisis de dispersión de la luz dinámica para los monómeros de Casiopeína III-ia y sus agregados en medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L^{-1} , KNO_3 0.1 mol L^{-1} a $\text{pH} = 7.4$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Por cuadruplicado.

La tabla 4.4 muestra el tamaño de los diámetros hidrodinámicos de la Casiopeína III-ia y sus agregados, para los tres sistemas acuosos estudiados, a partir de los resultados de dispersión de la luz dinámica y presentados en las figuras 4.11, 4.12 y 4.13.

Tabla 4.4: Diámetro hidrodinámico de la Casiopeína III-ia y sus agregados.

Sistema	d_H [nm]		
	Molécula de Casiopeína (monómero)	Agregado (dímero)	Agregado (dímero con diferente capa de solvatación y/o interacción electrostática)
Agua	0.62 ± 0.25	1.19 ± 0.22 y 2.73	-
Medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L ⁻¹ a pH = 7.4	0.72 ± 0.15	2.33	8.72 y 15.85 ± 3.21
Medio amortiguado de fosfatos 0.1 mol L ⁻¹ , KNO ₃ 0.1 mol L ⁻¹ a pH=7.4	0.70 ± 0.17	-	54.76 ± 12.23

Para las disoluciones de Casiopeína en los medios amortiguados las observaciones del tamaño que presentan los agregados parecen estar en contradicción con los resultados y análisis obtenidos por calorimetría y conductimetría, ya que dispersión de la luz dinámica indica que el tamaño de los agregados aumenta con el medio amortiguado de fosfatos y con la fuerza iónica, por tanto, se esperaría una mayor número de agregación para estos sistemas. Mientras que los demás resultados indican que los agregados tienen un bajo número de agregación.

De estos resultados no es posible establecer cómo es que los monómeros están interactuando para formar los agregados. Pero las hipótesis que se plantean para explicar cómo se está agregando la Casiopeína y a fin de conciliar las observaciones en conflicto son que,

cuando la Casiopeína es disuelta en agua pura y debido a su naturaleza electrolítica se puede asumir que las posibles interacciones deben incluir un dímero catión-catión (observado por calorimetría, conductimetría y dispersión de la luz dinámica y estática), enlaces por puente de hidrógeno o interacciones tipo π . Se conoce a partir de experimentos de difracción de rayos X que algunos miembros de la familia de las Casiopeínas forman estructuras apiladas, aún en estado sólido, estabilizadas a través de interacciones π entre las unidades de bipyridina o fenantrolina de la molécula.^[21, 106] En presencia de iones di e hidrogenofosfato a $\text{pH} = 7.4$ el catión Casiopeína III-ia no estará presente en disolución como acuocación o como especie de hidróxido soluble, sino que la molécula de agua en posición apical (figura 1.2) es sustituida por un ion HPO_4^{2-} (especie predominante en disolución) o por H_2PO_4^- .^[107] Por lo que ahora se debe considerar, además de los enlaces por puente de hidrogeno y las interacciones tipo π , la posible formación de puentes de hidrogenofosfato. El ion HPO_4^{2-} es un oxoanión bidentado utilizado como ligante en la síntesis (en condiciones muy sutiles de temperatura, presión y medio de reacción) de compuestos de coordinación dinucleares, donde el monómero es similar en estructura a las Casiopeínas. Estas observaciones se han visto no sólo utilizando cationes cobre(II) como núcleos metálicos,^[108-111] sino también con otros metales de transición como el vanadio^[112] o el zirconio.^[113] Los puentes de hidrogenofosfato podrían explicar el cambio en energética con respecto a los resultados obtenidos por calorimetría en agua pura y en el medio amortiguado. Mientras que para los resultados de dispersión de la luz dinámica indican que la Casiopeína III-ia en forma de dímero estaría rodeado por iones tanto di como hidrogenofosfato que aumentan la capa de solvatación alrededor del agregado debido al hecho de que son mucho más voluminosos que las moléculas de agua, o bien se observa la interacción electrostática entre varios dímeros de Casiopeína. Lo que explicaría los agregados más voluminosos (8.72 – 15.85 nm) observados en este medio. La adición de un electrolito verdadero, como el KNO_3 , al medio con fosfatos a $\text{pH} = 7.4$ promueve el crecimiento de la capa de solvatación debido a un efecto de apantallamiento. Parecería que más capas de iones fosfatos son capaces de rodear todo el dímero o bien de agrupar más dímeros mediante atracciones electrostáticas o inclusive por enlaces por puentes de hidrógeno, los cuales promueven efectos de proyección en capas o arreglos helicoidales observados para otros compuestos de coordinación con centro metálico de cobre(II), aún en estado sólido,^[108, 114] esto podría explicar los agregados mucho más voluminosos (54.76 nm)

observados en el medio amortiguado con fosfatos más el KNO_3 . Además, el hecho de que las propiedades de un agregado en disolución sean diferentes o se vean alteradas por la adición de iones es un efecto muy bien reportado en literatura.^[115, 116]

4.6 Dispersión de la luz estática

A partir de las mediciones de la dispersión de la luz estática es posible determinar el peso molecular de los agregados en disolución. Sin embargo, la polidispersidad de una muestra produce estimaciones erróneas del peso molecular, y debido a que se encontró una polidispersidad mucho menor en el caso en el que se disuelve a la Casiopeína III-ia en agua pura, estas determinaciones se centraron en caracterizar el peso molecular de los agregados resultantes sólo para este sistema. El peso molecular se estima mediante la medición de la luz dispersada de diferentes concentraciones de la muestra, seleccionadas después de la concentración de agregación crítica para asegurarse que la mayor parte de las moléculas de Casiopeína en disolución se encuentren formando agregados. Toda vez que la c_c determinada en este trabajo para la Casiopeína III-ia está entre 2.5 y 4.1 mmol L^{-1} , las concentraciones seleccionadas fueron, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10 mmol L^{-1} . Para después aplicar la ecuación de Rayleigh,^[91, 117] que describe la intensidad de la luz dispersada de una partícula en disolución como función de la concentración de la Casiopeína expresada en g L^{-1} y con esta información construir un gráfico de Debye (ecuación 2.58).^[95-97, 100]

El gráfico de Debye obtenido está descrito por la ecuación lineal $K[\text{Casiopeína III-ia}]/R_\theta = 74.57 [\text{Casiopeína III-ia}] + 0.0010$, con un coeficiente de correlación lineal $r^2 = 0.978$, misma que se muestra en la figura 4.14. Donde a partir del inverso de la intersección a concentración cero se determinó el peso molecular de los agregados de Casiopeína III-ia, siendo este de 1000.02 g mol^{-1} y dado que el peso molecular de la molécula individual de Casiopeína III-ia es 444.92 g mol^{-1} . Resulta entonces que el número de monómeros que participan en la formación de agregados es 2.24. Resultado que está de acuerdo con nuestras otras determinaciones del número de agregación empleando calorimetría de titulación isotérmica y el análisis de los datos de la relación entre la conductividad molar con la raíz cuadrada de la concentración del soluto.

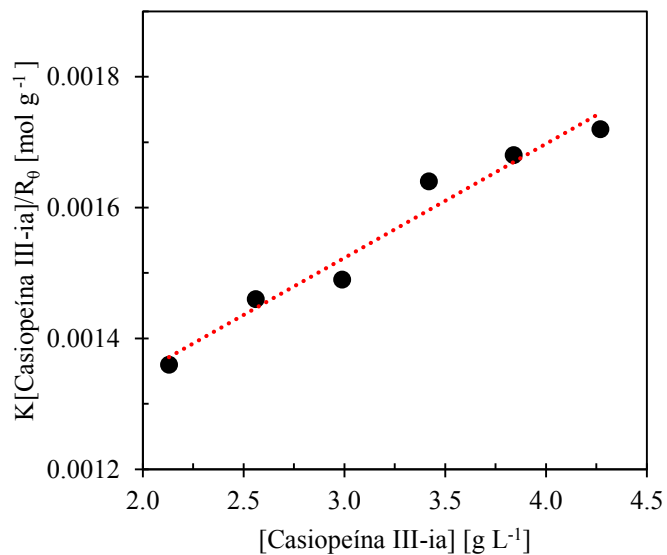


Figura 4.14: $K[\text{Casiopeína III-ia}]/R_0$ en función de la concentración Casiopeína III-ia en agua a 25 °C, $r^2 = 0.978$. Los círculos negros representan los datos experimentales de las mediciones de dispersión de la luz estática mientras que la línea punteada en color rojo corresponde con la curva obtenida del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Rayleigh.

Capítulo 5
Conclusiones y expectativas

5.1 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos de los estudios con la calorimetría de titulación isotérmica, la conductividad eléctrica, las mediciones de tensión superficial, la espectrofotometría ultravioleta y visible y la dispersión de la luz, se concluye que la Casiopeína III-ia es capaz de auto asociarse en medios acuosos a 25 °C. Las diferentes técnicas experimentales empleadas en este estudio dieron evidencia de la capacidad del soluto para formar agregados y además fueron capaces de caracterizar los diferentes parámetros asociados con la formación de estos agregados: concentración de agregación crítica, el número de agregación, el tamaño de los agregados, la constante de equilibrio de formación de los agregados, la entalpía, la energía libre y la entropía asociada con el proceso de disociación de los agregados.

Existe un muy buen acuerdo para los valores de K_D y el número de agregación obtenidos del análisis de los datos realizado de las mediciones de la conductividad eléctrica y de calorimetría de titulación isotérmica. Se determinó que para el agua pura, el número de monómeros que participan en la formación de los agregados es cercano a dos. Por otro lado la presencia de los iones fosfato y electrolitos verdaderos no cambian el número de moléculas de Casiopeína III-ia que se agregan, pero tiene un efecto importante en términos energéticos, en la formación de capas de solvatación más grandes alrededor de los agregados y promueven la interacción entre distintos dímeros.

De los resultados obtenidos no es posible establecer con toda seguridad cómo es que se están formando los agregados de Casiopeína III-ia, pero se puede pensar en enlaces por puentes de hidrógeno, enlaces por puentes de hidrogenofosfato, interacciones electrostáticas o de tipo π .

5.2 Expectativas

El presente trabajo estuvo enfocado al estudio de la capacidad que tiene la Casiopeína III-ia de auto asociarse en disolución acuosa, pero como se revisó en la introducción existen alrededor de cien Casiopeínas distintas de las cuales a lo largo de los años y con las investigaciones se han seleccionado las más prometedoras, como lo son: Casiopeína III-La, Casiopeína III-Ea, Casiopeína II-gly y Casiopeína IV-gly. Por lo que es imperativo continuar

con este trabajo, sobre todo para las Casiopeínas con propiedades más interesantes, toda vez que este estudio surgió del interés de estudiar las interacciones específicas de la Casiopeína III-ia con dianas biológicas (proteínas, ADN y RNA). Y la característica de auto asociarse a cierta concentración que exhibió esta Casiopeína debe ser tomada en cuenta para seleccionar las mejores condiciones operatorias para la realización de los estudios entre Casiopeína – biomolécula mediante calorimetría de titulación isotérmica y voltamperometría cíclica. Para así obtener resultados y conclusiones apropiadas en cuanto a estas interacciones moleculares se refiere.

Referencias

1. Hambley T. W. **2007**. Metal-based therapeutics. *Science*. 318, 1392 – 1393.
2. Zhang C. X., Lippard S. J. **2003**. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 481 – 489.
3. Guo P. Z., Sadler J. **1999**. Metals in medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1512 –1531.
4. Hadjikakou S. K., Hadjiliadis N. **2009**. Antiproliferative and anti-tumor activity organotin compounds. *Coord. Chem. Rev.* 253, 235 – 249.
5. Dubler E., Buschmann R., Schmalte H. W. **2003**. Isomer abundance of bis(β -diketonato) complexes of titanium(IV). Crystal structures of the antitumor compound budotitanate $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\text{bzac})_2(\text{OEt})_2]$ and of its dichloro-derivative $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\text{bzac})_2\text{Cl}_2]$ (bzac=1-phenylbutane-1,3-dionate). *J. Inorg. Biochem.* 95, 97 – 104.
6. Gómez-Ruiz S., Kaluderovic G. N., Prashar S., Polo-Cerón D., Fajardo M., Zizak Z., Sabo T. J., Juranic Z. D. **2008**. Cytotoxic studies of substituted titanocene and *ansa*-titanocene anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.* 102, 1558 – 1570.
7. Tshuva E. Y., Peri D. **2009**. Modern cytotoxic titanium (IV) complexes: Insights on the enigmatic involvement of hydrolysis. *Coord. Chem. Rev.* 253, 2098 – 2115.
8. McKeage M. J., Maharaj M. J., Berners-Price S. J. **2002**. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coord. Chem. Rev.* 232, 127 – 135.
9. Bindoli A., Rigobello M. P., Scutari G., Gabbiani C., Casini A., Messori L. **2009**. Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 253, 1692 – 1707.
10. Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. D., Hartinger C. G. **2008**. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *B. K. Keppler, Dalton Trans.* 183 – 194.
11. Clarke M. J. **2003**. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* 236, 209 – 233.

12. Serli B., Zangrando E, Gianferrara T., Yellowlees L., Alessio E. **2003**. Coordination and release of NO by ruthenium–dimethylsulfoxide complexes—implications for antimetastases activity. *Coord. Chem. Rev.* 245, 73 – 83.
13. Bergamo A., Sava G. **2011**. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans.* 40, 7817 – 7823.
14. Habtemariam A., Watchman B., Potter B. S., Palmer R., Parsons S., Parkin A., Sadler P. J. **2001**. Control of aminophosphine chelate ring-opening in Pt(II) and Pd(II) complexes: potential dual-mode anticancer agents. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1306 – 1318.
15. Garoufis A., Hadjikakou S. K., Hadjiliadis N. **2009**. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coord. Chem. Rev.* 253, 1384 - 1397.
16. Chifotides H.T., Dunbar K. R. **2005**. Interactions of metal–metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA. *Acc. Chem. Res.* 38, 146 - 156.
17. Harlos M., Ott I., Gust R., Alborzina H., Wçłfl S., Kromm A., Sheldrick W. S. **2008**. Synthesis, biological activity, and structure–activity relationships for potent cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes. *J. Med. Chem.* 51, 3924 – 3933.
18. Marzano C., Pellei M., Tisato F., Santini P. **2008**. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 9, 185 – 211.
19. Tardito S., Marchió L. **2009**. Copper complexes as anticancer strategies. *Curr. Med. Chem.* 16, 1325 – 1348.
20. Bravo-Gómez M. E., Ruiz-Azuara L. **2010**. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 3606 – 3615.
21. García-Ramos J. C., Galindo-Murillo R., Tovar-Tovar A., Alonso-Saenz L., Gómez-Vidales A., Flores-Álamo M., Ortiz-Frade L., Cortes-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Campero A., Ruiz-Azuara L. **2014**. The π -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of CuII antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study. *Chem. Eur. J.* 20, 13730 – 13741.

22. García Ramos J. C. **2007**. Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
23. Ruiz-Azuara L. **1992**. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. US Patent No. 5, 107, 005.
24. Ruiz-Azuara L. **1996**. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. US Patent No.5, 576, 326.
25. Friker S. **1990**. Metal compounds in cancer therapy. 1^a Edición, Chapman-Hall, Londres, Reino Unido 13 - 15.
26. Aust S. D., Morehouse L., Thomas C. E. **1985**. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol. Med.* 1, 3 – 25.
27. Halliwell B., Gutteridge J. M. **1990**. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1 – 85.
28. Círiga C. **1996**. Estudio de la interacción de la familia de las Casiopeínas I y II con el ADN. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
29. Gasque L., Medina G., Moreno-Esparza R., Ruíz-Ramírez L. **1998**. Cu-O stretchig frequency correlation whit phenantroline pK_a values in mixed copper complexes. *Inorg. Chim. Acta.* 288, 106 - 111.
30. Gasque L., Medina G., Moreno-Esparza R., Ruíz-Ramírez L. **1992**. Stability of ternary copper and nickel complexes with 1, 10-phenantroline. *J. of Biochem.* 48, 121 - 127.
31. Martínez A., Salcedo R., Sansores L. E. **2001**. A density functional study of the reactivity and stability of mixed copper complexes. Is hardness the reason? *Inorg. Chem.* 40, 301 - 306.
32. Avelar M., Martínez A. **2012**. Do Casiopeinas® prevent cancer disease by acting as antiradicals? A chemical reactivity study applying density functional theory. *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (3), 250 - 256.
33. Tovar-Tovar A., Ruíz-Azuara L., Campero-Celis A. **2004**. Dos formas de interacción entre complejos mixtos de Cu (II) (Casiopeínas) y adenina, como una aproximación a su

selectividad, 1er Congreso Nacional de Química Médica, dedicado a la investigación del cáncer. Oaxaca, Oaxaca, del 23 al 27 de Noviembre. 233 - 235.

34. Tovar-Tovar A., Ruíz-Azuara L., Campero-Celis A., Romerosa A., Moreno-Esparza R., Rosales-Hoz M. J. **2004**. Structural and reactivity studies on 4-4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine acetylacetonate copper (II) nitrate (casiopeína II-ia) with methionine, by UV-vis and EPR techniques. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1045 - 1053.

35. Ruíz-Ramírez L., Gracia-Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Tovar-Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martínez M. P., Pimentel E., Natarayan A. **1993**. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II, III. *J. Inorg. Biochem.* 51 (1-2), 25.

36. Gracia-Mora I., Ruíz-Ramírez L., Gómez-Ruíz C., Tinoco-Méndez M., Márquez-Quñones A., Romero-De Lira L., Marín-Hernández A., Macias-Rosales L., Bravo-Gómez M. E. **2001**. Knight's move in periodic table from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panels. *Met.-Based Drugs* 8(1), 19 - 28.

37. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Muller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G. E., Kelland R. L., Orr R. M., Dobrota M. **2000**. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L120 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In Vitro* 14, 1 - 5.

38. Trejo-Solís C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez-Ropón A., Osorio-Rico L., Luvia S. T., Gracia-Mora I., Márquez-Rosado L., Sánchez A., Moreno-García M. E., Cruz A., Bravo-Gómez M. E., Ruiz-Ramírez L., Rodríguez-Enríquez S., Sotelo J. **2005**. Cas II-gly Induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* 7, 563 - 574.

39. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruíz-Ramírez L., Howard J.A., Debrot M. **2003**. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II. *Toxicology*. 194, 103 - 113.

40. Alemón Médez R. **2003**. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

41. Bravo-Gómez M. E. **2009**. Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre (II) tipo [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO₃ y [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃. Tesis doctoral. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
42. Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruíz-Ramírez L., Moreno-Sánchez R. **2003**. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1979 - 1989.
43. Reyes L., Fuentes-Noriega I., Ruíz-Ramírez L., Macías L. **2003**. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína II-gly in rat plasma. *J. Chromatogr. B.* 791, 111 - 116.
44. Fuentes-Noriega I., Ruíz-Ramírez L., Tovar-Tovar A., Rico-Morales H., Gracia-Mora I. **2002**. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína III in rat plasma. *J. Chromatogr. B.* 772, 115 - 121.
45. Carvallo-Chaigneau F., Trejo-Solis C., Gómez-Ruiz C., Rodríguez-Aguilera E., Macías-Rosales L., Cortés-Barbarena E., Cedillo-Peláez C., Gracia-Mora I., Ruíz-Azuara L., Madrid-Marina V., Constantino-Casas F. **2008**. Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* 21, 17 - 28.
46. Valencia-Cruz A. I., Uribe-Figueroa L. I., Galindo-Murillo R., Baca-López K., Gutiérrez A. G., Vázquez-Aguirre A., Ruiz-Azuara L., Hernández-Lemus E., Mejía C. **2013**. Whole genome gene expression analysis reveals Casiopeína-induced apoptosis pathways. *PLoS ONE* 8, e54664.
47. Chengyue Z., Streng W. H. **1996**. Investigation of drug self-association in aqueous solution using calorimetry, conductivity, and osmometry. *Int. J. Pharm.* 130, 159 - 168.
48. Streng W. H., Yu Daniel H. S., Chengyue Z. **1996**. Determination of solution aggregation using solubility, conductivity, calorimetry, and pH measurements. *Int. J. Pharm.* 135, 43 - 52.
49. Preston W.C. **1947**. Some Correlating principles of detergent action. *J. Phys. Colloid Chem.* 52, 84 - 97.

50. Ladbury J. E., Chowdhry B. Z. **1996**. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular. *Chem. Biol.* 3 (10), 791 - 801.
51. Ropers M. H., Czichocki G., Brezesinski G. **2003**. Counterion effect on the thermodynamics of micellization of alkyl sulfates. *J. Phys. Chem. B* 107 (22), 5281 – 5288.
52. Torchilin P. V., Weissig V. **2003**. Liposomes, second edition. U.K. Oxford University Press. Chapter 13, 337 - 340.
53. Freire E., Mayorga O. L., Straume M. **1990**. Isothermal calorimetry. *Anal. Chem.* 62, 950A - 959A.
54. Condado Morales I. **2013**. Determinación de las microconstantes de velocidad para la hidrólisis de la L-lisina-p-nitroanilida catalizada por tripsina de *Bos taurus*, mediante calorimetría de titulación isotérmica. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
55. Haiyan F. **2004**. Protein-protein interactions. Methods in molecular biology Vol. 261. Humana press. Part II IN VITRO TECHNIQUES. Velazquez-Campoy Adrian, Leavitt A. Stephanie, Freire E. Characterization of protein–protein interactions by isothermal titration calorimetry. 35 - 54.
56. Baeza A. **1992**. Principios conductimétricos. Administración de Manuales y Documentos de la Facultad de Química - UNAM - AMYD. Documento de apoyo. [En línea] http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Documento_de_apoyo_de_Conductimetria_2074.pdf.
57. Castellan W. **1998**. Fisicoquímica. 2a. Ed. México: Pearson. Capítulos 18, 432 - 446 y 31, 805 - 820.
58. Opekar F., Tůma P., Štulík K. **2013**. Contactless impedance sensors and their application to flow measurements. *Sensors* 13(3), 2786 - 2801.
59. Pingarrón Carrazón J. M., Sánchez Batanero P. **2003**. Química electroanalítica: fundamentos y aplicaciones. Editorial síntesis. España 125 - 127.

60. Baeza A. **2011**. Fundamentos de electroanalítica. Administración de Manuales y Documentos de la Facultad de Química - UNAM - AMYD. Documento de apoyo. [En línea] http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS_ELECTROANALITICA_2011_16333.pdf.
61. Sawyer D., Heineman W. R., Beebe J. M. **1984**. Chemistry experiments for instrumental methods. U.S.A. John Wiley & Sons. 70.
62. Baeza A. **2007**. Ecuaciones de conductimetría. Administración de Manuales y Documentos de la Facultad de Química - UNAM - AMYD. Documento de apoyo. [En línea] http://depa.fquim.unam.mx_amyd_archivero_PresentacionCLASE__Ecuaciones_de_conductimetria_2211.pdf.
63. Souchay P. **1971**. Química física - termodinámica química. Traducido por: Dr. J. E. Figueruelo Alejano. 1ª Ed. Barcelona: Toray-Masson, S.A. 343 - 350.
64. Sharma K. S., Sandeep R. P., Animesh K. R. **2004**. Self-aggregation of a cationic-nonionic surfactant mixture in aqueous media: tensiometric, conductometric, density, light scattering, potentiometric, and fluorometric studies. *J. Phys. Chem. B* 108, 12804 - 12812.
65. Benito I., Garcia M. A., Monge C., Saz J. M., Marina M. L. **1997**. Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts. *Colloids Surf., A* 125, 221 - 224.
66. Satake I., Ikenoue T., Takeshita T.. **1985**. Conductometric and potentiometric studies of the association of α -cyclodextrin with ionic surfactants and their homologs. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58, 2746 - 2750.
67. Manabe M., Tetsuya I., Kawamura H., Kinugasa T., Sasaki Y. **1995**. Conductometric and volumetric studies on the ionization, hydration, aggregation, and coagulation of AOT in dodecane. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 68, 775 - 781.
68. Kabir-ud-Din, Ajmal K. P. **2010**. Effects of solvent media and temperature on the self-aggregation of cationic dimeric surfactant 14-6-14, 2Br⁻ studied by conductometric and fluorescence techniques. *Langmuir* 26 (11), 7905 – 7914.

69. Graciani M., Rodríguez A., Muñoz M., Luisa Moya M. **2005** Micellar solutions of sulfobetaine surfactants in water-ethylene glycol mixtures: Surface tension, fluorescence, spectroscopic, conductometric, and kinetic studies. *Langmuir*. 21, 7161 - 7169.
70. Pereiro A. B., Araújo João M. M., Teixeira F. S., Marrucho I. M., Piñeiro M. M., N. Rebelo L. P. **2015**. Aggregation behaviour and total miscibility of fluorinated ionic liquids in water. *Langmuir*. 31 (4), 1283 – 1295.
71. Jayakumar R., Jayanthi C., Gomathy L. **1994**. Peptide aggregates: a novel model system to study self-assembly of peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 45, 129 - 137.
72. Schreier S., Malheiros V. P. S., de Paula E. **2000**. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 210 - 234.
73. Myers D. **2006**. Surfactant science and technology. New Jersey. John Wiley & Sons Inc. 153 - 157.
74. Maron Samuel H., Prutton Carl F. **1965**. Fundamental principles of physical chemistry 4th edition. New York. Collier Macmillan. Chapter 20, 813 - 842.
75. Prausnitz J. M., Lichtenthaler Rudiger N., Gomes de Azevedo E. **1999**. Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria. 3rd Edition. New Jersey. Prentice Hall. Chapter 4, 57 - 59.
76. Levine I. N. **2004**. Fisicoquímica. Quinta edición. Volumen 1. Mc Graw Hill. España. Traducción por: Gonzales Ureña Ángel. Capítulo 13, 467 - 475.
77. Poling Bruce E., Prausnitz J. M., O'Connell John P. **2001**. The properties of gases and liquids. Fifth Edition. New York. Mc Graw Hill. 694 - 697.
78. Guggenheim E.A. **1945**. The principle of corresponding states. *J. Chem. Phys.* 13, 253 - 261.
79. Zuidema H. H., Waters W. G. **1941**. Ring method for the determination of interfacial tension. *Ind. Eng. Chem.* 13 (5), 312 - 313.
80. Harkins W. D., Jordan H. F. **1930**. A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *J. Am. Chem. Soc.* 52 (5), 1751 - 1772.

81. Freud B. B., Freud H. Z. **1930**. A theory of the ring method for the determination of surface tension. *J. Am. Chem. Soc.* 52 (5), 1772-1782.
82. Jaffé H. H., Orchin M. **1962**. Theory and application of UV spectroscopy. Wiley. New York. 83 – 90.
83. Yadav L.S.D. **2005**. Organic spectroscopy. Springer-Science Bussines Media, B.V. Allahabad, India. 7 - 10.
84. Skoog D., Holler F., Nieman C. **2001**. Análisis instrumental 5th ed. España. McGraw Hill. 123 - 125.
85. Harris D. **2001**. Análisis cuantitativo 2nd ed. España. Reverté. 499 - 505.
86. Lohman F. H. **1955**. The matematical combination of Lambert's law and Beer's law. *J. Chem. Edu.* 32 (3), 155.
87. Mukerjee P., Mysels K. J. **1955**. A re-evaluation of the spectral change method of determining critical micelle concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2937 - 2943.
88. Corrin M.L., Harkins W. **1947**. Determination of the critical concentration for micelle formation in solutions of colloidal electrolytes by the spectral change of a dye. *J. Am. Chem. Soc.* 69, 679 - 683.
89. Berne J., Pecora R. **2000**. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. Mineola, New York. Dover Publications. 24 - 40.
90. Kraemer E. O., Dexter S. T. **1927**. The light-scattering capacity (Tyndall effect) and colloidal behavior of gelatine sols and gels. *J. Phys. Chem.* 31 (5), 764 – 782.
91. Rayleigh F. R. S. **1900**. LIII. Remarks upon the law of complete radiation. *Philos. Mag. Series 5.* 49 (301), 539 - 540.
92. Finsy R. **1994**. Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Adv. Colloid Interface Sci.* 52, 79 - 143.
93. Finsy R., De Jaeger N., Sneyers R., Gelade E. **1992**. Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part III: mono and bimodal distributions and data analysis. *Part. Part. Syst. Charact.* 9, 125 – 137.

94. Frisken J. B. **2001**. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Opt.* 40 (24), 4087 - 4091.
95. Debye P. **1946**. Molecular-weight determination by light scattering. *J. Phys. Chem.* 51 (1), 18 – 32.
96. Debye P., Nauma V. Robert. **1961**. A light scattering study of the aggregation of acidified sodium silicate solutions. *J. Phys. Chem.* 65 (1), 10 – 12.
97. Thévenot C., Grassl B., Bastiat G., Binana W. **2005**. Aggregation number and critical micellar concentration of surfactant determined by time-dependent static light scattering (TDSLS) and conductivity. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 252, 105 – 111.
98. Malvern Instrument Ltd. **2008**. Zetasizer μ V User Manual. Malvern. Worcestershire, United Kingdom. 14-2 – 14-5.
99. Moreels E., De Ceuninck W., Finsy R. **1986**. Measurements of the Rayleigh ratio of some pure liquids at several laser light wavelengths. *J. Phys. Chem.* 82 (2), 618 - 623.
100. Debye P., Anacker E. W. **1951**. Micelle shape from dissymmetry measurements. *J. Phys. Chem.* 55 (5), 644 – 655.
101. Luke K., Apiyo D., Wittung-Stafshede P. **2005**. Dissecting homo-heptamer thermodynamics by isothermal titration calorimetry: entropy driven assembly of co-chaperonin protein 10. *Biophys.* 89, 3332 - 3336.
102. Taboada P., Pérez-Rodríguez M., Attwood D., Varela L. M., Ruso J. M., Mosquera V. **2001**. Self-association of verapamil in aqueous electrolyte solution. *J. Colloid Interface Sci.* 241, 459 – 464.
103. Novelo-Torres A. M., Gracia-Fadrique J. **2005**. Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs. *Educación Química.* 1(15), 63 - 67.
104. Sandoval-Ibarra F. D., López-Cervantes J. L., Gracia-Fadrique J. **2015**. Ecuación de Langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química.* 26, 307 - 313.

105. Tovar-Tovar A., Ruiz-Ramírez L, Campero A., Romerosa A., Moreno-Esparza R., Rosales-Hoz M. J. **2004**. Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1045 – 1053.
106. Alvarez-Larena A., Briansó-Penalva J. L., Piniella J. F.; Moreno-Esparza R., Ruiz-Ramírez L., Ferrer-Sueta G. **1995**. Aqua(glycinato)(3, 4, 7, 8 – tetramethyl-1, 10 - phenanthroline)copper(II) Nitrate. *Acta Crystallogr. Sect. C.* 51, 852 – 854.
107. Russo N., Salahub D. R., Witko M. **2003**. Metal-ligand Interactions. Dordrecht, Holanda. Springer Science + Business Media. 49 – 50.
108. Youngme S., Phuengphai P., Chaichit N., Pakawatchai C., van Albada G. A., Roubeau O, Reedijk J. **2004**. The coordination chemistry of mono(di-2-pyridylamine) copper(II) complexes with monovalent and divalent oxoanions: crystal structure, spectroscopic and magnetic properties of dinuclear $[\text{Cu}(\text{L})(\mu\text{-H}_2\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)]_2$ and polynuclear $[\text{Cu}(\text{L})(\mu_3\text{-HPO}_4)]_n$. *Inorg. Chim. Acta.* 357, 3603–3612.
109. Phuengphai P., Youngme S., Pakawatchai C., van Albada G. A., Quesada M., Reedijk J. **2006**. Synthesis, crystal structure and magnetic properties of an unexpected new coordination Cu(II) compound, containing two different phosphato-bridged dinuclear units; $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\mu\text{-H}_2\text{PO}_4\text{-O,O}')_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_2][\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\mu\text{-H}_2\text{PO}_4\text{-O,O}')(\mu\text{-H}_2\text{PO}_4\text{-O})(\mu\text{-HPO}_4\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_9(\text{phen} = 1,10\text{-phenanthroline})$. *Inorg. Chem. Commun.* 9, 147 – 151.
110. Phuengphai P., Youngme S., Chaichit N., Pakawatchai C., van Albada G. A., Quesada M., Reedijk J. **2006**. Crystal structures and magnetic properties of two new phosphate-metal complexes: $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\mu,\eta^2\text{-HPO}_4)\text{-}(\mu,\eta^1\text{-H}_2\text{PO}_4)(\mu,\eta^2\text{-H}_2\text{PO}_4)]_n$ and $[\text{Cu}_4(\text{phen})_4(\mu_3,\eta^2\text{-HPO}_4)_2\text{-}(\mu,\eta^2\text{-H}_2\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_2](\text{H}_2\text{O})_4$. *Polyhedron.* 25, 2198 – 2206
111. Youngme S., Phuengphai P., Pakawatchai C., van Albada G. A., Tanase S., Mutikainen I., Turpeinen U., Reedijk J. **2005**. A copper(II) chain compound with hydrogenphosphate bridges organized in a double-chain structure. Synthesis, structure and magnetic properties of $[\text{Cu}(1,10\text{-phenanthroline})(\mu\text{-HPO}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]_n$. *Inorg. Chem. Commun.* 8, 335 – 338.

112. Zhang Y., Haushalter R. C., Zubieta J. **1997**. Hydrothermal synthesis and crystal and molecular structure of a binuclear dioxovanadium(V) species exhibiting a bridging HPO_4^{2-} ligand, $[(\text{VO}_2)_2(\text{HPO}_4)(2,2'\text{-bipy})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$. *Inorg. Chim. Acta.* 260, 105–110.
113. Krogh-Andersen A. M., Norby P., Hanson J. C., Vogt T. **1998**. Preparation and characterization of a new 3-dimensional zirconium hydrogen phosphate, $\tau\text{-Zr}(\text{HPO}_4)_2$. Determination of the complete crystal structure combining synchrotron X-ray single-crystal diffraction and neutron powder diffraction. *Inorg. Chem.* 37, 876 - 881.
114. Xu L., Wang E., Peng J., Huang R. **2003**. A novel coordination polymer with double chains structure: hydrothermal syntheses, structures and magnetic properties of $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2\text{SO}_4]_n$ (phen = 1,10-phenanthroline). *Inorg. Chem. Commun.* 6, 740 – 743.
115. Mukerjee P.; Mysels K., Kapauan P. **1967**. Counterion specificity in the formation of ionic micelles – size, hydration, and hydrophobic bonding effects. *J. Phys. Chem.* 71, 4166 – 4175.
116. Lukanor B., Firoozabadi A. **2014**. Specific ion effects on the self-assembly of ionic surfactants: A molecular thermodynamic theory of micellization with dispersion forces. *Langmuir.* 30, 6373 – 6383.
117. Some D. **2013**. Light-scattering-based analysis of biomolecular interactions. *Biophys. Rev.* 147 – 158.