



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio teórico experimental de la auto agregación de dos complejos de cobre (Casiopeína III-Ea y Casiopeína IV-gly).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

CITLALLI ADRIANA RIOS GONZÁLEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018.



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: Aurora de los Ángeles Ramos Mejía**

VOCAL: **Profesor: María Guadalupe Lemus Barajas**

SECRETARIO: **Profesor: Ernesto Carrillo Nava**

1er. SUPLENTE: **Profesor: José Luis López Cervantes**

2° SUPLENTE: **Profesor: Federico Daniel Sandoval Ibarra**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 303 de Biofisiología, Edificio F, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ERNESTO CARRILLO NAVA

SUSTENTANTE:

CITLALLI ADRIANA RIOS GONZÁLEZ

Agradecimientos.

Este trabajo se realizó con ayuda del financiamiento otorgado por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la DGAPA – UNAM para desarrollar el proyecto titulado "Estudio fisicoquímico de agregados de Casiopeína e interacciones Casiopeína-proteína" (Proyecto IA207116).

Resumen.

Las Casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación cuyo centro activo es un átomo de Cu[II]. La fórmula general de estos compuestos es $\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})\text{NO}$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$, donde (N-N) puede referirse a x-fenantrolina o a x-piridina, (O-O) puede ser acetilacetato o salicilaldehidato y (N-O) puede representar un α -aminoácido o un péptido. Algunos miembros de esta familia han mostrado poseer actividad citotóxica, genotóxica y antineoplásica; razón por la cual han sido propuestos como agentes anti cancerígenos.

Al ser estudiados como posibles fármacos, se encontró que uno de los miembros más prometedores de esta familia (Casiopeína III-ia) posee la capacidad de auto asociarse. Esta propiedad hasta entonces no reportada es importante ya que la capacidad auto asociativa que poseen algunos fármacos es determinante en el buen desempeño de éstos en el organismo, por lo cual si el objetivo es el desarrollo de nuevos fármacos es fundamental estudiar de forma previa su propiedad auto asociativa.

En este trabajo se presentan los resultados del estudio de la capacidad de auto asociación de dos de los miembros de la familia de Casiopeínas $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-Ea) y $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{glicinato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína IV-gly). Los cuales también han mostrado poseer propiedades adecuadas para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

El estudio se realiza en dos diferentes medios acuosos para cada Casiopeína y empleando las técnicas de calorimetría, conductimetría, dispersión estática de la luz, espectrofotometría UV-Visible y tensión superficial.

De forma complementaria se presenta un estudio teórico de la auto asociación de los sistemas mencionados.

Objetivos.

Estudiar experimentalmente dos complejos de cobre, $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-Ea) y $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{glicinato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína IV-gly) mediante las técnicas de: tensión superficial, conductimetría, espectrofotometría y dispersión estática de la luz. Esto con el propósito de determinar si estos compuestos poseen la capacidad de auto agregarse y si es así, obtener información que permita caracterizar de forma fisicoquímica el proceso de auto agregación y a los agregados formados.

Sumado al estudio experimental, realizar un análisis computacional de los complejos y las posibles estructuras en las que estos podrían auto asociarse.

Contenido

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. La química inorgánica en la medicina.....	2
1.2. Metales en el cuerpo humano.....	2
1.3. Metales en la medicina.....	3
1.4. Casiopeínas.....	5
Capítulo 2. Marco teórico.....	9
2.1. Moléculas anfifílicas y su auto agregación.....	10
2.1.1. Estudio de la auto-agregación de fármacos en disolución.....	13
2.2. Estudio experimental de la auto agregación.....	13
2.2.1. Estudio de la formación de agregados mediante tensión superficial.....	16
2.2.1.1. Tensión superficial y energía superficial.....	16
2.2.1.2. Métodos para determinar la tensión superficial.....	18
2.2.2. Estudio de la formación de agregados mediante conductimetría.....	20
2.2.2.1. Conductimetría.....	20
2.2.2.1.1. Disociación de electrolitos en disolución.....	23
2.2.2.2. Estudio de la auto agregación de fármacos mediante conductimetría.....	26
2.2.3. Estudio de la auto agregación mediante calorimetría de titulación isotérmica.....	27
2.2.3.1. Aplicación de la calorimetría de titulación isotérmica al estudio de las interacciones intermoleculares.....	29
2.2.4. Interacción de la luz con la materia y su aplicación en el estudio de agregados en disolución.....	31
2.2.4.1. Espectrofotometría ultravioleta y visible (UV-Vis).....	32
2.2.4.2. Dispersión de la luz.....	35
2.2.4.2.1. Dispersión de la luz estática en el estudio de agregados.....	35
2.2.4.2.2. Dispersión de la luz dinámica en el estudio de agregados.....	38
2.3. Estudio teórico de la auto agregación.....	41
2.3.1. Química computacional.....	41
2.3.2. Estudio de la auto agregación mediante química computacional.....	43
Capítulo 3. Metodología.....	45
3.1. Método experimental.....	46
3.1.1. Preparación de las disoluciones.....	46

3.1.2.	Estudio de las disoluciones.....	48
3.1.2.1.	Tensión superficial.....	48
3.1.2.2.	Conductimetría.....	48
3.1.2.3.	Calorimetría de titulación isotérmica.....	48
3.1.2.4.	Espectrofotometría UV-Vis.....	49
3.1.2.5.	Dispersión de luz estática.....	49
3.2.	Método teórico.....	50
Capítulo 4. Resultados y discusión.....		51
4.1.	Resultados experimentales.....	52
4.1.1.	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)H ₂ O]NO ₃ (Casiopeína III-Ea). ...	52
4.1.1.1.	Conductimetría.....	52
4.1.1.2.	Calorimetría de titulación isotérmica.....	54
4.1.1.3.	Tensión superficial.....	58
4.1.1.4.	Absorbancia.....	60
4.1.1.5.	Dispersión de la luz estática.....	63
4.1.2.	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H ₂ O]NO ₃ (Casiopeína IV-gly).....	67
4.1.2.1.	Conductimetría.....	67
4.1.2.2.	Calorimetría de titulación isotérmica.....	68
4.1.2.3.	Tensión superficial.....	72
4.1.2.4.	Absorbancia.....	73
4.2.	Análisis teórico.....	77
4.2.1.	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)H ₂ O]NO ₃ (Casiopeína III-Ea). ...	77
4.2.2.	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H ₂ O]NO ₃ (Casiopeína IV-gly).....	81
Capítulo 5. Conclusiones y trabajo a futuro.....		85
5.1.	Conclusiones.....	86
5.2.	Trabajo a futuro.....	87
Capítulo 6. Referencias.....		89
Apéndice.....		97

Capítulo 1. Introducción.

1.1. La química inorgánica en la medicina.

La química bio inorgánica puede ser definida como una rama multidisciplinaria de la química, ya que es el vínculo mediante el cual diversas disciplinas como la química inorgánica, bioquímica, medicina, microbiología, espectroscopía, cristalografía y genética se relacionan con el objetivo de estudiar la actividad que ciertas sustancias inorgánicas realizan dentro de los sistemas vivos. Estas sustancias pueden ser iones metálicos, compuestos iónicos, compuestos de coordinación o moléculas inorgánicas.^[1]

Durante muchos años, se pensó que la química orgánica era la única rama de la química relacionada con los sistemas vivos, debido a que era bien sabido que los compuestos de carbono participan de forma determinante en todos los procesos biológicos. Sin embargo, gracias a los avances en la ciencia se descubrió que ciertos iones metálicos son también de suma importancia para el correcto desarrollo de distintos procesos biológicos, por lo cual el estudio y descripción de los mecanismos de acción de estos iones dentro del cuerpo humano se ha vuelto indispensable con el objetivo de ayudar a preservar el correcto desarrollo de los procesos que se realizan dentro del organismo.^[2, 3]

1.2. Metales en el cuerpo humano.

Existen ciertos elementos, denominados esenciales, que desempeñan un rol determinante en el buen desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos y más específicamente en el cuerpo humano. Estos elementos pueden clasificarse de acuerdo a las cantidades que de ellos se requieren en el organismo, conformando así dos grupos primordiales: macro elementos y micro elementos. Los macro elementos también llamados macro nutrientes o elementos principales se requieren en concentraciones mayores y participan en la construcción del cuerpo humano, ejemplos de éstos son: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), fósforo (P), azufre (S) y cloro (Cl). Por otro lado los micro elementos, también conocidos como elementos traza se requieren en concentraciones mucho menores tal como su nombre lo indica y participan generalmente en procesos metabólicos, algunos ejemplos son: zinc (Zn), hierro (Fe), bromo (Br), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se), cobre (Cu), flúor (F) y manganeso (Mn).

Algunos de los elementos mencionados son metales, éstos presentan propiedades que resultan indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo humano. Los más importantes son sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc y cobre. La presencia deficiente o en exceso de estos metales puede provocar severos daños en el organismo, que bajo ciertas condiciones pueden resultar irreversibles y mortales.^[2, 3]

1.3. Metales en la medicina.

Tradicionalmente el desarrollo industrial de fármacos ha sido basado en la química orgánica, siendo el carbono el elemento más importante debido a que participa en diversos procesos dentro del organismo y a que posee ciertas características que lo convierten en un elemento muy práctico en el diseño de fármacos. La más importante de estas propiedades es su capacidad para generar enlaces covalentes inertes con conectividades y con geometrías que van de la lineal a la trigonal plana y a la tetraédrica, lo cual ha permitido sintetizar compuestos con diversas propiedades y aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, pese a mostrar enormes beneficios y ser los más utilizados, los fármacos basados en carbono presentan la desventaja de que los tipos de geometrías que pueden ser obtenidas son limitadas.^[4] En contraste, los iones metálicos son mucho más versátiles ya que poseen la capacidad de ordenarse en una gran variedad de estructuras lábiles o inertes con números de coordinación en un rango de 1 a 12 y con geometrías como la lineal, trigonal plana, tetraédrica, octaédrica, entre otras. Como resultado de este hecho se obtiene una vasta diversidad de compuestos, algunos de los cuales difieren únicamente en el arreglo de los ligantes alrededor del metal central, es decir son isómeros geométricos. Los isómeros geométricos presentan diferencias en sus propiedades químicas, lo que ofrece la posibilidad de desarrollar una inmensa variedad de fármacos con distintas propiedades y aplicaciones.^[4]

Estos nuevos fármacos poseen interesantes características, las cuales tienen diversas aplicaciones. La principal radica en el área de diagnóstico de enfermedades o problemas dentro del organismo, para lo cual se emplean usualmente Gd[III], Mn[II] o Fe[III] en la generación de agentes de contraste que se administran al paciente de manera previa a un estudio de resonancia magnética nuclear y permiten distinguir de forma simple las áreas del cuerpo a estudiar. Otra aplicación interesante reside en las sales de tiolato, particularmente de oro Au[I], las cuales son utilizadas en el tratamiento de casos difíciles de artritis reumatoide. Éstas han presentado una gran capacidad para disminuir la inflamación y la destrucción de hueso y cartílago, ejemplos de estos compuestos se muestran en la figura 1.^[3, 5]

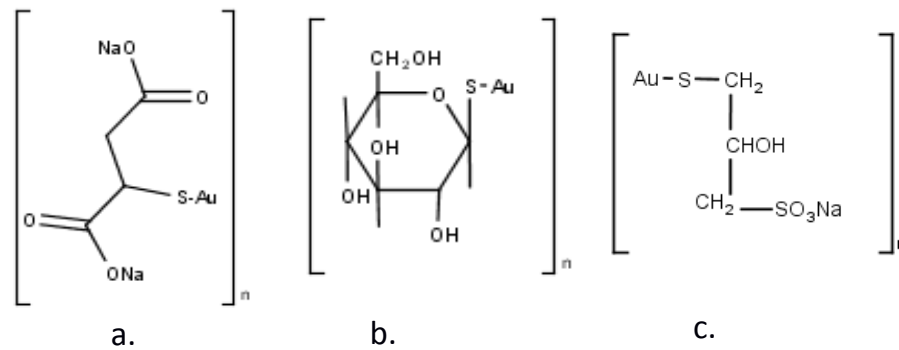


Figura 1. Compuestos de oro (Tiolatos) utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide. a. Aurotiomalato sódico (Miocrin). b. Aurotioglucosa (Solganol) c. Aurotiopropanol sulfonato de sodio (Alocrisina).

Los ejemplos mencionados anteriormente resultan sin duda muy interesantes, sin embargo, la contribución más importante del estudio de los metales a la medicina ha sido el descubrimiento por serendipia realizado por el doctor Barnett Rosenberg, quien en 1965 estudiaba el efecto de la aplicación de un campo eléctrico en la división celular de la bacteria *E. coli* en un medio que contenía NH_4Cl como fuente de nitrógeno, a este sistema se le añadieron dos electrodos de platino. Cuando se aplicó un voltaje alternado al sistema se observó que la división celular de las bacterias se detuvo y cuando se retiraba la corriente la división celular continuó normalmente, esto parecía indicar que mediante la aplicación de un campo eléctrico era posible controlar la división celular. Tiempo después tras varios experimentos se concluyó que no era el campo eléctrico lo que ocasionaba el comportamiento observado en las células, sino una nueva especie química formada por efecto de los electrodos. La especie recién formada fue nombrada *cis*-diamino cloroplatino(II), también conocido como *cis*-DDP o simplemente *cis*-platino.^[3-6]

Debido a la intervención de este compuesto en el mecanismo de división celular Rosenberg y su equipo decidieron estudiar al *cis*-platino como terapia anti cáncer, enfermedad que daña el mecanismo natural de las células mediante el cual éstas se desarrollan, dividen y mueren cuando envejecen o se dañan. Cuando el cáncer se presenta este proceso natural se descontrola lo que provoca que células dañadas o viejas no mueran, a su vez la células se dividen sin control ni interrupción, lo que conlleva a la formación de masas denominadas tumores.^[7]

El resultado satisfactorio del estudio dio pauta a la investigación y desarrollo de nuevos compuestos organometálicos y su aplicación como agentes anticancerígenos. También permitió al doctor Rosenberg proponer algunas teorías, que si bien no son reglas establecidas, fungen como punto de partida en el desarrollo de nuevos compuestos ya que enuncian las propiedades que deben considerarse para que éstos presenten la actividad anticancerígena deseada.

Estas propiedades se mencionan a continuación: (i) el compuesto debe contener un metal esencial para disminuir su toxicidad, (ii) deben elegirse agentes quelantes que favorezcan la configuración *cis* alrededor del ion metálico y (iii) los agentes quelantes deben presentar un grado distinto de hidrofobicidad para favorecer la absorción y distribución de propiedades. Con la finalidad de obtener nuevos fármacos anticancerígenos después del descubrimiento del *cis*platino se han sintetizado distintos compuestos con estructuras variadas, pero manteniendo al platino como elemento básico. Actualmente el *cis*-platino, el carboplatino y el oxaliplatino, los cuales se muestran en la figura 2, son los compuestos más utilizados en la elaboración de fármacos anticancerígenos y han mostrado gran eficacia en el tratamiento de distintos tipos de cáncer como: cáncer de pulmón, testículo, vejiga, ovarios, y colon.^[4]

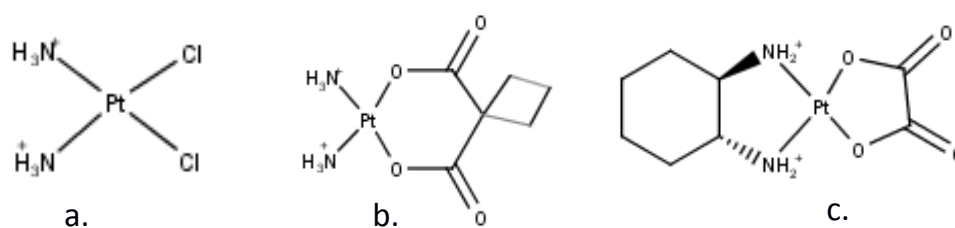


Figura 2. a. Cis-platino. b. Carboplatino c. Oxaliplatino.

Pese a demostrar una alta actividad anticancerígena, el platino presenta la desventaja de que al no ser un elemento presente en el cuerpo humano no existen mecanismos naturales para desecharlo por lo cual resulta tóxico para el organismo, principalmente para los riñones. Este hecho hace preponderante la creación de nuevos fármacos con acción anticancerígena similar al *cis*-platino pero con menor toxicidad.^[4, 8 - 10]

1.4. Casiopeínas.

El cobre es un elemento presente de manera natural dentro del cuerpo humano y resulta esencial para ciertos procesos en el organismo. Estas características hacen de este metal un candidato ideal para ser la base de nuevos fármacos por lo cual se han realizado diversos estudios en este sentido. Uno de los resultados más importantes del estudio del cobre como agente farmacéutico es una familia de compuestos de coordinación llamados Casiopeínas®, los cuales contienen cobre [II] como centro activo. Estos compuestos fueron sintetizados a finales de la década de los 80 por el grupo de investigación dirigido por la doctora Lena Ruiz Azuara quien está adscrita al departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, mientras estudiaban compuestos de coordinación de Cu[II]. Debido a las propiedades

reportadas por estos complejos, fueron registrados y patentados en la década de los 90 bajo el nombre de Casiopeínas.^[11, 12]

Su fórmula general es $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ y $[Cu(N-N)(O-N)]NO_3$, donde (N-N) es un ligante de tipo diimina, y puede referirse a x-fenantrolina o a x-piridina, mientras que (O-O) puede ser acetilacetato o salicilaldehidato, finalmente (N-O) puede representar un α -aminoácido o un péptido. El tipo de ligante que se utilice en cada compuesto será determinante en las propiedades fisicoquímicas, la actividad biológica y en la toxicidad de éste.^[4, 13] La combinación de los ligantes ha permitido la obtención de más de cien compuestos, los cuales han sido clasificados en diez familias que se presentan en la tabla 1.^[14]

Tabla 1. Clasificación de las Casiopeínas.^[14]

Nombre químico del complejo.	Nombre de identificación.
$[Cu(4,7\text{-difenil-}1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína I
$[Cu(4,7\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína II
$[Cu(N-N)(\text{acetilacetato})]NO_3$	Casiopeína IIIa
$[Cu(N-N)(\text{salicilaldehidato})]NO_3$	Casiopeína IIIs
$[Cu(4,4'\text{-dimetil-}2,2'\text{-bipiridina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína IV
$[Cu(5\text{-R-}1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína V
$[Cu(5,6\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína VI
$[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína VII
$[Cu(3,4,7,8\text{-tetrametil-}1,10\text{-fenantrolina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína VIII
$[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(N-O)]NO_3$	Casiopeína IX
$[Cu(N-N)(\text{péptidos})]NO_3$	Casiopeína X

El mecanismo de acción de las Casiopeínas dentro del organismo aún no ha sido elucidado por completo, sin embargo se han propuesto algunos probables mecanismos mediante los cuales las Casiopeínas actúan como agentes anticancerígenos, tales como: (i) se ha encontrado que estos compuestos poseen actividad citotóxica, la cual les permite inducir la muerte celular;^[15 - 17] (ii) la principal actividad biológica del cobre radica en su participación en reacciones redox en las cuales el cobre reacciona directamente con oxígeno molecular o con

peróxido de hidrógeno produciendo radicales libres, en su mayoría $\cdot OH$ los cuales promueven la degradación del ADN.^[18-20] También ha sido propuesto que estos compuestos poseen actividad antiproliferativa, lo que impide el crecimiento ilimitado y descontrolado de células cancerígenas mediante mecanismos apoptóticos.^[4, 13, 21, 22] Esto significa que las Casiopeínas estimulan la muerte celular programada, mecanismo mediante el cual la velocidad a la cual mueren las células es regulada.^[23] Como ha sido mencionado no existe una descripción única del mecanismo de acción de estos compuestos, sin embargo es importante destacar la posibilidad de que se presente más de un mecanismo de forma simultánea.

De la amplia familia de Casiopeínas presentada en la tabla 1 se han elegido los miembros que debido a su actividad antitumoral han resultado ser los más prometedores para realizar estudios más detallados. Uno de los aspectos que resultan relevantes para poder establecer su mecanismo de acción es la interacción de las Casiopeínas con moléculas biológicas como el ADN o las proteínas. Entre los compuestos que han sido estudiados exhaustivamente se encuentra la Casiopeína III-ia, la cual mostró poseer la capacidad de auto asociarse para formar agregados.^[24, 25] Este novedoso comportamiento, hasta entonces no reportado en la literatura hace necesaria la determinación de las concentraciones a las cuales estos compuestos forman agregados. Esto con el fin de poder establecer condiciones experimentales a las cuales los agregados no interfieran con estudios cuyo propósito sea determinar la energía asociada a la formación de complejos del tipo Casiopeína-proteína.^[26]

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio de la posible auto agregación de dos de las Casiopeínas que han mostrado poseer la actividad anticancerígena conveniente para la formulación de un fármaco. La estructura de las Casiopeínas estudiadas, así como algunas de sus propiedades se presentan en la figura 3 y la tabla 2 respectivamente.

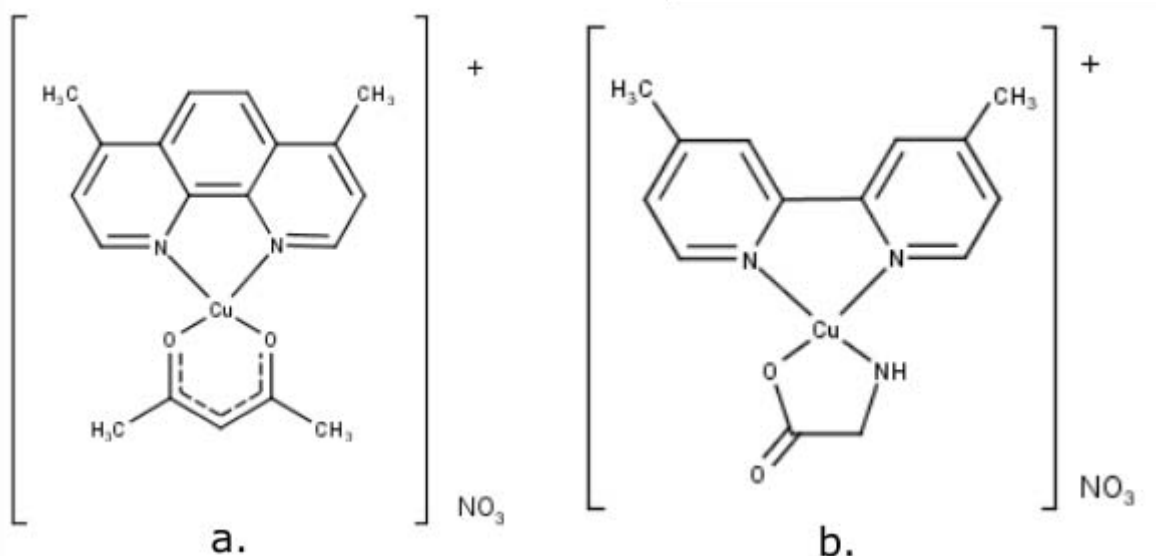


Figura 3. Estructuras de a. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína III-Ea). b. $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{glicinato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (Casiopeína IV-gly).

Tabla 2. Casiopeínas estudiadas.

Nombre químico del complejo.	Nombre de identificación.	Peso molecular. $[\text{g mol}^{-1}]$.
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{glicinato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$	Casiopeína IV-gly	400.88
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$	Casiopeína III-Ea	450.92

Físicamente ambas se presentan como un polvo de color azul.

Capítulo 2. Marco teórico.

2.1. Moléculas anfifílicas y su auto agregación.

Los fenómenos coloidales en su mayoría involucran al menos una fase líquida como uno de sus actores, esta fase es conformada por un disolvente y uno o más solutos. Las propiedades de este sistema serán determinadas por las interacciones moleculares entre los solutos, el disolvente y las entidades coloidales formadas. Estas entidades, también conocidas como estructuras o ensambles anfifílicos tienen su origen en el balance energético de las interacciones que se establecen entre las moléculas del soluto y el disolvente y con otras moléculas del soluto. El término anfifílico indica que una parte de la molécula es afín al disolvente, mientras que la otra no lo es. Si el disolvente es agua entonces la parte afín al disolvente de la molécula anfifílica se denominará hidrofílica mientras que la parte no afín al solvente será conocida como hidrofóbica. Estos compuestos pueden ser clasificados como iónicos (zwitter iones, aniones, cationes) o no iónicos con una cabeza polar y una porción hidrofóbica. La figura 4 muestra el esquema convencional de una molécula anfifílica.

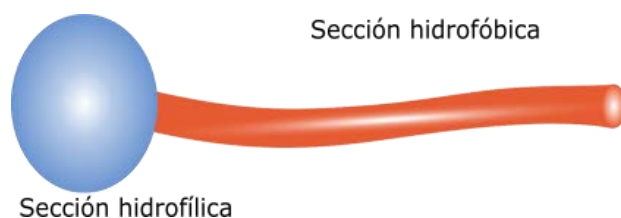


Figura 4. Esquema de molécula anfifílica.

Una de las propiedades más importantes de las moléculas anfifílicas es que poseen la capacidad de llevar a cabo un proceso de auto asociación, ilustrado en la figura 5, para formar agregados o micelas. Este proceso es el resultado de la interacción entre la molécula anfifílica y el solvente y depende de la especie anfifílica y de la condición del sistema en el que la molécula es disuelta.^[27]

Cuando en un volumen constante de disolvente se adiciona una pequeña cantidad de molécula anfifílica, ésta se distribuye entre la interfase y el seno del disolvente de acuerdo a su afinidad por él. Pero al aumentar la cantidad de la molécula en el disolvente se alcanza paulatinamente la saturación tanto en la interfase como en el seno. A partir de este momento se alcanza un rango de concentración de la molécula anfifílica en el cual ésta inicia el proceso de auto asociación, donde la parte afín al disolvente quedará en la parte externa del agregado formado, mientras que la parte no afín al disolvente se mantendrá en la parte interna. Este rango de concentración es conocido como concentración de agregación crítica (CAC) o concentración micelar crítica (CMC). La diferencia entre los dos

conceptos anteriores radica en el número de monómeros que conforman la estructura. Se denomina micela cuando el número de monómeros va de 20 a 200, mientras que cuando el número de monómeros es menor la estructura es designada como agregado.^[33] En el presente trabajo se utilizará el término agregado para hacer referencia al resultado de la auto asociación de las Casiopeínas.

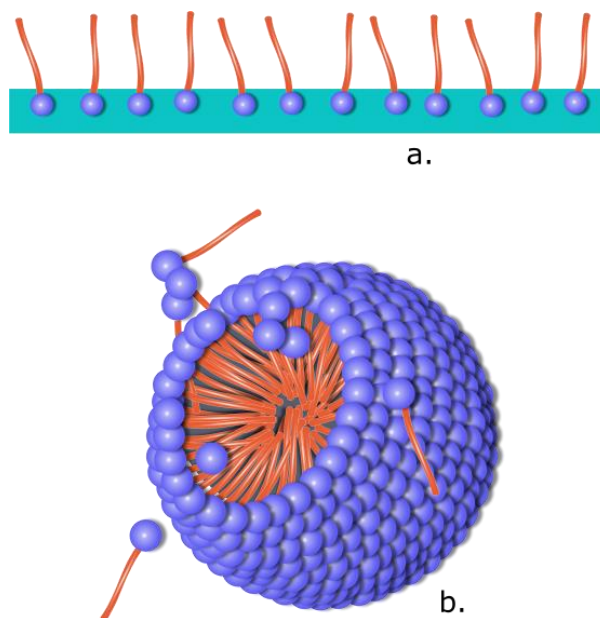


Figura 5. Proceso de auto asociación. a. Moléculas anfifílicas saturando la interfase. b. Micela formada.

Para estudiar la auto agregación de moléculas anfifílicas han sido propuestos dos modelos: el modelo de acción de masas, en el cual se considera al agregado y al monómero como dos solutos diferentes presentes en la disolución y el modelo de fase, en el que se considera al agregado como una fase separada a aquella que contiene el monómero disuelto en el disolvente. El estudio del proceso de auto agregación mediante el modelo de separación de fase es más simple, ya que para aplicar el de acción de masas es necesario conocer las constantes de asociación de todo el proceso, lo cual no siempre es posible. En este trabajo se hará uso del modelo de separación de fases en el estudio de la auto agregación de la Casiopeína.^[29 - 31]

La diferencia entre los agregados coloidales y cualquier otro tipo de coloide radica en que los primeros presentan un equilibrio dinámico es decir, cuando ocurre el proceso de auto agregación las moléculas que conforman el agregado regresan a su estado de monómeros y viceversa.^[27, 32 - 35] La formación de agregados en una disolución es un proceso complejo que involucra equilibrios múltiples y como resultado se espera que los agregados formados tengan un amplio rango de

tamaño, por lo que una descripción apropiada de todos los parámetros del sistema resultaría difícil e impráctico. No obstante, ha sido reportado que el tamaño de los agregados en una disolución sigue un cierto patrón de distribución y que la mayoría de ellos se mantiene en un cierto rango de tamaño, esta afirmación simplifica la descripción del proceso por lo cual en este trabajo se considerará un solo tamaño de agregación y un solo número de agregación.^[36]

Ya ha sido expuesto que cuando una molécula anfifílica es disuelta en un disolvente eventualmente se alcanzará una zona crítica en la cual ciertas propiedades físicas de la disolución comenzarán a cambiar, tales como la tensión superficial, la presión osmótica, la dispersión de la luz, la conductividad, el pH y el calor de dilución. Si experimentalmente se sigue el perfil de estas propiedades en función de la concentración de la molécula anfifílica, como se ejemplifica en la figura 6, será posible obtener información acerca del peso molecular de los agregados, su diámetro, el calor asociado al proceso de disociación y el valor de la concentración del monómero cuando ha comenzado el proceso de auto agregación (CAC).

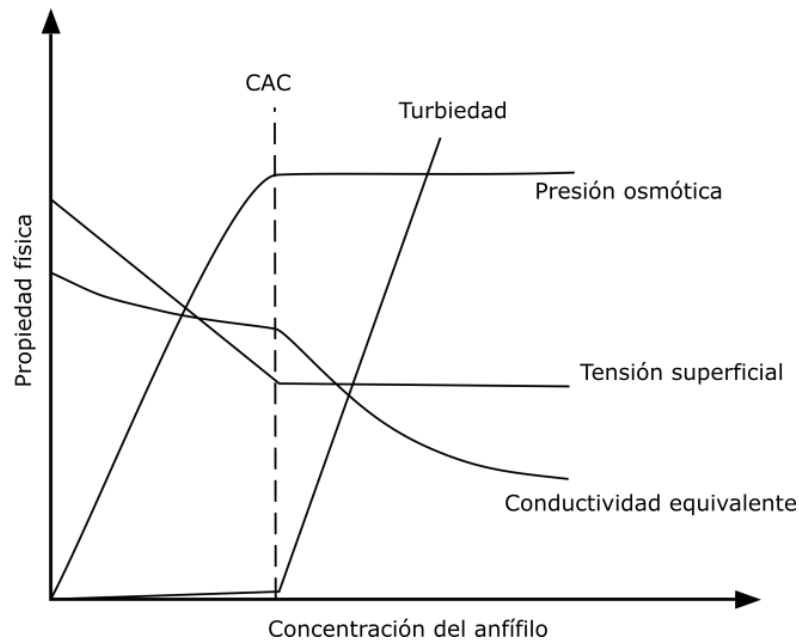


Figura 6. Cambios en algunas propiedades físicas en función de la concentración de la molécula anfifílica.

El estudio de estas propiedades permite obtener una descripción termodinámica completa del proceso de auto asociación mediante la determinación de los siguientes parámetros:

- Número de agregación, n : Es el número de monómeros que conforman el agregado.
- Constante de agregación o asociación, K_A : Considerando que el proceso de auto agregación está en un equilibrio constante de asociación-disociación, es necesario describir una constante de equilibrio para este proceso.
- Entalpía del proceso de disociación: Relacionada con el calor de disociación a dilución infinita.^[36, 37]
- Energía libre de agregación: Criterio que determina el equilibrio del proceso y su espontaneidad. Físicamente también representa la energía libre de transferir una molécula anfifílica desde la fase acuosa hasta la fase agregada.^[38]
- Entropía del proceso de agregación: Puede ser calculada una vez obtenidos los valores de entalpía y energía libre del proceso.^[39]

2.1.1. Estudio de la auto-agregación de fármacos en disolución.

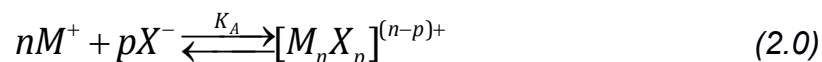
Algunos compuestos farmacológicamente activos son por naturaleza anfifílicos (o hidrofóbicos), como consecuencia poseen la propiedad de auto asociarse. Ejemplos de fármacos anfifílicos con esta propiedad son: fenotiazina, antibióticos peptídicos y no peptídicos, benzodiazepina, tranquilizantes, analgésicos, antibióticos, antihistamínicos, antidepresivos tricíclicos, anestésicos locales, anticolinérgicos, fármacos antiinflamatorios no esteroides y fármacos anticancerígenos. Muchos de éstos fármacos contienen uno o más núcleos aromáticos (condensados o no), mientras que otros son por naturaleza péptidos.

Ha sido demostrado que la capacidad auto asociativa de los fármacos resulta determinante en el mecanismo de acción y buen desempeño de éstos en el organismo, por lo cual resulta apropiado caracterizar este proceso. Se ha establecido que la auto agregación de fármacos es dependiente de la temperatura, fuerza iónica y pH de la disolución, también que este proceso sigue el mismo principio que las moléculas anfifílicas comunes. Por lo tanto puede estudiarse mediante las mismas técnicas que se utilizan para el estudio de la auto agregación de las moléculas anfifílicas.^[40, 41]

2.2. Estudio experimental de la auto agregación.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de auto agregación puede ser estudiado empleando distintas técnicas experimentales, el posterior análisis de los resultados requiere la postulación de modelos que faciliten la obtención de información fisicoquímica con el fin de caracterizar el proceso. En este trabajo se emplea uno de los dos modelos propuestos por William H. Streng y sus

colaboradores.^[36, 37] Estos modelos son importantes ya que posibilitan la consideración de ciertas suposiciones que permiten manipular y ajustar de forma simple los datos obtenidos experimentalmente. En el primer modelo se considera que tanto el ión como el contraión forman parte del agregado, por lo cual la ecuación que describe el equilibrio de asociación tiene la forma siguiente:



Donde

M^+ : Monómero.

X^- : Contraión.

K_A : Constante de asociación-disociación.

n : Número de agregación.

p : Número de aniones que participan en el agregado.

La constante de formación está definida de la siguiente forma:

$$K_A = \frac{\gamma_A}{(\gamma_M)^n (\gamma_X)^p} \times \frac{C_A}{(C_T - nC_A)^n (C_T - pC_A)^p} \quad (2.1)$$

Donde

C_A : Concentración del agregado.

C_T : Concentración total del compuesto en la disolución.

γ_A : Coeficiente de actividad del agregado.

γ_M : Coeficiente de actividad del monómero.

γ_X : Coeficiente de actividad del contraión.

El segundo modelo permite simplificar particularmente el ajuste de los datos resultantes de los experimentos de conductimetría y calorimetría de titulación isotérmica, por lo cual es el que se siguió en el estudio de los agregados de Casiopeína. Este modelo no considera al contraión como parte de la micela, y se

asume que el monómero que forma la micela tiene una carga de 1+, por lo cual el equilibrio de agregación se expresa de la siguiente forma:



La constante de formación respectiva a este modelo se define como sigue:

$$K_A = \frac{\gamma_A}{(\gamma_M)^n} \times \frac{C_A}{(C_T - nC_A)^n} \quad (2.3)$$

Donde

M^+ : Monómero.

$(Mn)^{n+}$: Agregado.

n : Número de agregación.

K_A : Constante de formación.

γ_A : Coeficiente de actividad del agregado.

γ_M : Coeficiente de actividad del monómero.

C_A : Concentración del agregado.

C_T : Concentración total del compuesto en la disolución.

En este trabajo se estudió la auto agregación de las Casiopeínas III-Ea y IV-gly mediante las técnicas de calorimetría de titulación isotérmica, conductimetría, dispersión de la luz estática, espectrofotometría UV-Visible y tensión superficial.^[26, 36 - 38, 40, 42 - 46] Estas técnicas son descritas en las secciones siguientes. Adicionalmente se realizó un estudio teórico de las Casiopeínas y de las posibles estructuras en las que éstas podrían agregarse.

2.2.1. Estudio de la formación de agregados mediante tensión superficial.

2.2.1.1. Tensión superficial y energía superficial.

Para describir que es la tensión superficial es necesario describir dos fenómenos que surgen de la interacción entre dos fases en distinto estado de agregación. El primero es la superficie bidimensional que funge como frontera entre dos fases denominada *interfaz*. El segundo es una porción tridimensional del sistema en el que ocurre una transición continua de las propiedades de una fase a las propiedades de la otra, esta región es denominada *interfase*. Existen distintos tipos de interfases, clasificadas en función de los estados de agregación de las fases participantes tales como: líquido-vapor, líquido-líquido, líquido-sólido, sólido-gas y sólido-sólido. El sistema líquido-vapor es el más adecuado para explicar el concepto de tensión superficial.^[34]

Si se considera a un líquido contenido en un recipiente cerrado en equilibrio con su vapor y a condiciones constantes en el exterior. Con el transcurso del tiempo el sistema evolucionará a un equilibrio dinámico entre el líquido y el vapor, algunas moléculas del líquido se evaporarán mientras que algunas moléculas del vapor se condensarán. Al inicio ambos procesos ocurrirán a una velocidad diferente y al alcanzar paulatinamente el equilibrio la velocidad será la misma para los dos procesos. Al momento del equilibrio las moléculas que conforman la fase líquida y la interfase experimentan diferentes interacciones: las moléculas en el seno de la fase líquida están en contacto únicamente con moléculas idénticas a ellas por lo que las fuerzas de atracción que se ejercen sobre éstas son anuladas ya que son las mismas, esto ocasiona que la energía en esta parte del sistema sea muy baja. Por otra parte, las moléculas que se encuentran en la interfase experimentan distintas interacciones y fuerzas de atracción por lo cual poseen una mayor energía que las moléculas en el seno de la fase líquida. Por un lado están en contacto con moléculas en fase vapor y por el otro con moléculas en fase líquida. Como resultado el sistema intentará disminuir esta energía para mantener su estabilidad por lo que tenderá a reducir la cantidad de moléculas en la interfase para minimizar el área superficial, así se ejercerá una fuerza sobre las moléculas de la interfase aplicada por las moléculas de la fase líquida en dirección al seno de ésta. La fuerza ejercida es denominada tensión superficial.

La formación de una fase requiere de cierto trabajo. Este trabajo resulta proporcional al número de moléculas transportadas del seno de la solución a la superficie y por lo tanto al área de la nueva superficie y puede ser expresado de la forma siguiente: $w = \gamma \Delta A$. Donde la constante de proporcionalidad γ es designada como tensión superficial. La tensión superficial puede definirse de dos maneras; la primera, como energía libre por unidad de área [J m^{-2}] y la segunda como fuerza por unidad de longitud [N m^{-1}].^[47]

La tensión superficial de un líquido es totalmente dependiente de las fuerzas intermoleculares que actúen en este, pero la temperatura también juega un rol fundamental ya que si la temperatura del líquido aumenta la tensión superficial de este disminuirá. Si la temperatura sigue aumentando hasta llegar a la temperatura crítica (T_c) la tensión superficial del líquido desaparecerá por completo, ya que no existirá una fase líquida y una de vapor, sino que se formará una fase continua.^[45]

La tensión superficial de un disolvente puede cambiar cuando un soluto es añadido, este cambio puede presentar distintos comportamientos como se muestra en la figura 7. La curva de la disolución que contiene un soluto tipo I indica que la adición del soluto conduce a un incremento gradual de la tensión superficial que en general no es grande, ejemplos de solutos que causan este comportamiento son los electrólitos fuertes, la sacarosa y el ácido benzoico. El comportamiento de la curva que representa a un soluto tipo II indica que la tensión superficial de la disolución disminuye con cierta regularidad al aumentar la concentración de soluto en ella, los electrolitos débiles y los no electrolitos presentan este comportamiento al ser disueltos en agua. Finalmente el comportamiento de la curva que representa un soluto tipo III es ocasionado por compuestos denominados agentes activos superficiales los cuales poseen la capacidad de disminuir la tensión superficial del disolvente de forma drástica incluso a concentraciones muy pequeñas, ejemplos de estos compuestos son los jabones, ácidos sulfónicos y sulfonatos, así como otros tipos de compuestos orgánicos.^[48]

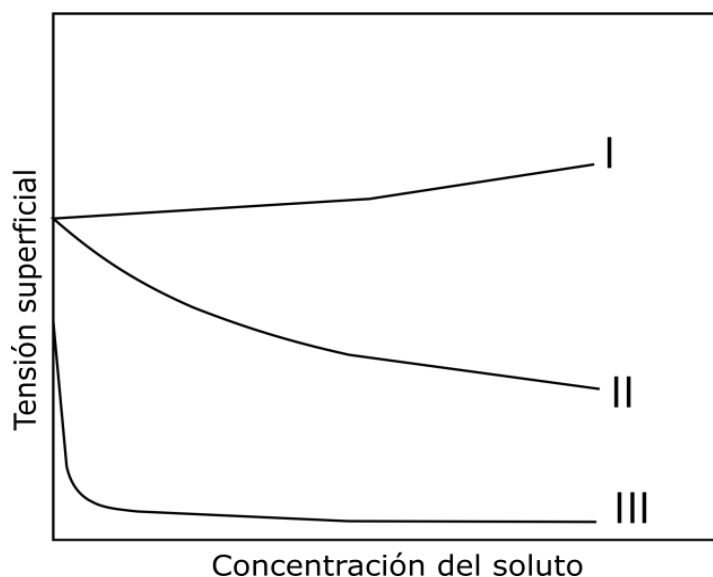


Figura 7. Tensión superficial en función de la concentración y el tipo de soluto.

Cuando un soluto promueve el decrecimiento de la tensión superficial con el aumento de concentración se dice que posee una actividad superficial positiva; por otro lado si el soluto aumenta dicha tensión su actividad superficial es negativa.

2.2.1.2. Métodos para determinar la tensión superficial.

Existen diversas técnicas que pueden ser utilizadas para medir la tensión superficial de un líquido, las cuales de acuerdo a su origen se describen a continuación:^[34, 47, 49]

- Métodos basados en la medida de una presión: Su fundamento teórico es la ecuación de capilaridad de Young-Laplace la cual surge de considerar una interfase líquido-gas que experimenta una diferencia de presión entre una fase y otra, lo que ocasiona que la interfase adopte una forma curva. La ecuación de Young-Laplace relaciona esta diferencia de presión (ΔP) con la curvatura que ocasiona en la interfase. De forma que:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.4)$$

Donde R_1 y R_2 son los radios de curvatura, mientras que ΔP es la diferencia de presión entre ambas fases.

Si el sistema bajo estudio es una superficie esférica como una gota entonces $R_1 = R_2 = R$, por lo cual la ecuación 2.4 puede reescribirse como:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R} \quad (2.5)$$

Los métodos de ascenso capilar y de presión de burbuja corresponden a esta clasificación.

- Métodos basados en una deformación: Se justifican en el hecho de que en ciertas situaciones la tensión superficial tiende a reducir el área interfacial, mientras que otras fuerzas como la gravedad natural o artificial tienden a aumentarla. Dentro de estos métodos se encuentran el método de la gota pendiente, el método de la gota giratoria y el método del volumen de gota.
- Métodos basados en la medición de una fuerza: En estos métodos la tensión superficial es considerada como una fuerza por unidad de longitud. Los métodos de la placa de Wilhelmy y del anillo de Du Noüy pertenecen a esta clasificación, y es este último el método utilizado para determinar la tensión superficial de las disoluciones de Casiopeína estudiadas en este trabajo.

En este método se utiliza el tensiómetro de Du Noüy, el cual consta de un fino alambre de torsión asegurado en una grapa para resistir la tensión del acero en un extremo y una cabeza de torsión en el otro, lo que permite un ajuste fino. La cabeza de torsión tiene una escala y un vernier que permite la lectura con una resolución de 0.5 mN m^{-1} y una incertidumbre de $\pm 0.025 \text{ mN m}^{-1}$. La escala esta graduada de cero a noventa. La posición cero de la balanza se alcanza cuando el brazo que lleva el anillo coincide con la línea horizontal grabada sobre un pequeño círculo de fondo blanco. La plataforma que soporta el recipiente del líquido se puede elevar o bajar utilizando la grapa sobre un eje vertical. El ajuste fino de la plataforma se logra a través de un tornillo micrométrico. Para determinar la tensión superficial se requiere de un anillo de platino o de platino-iridio suspendido horizontalmente de forma paralela con la superficie o interfase. El anillo tiene un radio R y el alambre que lo constituye posee un radio r . De forma que:

$$F = 4\pi R\gamma \quad (2.6)$$

Donde

F : La fuerza requerida para separar el anillo de la disolución, $[\text{mN m}^{-1}]$.

R : Radio medio del anillo, $[\text{cm}]$.

γ : Tensión superficial del líquido.

Para efectuar la determinación de la tensión superficial se sumerge el anillo en el líquido, de tal forma que quede completamente mojado y luego se le hace ascender lentamente. A medida que el anillo sube se forma un menisco de líquido y la fuerza ejercida llega a un valor máximo y después disminuye, desprendiéndose el anillo del líquido y volviendo a su posición original. La obtención del valor de tensión superficial se basa en medir esa fuerza máxima.

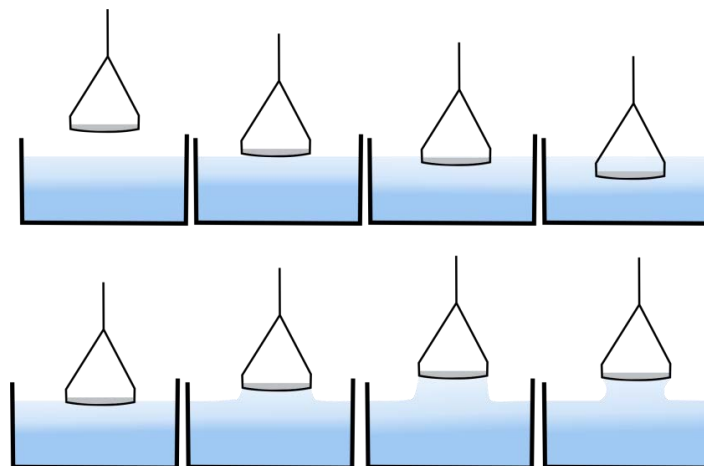


Figura 8. Pasos de la determinación de tensión superficial por el método del anillo de Du Noüy.

Para la correcta aplicación de este método es necesario realizar una corrección a la lectura determinada, ya que de acuerdo con Harkins y Jordan la ecuación 2.6 presenta un error de un poco más de 30%.^[50] Esta corrección se realiza siguiendo el método desarrollado por Zuidema y Waters, quienes basados en tablas de factores de corrección preparadas por Harkins y Jordan propusieron la siguiente relación para realizar la corrección de los valores medidos:^[51]

$$(F - a)^2 = \left(\frac{4b}{\pi^2 R^2} \right) \left(\frac{P}{D - d} \right) + C \quad (2.7)$$

Donde

$F = \frac{S}{P}$: Factor de corrección.

S : Tensión superficial, [N m⁻¹].

P : Máximo empuje en el anillo, [N m⁻¹].

D y d : Densidades de las fases inferior y superior respectivamente.

R : Radio del anillo, [cm].

C : Constante que depende del radio $\frac{r}{R}$, donde r es el radio del alambre que conforma el anillo. $C = 0.04534 - 1.679 \frac{r}{R}$

Las constantes universales para todos los anillos: a : 0.7250 y b : 0.0009075

2.2.2. Estudio de la formación de agregados mediante conductimetría.

2.2.2.1. Conductimetría.

La conductividad es definida como la capacidad que tiene un material para transportar corriente eléctrica a través de él. Los materiales conductores pueden ser clasificados en dos grupos con base en la naturaleza de sus partículas cargadas. En el primer grupo se encuentran los materiales que contienen átomos con una nube electrónica, los electrones dentro de esta nube poseen la capacidad de transportar la electricidad a través del material, ejemplos de este grupo son los

metales. En el segundo grupo se encuentran las disoluciones iónicas también denominadas conductores iónicos, en éstas el flujo de corriente no es provocado por el movimiento de electrones, sino por el movimiento de iones provenientes del electrolito en la disolución. Los electrolitos se clasifican en débiles y fuertes, y pueden ser un ácido, una base o una sal. Un electrolito fuerte se disocia totalmente en la disolución, de tal forma que en esta se encontrarán únicamente los iones provenientes del electrolito y por tanto la concentración de los iones será igual a la concentración del electrolito, ejemplos de electrolitos fuertes son los sólidos iónicos y ácidos fuertes. Por otro lado un electrolito débil se disocia parcialmente por lo que en la disolución se encontrarán presentes los iones provenientes del electrolito, además de electrolito sin disociar. La conductividad de una disolución de un electrolito débil es menor que la de un electrolito fuerte, ya que debido a la presencia de especies sin disociar los iones que transportan la carga tienen menor movilidad.

Los iones presentes en una disolución exhiben un movimiento constante y al azar que se debe a la acción de fuerzas térmicas y de convección. La conductividad de una disolución depende de la concentración de los iones presentes en ella, de la movilidad de éstos, de su valencia y de la temperatura de la disolución.^[52, 53]

La conductividad de una disolución se determina a partir de la oposición que ésta presenta al paso de corriente a través de ella, conocida como resistencia. La resistencia se determina mediante una celda montada en un puente de Wheatstone que consiste en dos electrodos, uno cargado positivamente llamado ánodo, el otro con carga negativa denominado cátodo. Ambos electrodos son sumergidos en la disolución y se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos. La diferencia de potencial propicia la generación de un campo eléctrico y como resultado, el movimiento de los iones presentes en la disolución. Los cationes, iones cargados positivamente migrarán hacia el cátodo mientras que los aniones con carga negativa migrarán hacia el ánodo. Como resultado de la movilidad de los iones se produce una corriente eléctrica la cual es medida por el equipo. Una vez determinado el valor de la corriente (I) dado un voltaje (V) conocido se obtiene el valor de la resistencia (R) de acuerdo a la ley de Ohm.^[53- 55]

$$V = R \times I \quad (2.8)$$

Donde

R : Resistencia, [ohm, Ω].

V : Voltaje, [volt, V].

I : Corriente, [ampere, A].

Una vez determinada la resistencia de la disolución, se determina el valor de la conductancia, que es el inverso de la resistencia:

$$G = \frac{1}{R} \quad (2.9)$$

Donde

G : Conductancia, [Siemens, S o Ω^{-1}].

La resistencia de la disolución también puede ser definida como una relación entre la longitud (l) que existe entre los electrodos y el área (A) de cada electrodo que está en contacto con la disolución y la resistividad eléctrica:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (2.10)$$

Donde

ρ : Resistividad eléctrica de la disolución [Ω cm]. La resistividad es característica de cada sustancia e independiente de la cantidad de materia que se tenga de éste.

l : Longitud entre los electrodos, [cm].

A : Área del electrodo en contacto con la disolución, [cm²].

A partir de las ecuaciones 2.9 y 2.10 se redefine la conductancia y se obtiene la siguiente relación:

$$G = \left(\frac{1}{\rho}\right)\left(\frac{A}{l}\right) = \kappa \left(\frac{A}{l}\right) \quad (2.11)$$

Donde

κ : Conductividad específica, [S cm⁻¹].

La constante de la celda es definida como $K_{celda} = \frac{l}{A}$, la cual es un factor utilizado para convertir el valor de conductancia obtenido mediante la medición experimental a un valor de conductividad. Si esta relación es introducida en la ecuación 2.11, la conductancia puede expresarse en términos de la conductividad y la constante de la celda:

$$G = \left(\frac{1}{\kappa}\right) K_{celda} \quad (2.12)$$

De esta forma la conductividad de la disolución se determina multiplicando el valor de la conductancia obtenido a partir de la determinación de la resistencia de la disolución por la constante de la celda de la misma.

La conductividad específica se refiere a la conductancia de un cubo de disolución de electrolito de 1 cm³ de lado, y es definida como el inverso de la resistividad de la solución:

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad (2.13)$$

La conductividad específica es una propiedad asociativa, lo que significa que en una disolución electrolítica tanto el soluto como el disolvente contribuyen a la conductividad de ésta:

$$\kappa_{disolución} = \kappa_{solvente} + \kappa_{soluta} \quad (2.14)$$

La conductividad específica de una disolución depende de la concentración de las especies iónicas presentes en la disolución, por lo cual una comparación de la conductividad de las disoluciones de un electrolito a distintas concentraciones puede realizarse únicamente si las disoluciones contienen la misma cantidad de iones. Para lograr esto los valores de conductividad específica de las disoluciones deben normalizarse, lo que conlleva a una nueva propiedad: la conductividad molar o equivalente (Λ). Donde la conductividad está dada por todos los iones contenidos en 1 mol de electrolito disuelto en un cierto volumen de solvente.^[53, 55]

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C} \quad (2.15)$$

Donde

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

C : Concentración molar del electrolito añadido, [mol L^{-1}].

2.2.2.1.1. Disociación de electrolitos en disolución.

Existen electrolitos fuertes también denominados verdaderos, y débiles conocidos también como electrolitos de fuerza media o electrolitos potenciales. Ambos tipos de electrolitos se disocian de forma diferente al ser disueltos lo cual tiene implicaciones en el movimiento e interacción de los iones. Un electrolito fuerte se disocia por completo por lo que en la disolución se encontrarán iones que al moverse transportarán las cargas positiva y negativa, esta movilidad será limitada por la interacción ión-ión y ión-disolvente. Sin embargo, si la disolución es sometida a un proceso de dilución los iones se moverán libremente de forma independiente, durante este proceso la conductividad molar de la disolución aumentará gradualmente como consecuencia del libre movimiento de los iones hasta llegar a un punto máximo denominado conductividad molar a dilución infinita, en este punto la concentración del electrolito en la disolución tenderá a cero. Por otro lado, en la disolución de un electrolito débil se encontrarán

presentes moléculas del electrolito sin disociar además de iones positivos y negativos, los cuales tendrán una movilidad limitada debido a las interacciones ión-ión, ión-disolvente, ión-electrolito y electrolito-disolvente, por lo cual la conductividad molar de la disolución descenderá más rápidamente con el aumento de la concentración del electrolito en ella. La figura 9 muestra gráficamente los comportamientos descritos.

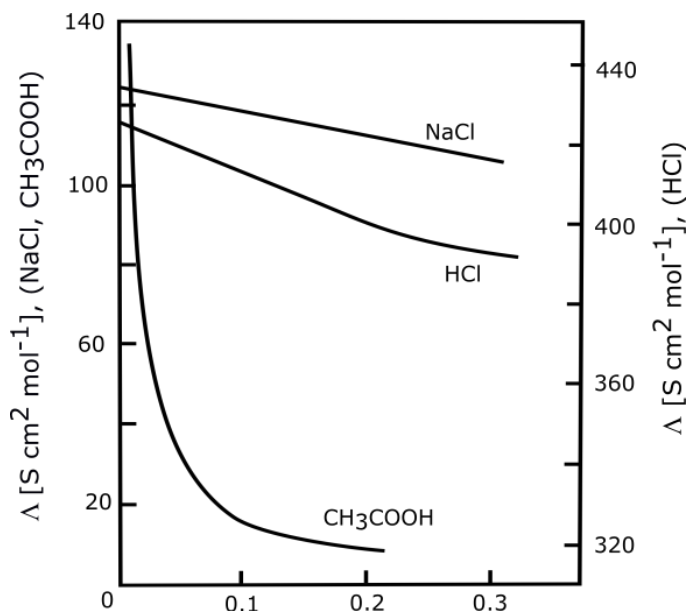


Figura 9. Conductividad equivalente de electrolitos fuertes y débiles.

En el siglo XIX Friedrich Kohlrausch observó y describió mediante ecuaciones el comportamiento de la conductividad molar para electrolitos fuertes y débiles. Para un electrolito fuerte demostró que la conductividad molar varía en forma lineal con respecto a la raíz cuadrada de la concentración total del electrolito, como sigue:

$$\Lambda = b - mC^{1/2} \quad (2.16)$$

La ecuación 2.16 es la descripción de una línea recta en la cual m es la pendiente y es una constante que depende de la naturaleza del electrolito, mientras que b es la ordenada al origen y es un parámetro que representa la conductividad a dilución infinita, es decir cuando $C \rightarrow 0$. A partir de la ecuación 2.16 se establece el siguiente límite funcional:

$$\lim_{C \rightarrow 0} \Lambda = \Lambda^\infty \quad (2.17)$$

Cuando una disolución de electrolito fuerte está muy diluida los iones conducen carga de manera independiente, por lo que la conductividad molar equivalente

puede expresarse como la suma de los valores de conductividad molar límite de cada ión.



Donde λ^∞ es la conductividad molar iónica límite de cada ión, sus valores se encuentran registrados en la literatura para un número importante de cationes y aniones en distintos disolventes.

La relación de Kohlrausch se expresa de la siguiente forma, de acuerdo a la ecuación 2.16:

$$\Lambda = \Lambda^\infty - KC^{1/2} \quad (2.19)$$

Donde

Λ : Conductividad molar, [S cm⁻² mol⁻¹].

Λ^∞ : Conductividad molar límite, [S cm⁻² mol⁻¹].

K : Constante de Kohlrausch, [S cm² mol⁻¹ mol^{-1/2} L^{1/2}] o [S cm^{-1/2} mol^{-3/2}].

C : Concentración molar, [mol L⁻¹].

En el caso de los electrolitos débiles la conductividad molar desciende mucho más rápido con el aumento de la concentración y para describir su comportamiento debe considerarse la concentración efectiva de los iones en solución αC , de esta forma es posible escribir la ecuación de Kohlrausch:

$$\frac{\kappa}{\alpha C_0} = \Lambda^\infty - K\alpha^{1/2} C^{1/2} \quad (2.20)$$

El valor de α no es conocido, por lo cual se denomina al cociente de la conductividad específica y la conductividad molar como Λ , y se obtiene la siguiente relación:

$$\Lambda = \alpha\Lambda^\infty - K\alpha^{1/2} C^{1/2} \quad (2.21)$$

α es función de C por lo que se tiene una función compleja, por otro lado la determinación de Λ^∞ resulta difícil, por lo que se hace uso de los estudios de Arrhenius y Ostwald en este tema para determinar los parámetros analíticos requeridos.^[54, 55]

2.2.2.2. Estudio de la auto agregación de fármacos mediante conductimetría.

El estudio de la auto agregación mediante la técnica de conductimetría provee información significativa para determinar si los agregados han comenzado a formarse y si esto es así, también es posible obtener información acerca de los agregados formados, el valor de la CAC, el número de agregación n y la constante de agregación K_A .

La aplicación de esta técnica en el estudio de la auto agregación puede realizarse a partir de considerar al monómero y al agregado formado como dos electrolitos diferentes con cargas y movilidades igualmente distintas, por lo cual la aparición de agregados en la solución afectará la conductividad total (κ) de la misma y resulta necesario expresar la ecuación 2.14 tomando en cuenta la aseveración anterior.^[36]

$$\kappa = \kappa_A + \kappa_M \quad (2.22)$$

Donde

κ_A : Conductividad del agregado.

κ_M : Conductividad del monómero.

Si se reescribe la ecuación 2.15 en términos de la conductividad molar Λ , se obtiene:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C_T} = \frac{C_M}{C_T} \Lambda_M + \frac{C_A}{C_T} \Lambda_A = \frac{(C_T - nC_A)}{C_T} \Lambda_M + \frac{C_A}{C_T} \Lambda_A \quad (2.23)$$

Donde

Λ : Conductividad molar total.

Λ_A : Conductividad del agregado.

Λ_M : Conductividad del monómero.

Además de estudiar al agregado y al monómero como dos electrolitos distintos ambas especies son consideradas como electrolitos fuertes, lo que implica que Λ_A y Λ_M pueden ser expresados como funciones lineales de las raíces cuadradas de C_A y C_M respectivamente de acuerdo a la ley de Onsager, por lo cual se obtiene la siguiente ecuación:^[37]

$$\Lambda = \frac{(C_T - nC_A)}{C_T} (a - b\sqrt{C_T - nC_A}) + \frac{C_M}{C_T} (a' - b'\sqrt{C_A}) \quad (2.24)$$

Donde

a : Conductividad molar límite (conductividad molar a dilución infinita).

b : Constante para el monómero.

a' : Conductividad molar del agregado.

b' : Constante para el agregado.

2.2.3. Estudio de la auto agregación mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Existen dos aproximaciones para estudiar el equilibrio de enlace entre dos moléculas. El primero se basa en la medición directa de la concentración de las moléculas de interés en su forma libre y enlazada mediante una técnica denominada diálisis al equilibrio; mientras que el segundo considera la existencia de cambios físicos observables los cuales son proporcionales al grado de unión de las moléculas. La calorimetría de titulación isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) pertenece a la segunda aproximación. Esta técnica se utiliza principalmente para determinar el calor absorbido o liberado por interacciones biomoleculares como ligante-proteína, proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-ARN y enzima-sustrato; también puede ser utilizada en el estudio de especies de menor peso molecular que en disolución poseen la capacidad de auto agregarse y formar estructuras como micelas y liposomas.^[56]

El sistema de calorimetría de titulación isotérmica consiste en dos celdas de titulación colocadas dentro de una cámara adiabática. Una de ellas es la celda de referencia la cual contiene generalmente agua o el medio en el cual se encuentre disuelto el compuesto a estudiar, la segunda celda contiene la muestra de interés la cual usualmente es una biomolécula, específicamente una proteína. Se compone también de un termopar que permite ajustar ambas celdas antes del experimento a la temperatura a la cual se realizará este. Por otro lado se tiene una jeringa que a su vez funge como agitador, en ella se deposita la disolución a estudiar.

Durante el experimento, pequeñas alícuotas de la disolución son inyectadas en la celda de reacción en función de cierto tiempo determinado. La interacción de ambos compuestos liberará o absorberá calor dependiendo de si la interacción es exotérmica o endotérmica respectivamente, lo que provocará una diferencia de temperatura (ΔT) entre las celdas que será detectada por el termopar después de cada inyección y como resultado producirá una diferencia de potencial (ΔV) proporcional a la ΔT . La diferencia de potencial será leído por un sistema de control computarizado que ajustará la potencia que debe aplicarse o retirarse para mantener ambas celdas a la misma temperatura, es decir $\Delta T = 0$. Durante el experimento se registra esta potencia en función del tiempo en el cual se realiza el experimento en una curva llamada isoterma.^[57]

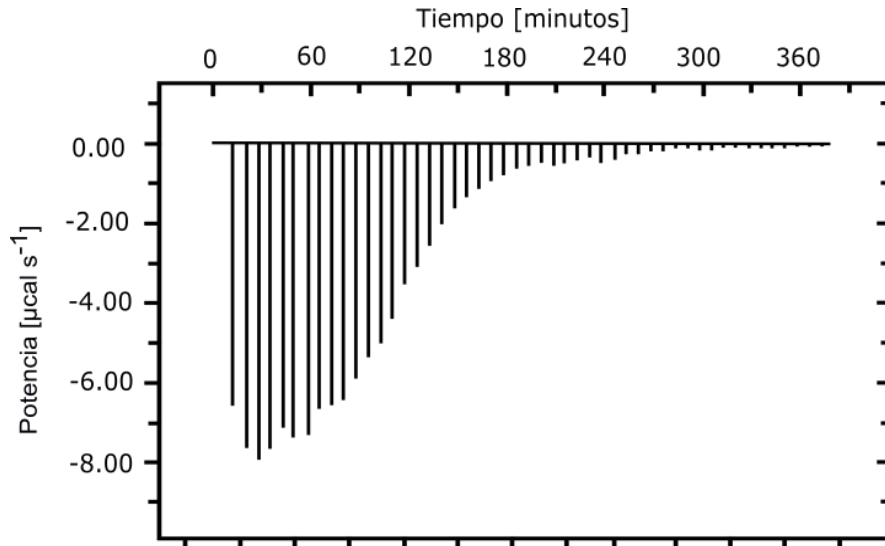


Figura 10. Isotherma de titulación.

En la figura 10 se aprecia que al inicio del experimento la potencia necesaria para equilibrar la temperatura de las celdas es mayor, y al transcurrir el tiempo esta potencia disminuye. Esto se debe a que al realizarse la primera inyección en la celda de reacción hay un exceso de moléculas dispuestas a interactuar con el ligante inyectado. Esta primera interacción provoca un cambio súbito en la temperatura de la celda de reacción y al avanzar el experimento la cantidad de moléculas en la celda de reacción disponibles para interactuar con el ligante disminuirá. Como resultado, la temperatura de la celda de reacción variará en menor proporción con respecto a la temperatura de la celda de referencia, lo que ocasionará que la potencia necesaria para compensar la ΔT disminuirá.

El área de cada pico registrado en la isoterma es integrada y graficada con respecto a la relación molar de ligante-molécula. La isoterma resultante puede ajustarse a un modelo de enlace del que es posible obtener el valor de la constante de asociación del proceso K_A , el cual sustituido en la ecuación 2.25 permite obtener la energía libre de Gibbs del proceso de asociación de la siguiente forma:

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (2.25)$$

El valor de la entalpía del proceso también se extrae directamente de la isoterma y proporciona la cantidad de calor liberado por mol del enlace de ligante en la ecuación. Si se emplea la siguiente relación $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$, será posible obtener el valor de entropía del proceso a la temperatura fijada como se indica a continuación:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (2.26)$$

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica muy utilizada en el estudio de sistemas biológicos complejos ya que como se ha explicado ofrece la gran ventaja de que a partir de un solo experimento y sin la necesidad de modificar los componentes de enlace, ya sea con marcadores fluorescentes o por medio de inmovilización es posible obtener un perfil termodinámico completo asociado a la interacción molecular estudiada.^[57]

2.2.3.1. Aplicación de la calorimetría de titulación isotérmica al estudio de las interacciones intermoleculares.

Las interacciones intermoleculares estudiadas mediante esta técnica pueden ser de dos tipos, homodiméricas en las cuales interactúan dos moléculas idénticas y heterodiméricas donde la interacción se realiza entre dos moléculas diferentes. Los dos tipos de interacción siguen el mismo esquema químico basado en el equilibrio reversible de asociación:



Donde M_1 y M_2 representan a las moléculas que interactúan. La fuerza de la interacción es descrita por la constante de asociación (K_A), o de disociación (K_D):

$$K_A = \frac{[M_1M_2]}{[M_1][M_2]} = \frac{1}{K_D} \quad (2.28)$$

Donde $[M_1]$ y $[M_2]$ representan las concentraciones de las moléculas libres y $[M_1M_2]$ a la concentración del complejo asociado.

Las constantes de asociación y disociación están relacionadas con la energía libre de Gibbs y como ya fue mencionado, pueden escribirse en términos de entalpía y entropía de siguiente forma:

$$\Delta G_A = -RT \ln K_A = \Delta H_A - T\Delta S_A \quad (2.29)$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D = \Delta H_D - T\Delta S_D \quad (2.30)$$

Donde

R : Constante de los gases, $[8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}]$

T : Temperatura absoluta, $[K]$

Ya que el objetivo de este trabajo es analizar la auto asociación entre dos moléculas idénticas de Casiopeína, a continuación se describe el estudio de las interacciones homodiméricas mediante calorimetría de titulación isotérmica.

La fuerza de la interacción homodimérica es determinada mediante experimentos de dilución. Una disolución del reactivo a estudiar es depositada en la jeringa, por otro lado en la celda de reacción se deposita el disolvente sin reactivo. La muestra contenida en la jeringa es inyectada gradualmente en la celda lo que ocasiona que esta comience a diluirse y posteriormente inicie el proceso de disociación que conduce al sistema a una serie de estados de equilibrio. La composición de cada estado es regido por la constante de disociación K_D . Dada la concentración total de la macromolécula $[M]_T$ en la celda del calorímetro la constante de disociación determina la distribución entre las dos especies, monómero $[M]$ y dímero $[M_2]$.

$$K_D = \frac{[M]^2}{[M_2]} \quad (2.31)$$

El calor asociado a cada inyección q_i es proporcional al incremento de la concentración del monómero $[M]$ en la celda calorimétrica después de la inyección.

$$q_i = V \Delta H_D \left([M]_i - [M]_{i-1} - F_0 [M]_0 \frac{v}{V} \right) \quad (2.32)$$

Donde

ΔH_D : Entalpía de disociación por monómero.

V : Volumen en la celda calorimétrica.

v : Volumen inyectado.

$[M]_0$: Concentración total de la macromolécula por monómero en la jeringa.

F_0 : Fracción del monómero en la solución concentrada colocada en la jeringa.

El último término del paréntesis es una corrección que considera únicamente el incremento de la concentración del monómero en la celda debido a la inyección de monómero y por tanto, no contribuye al calor.^[58]

El estudio de la auto agregación de Casiopeína mediante esta técnica se realiza a partir de la preparación de una disolución con una concentración de Casiopeína superior a la concentración de agregación crítica. Esto con la finalidad de asegurar la presencia de agregados en la disolución a estudiar ya que éstos se presentan en cantidades significativas únicamente cuando la concentración del monómero en la solución sobrepasa el punto crítico de agregación. Esta disolución será inyectada en la celda que contiene únicamente el mismo disolvente utilizado para

la preparación de la disolución concentrada y alícuotas de esta disolución serán adicionadas en la celda. A medida que la concentración de la molécula en la celda de reacción aumenta, el proceso de disociación es menos favorecido y por lo tanto la diferencia de temperatura entre las celdas disminuye, las inyecciones continúan hasta que no se detecte algún calor significativo. El análisis de regresión no lineal de q_i permite la estimación de los parámetros termodinámicos K_D , ΔH_D y por lo tanto también de ΔG_D y ΔS_D . Estos valores proporcionarán una descripción termodinámica completa del proceso de disociación.^[59]

2.2.4. Interacción de la luz con la materia y su aplicación en el estudio de agregados en disolución.

La radiación electromagnética se considera como la propagación de energía a través del espacio sin soporte de materia, es decir a través de ondas producidas por oscilación o aceleración de una carga eléctrica. El espectro electromagnético es un ordenamiento de estas ondas, las cuales poseen diferentes características y son clasificadas de acuerdo a su longitud de onda, su frecuencia y su velocidad. La frecuencia y la longitud de onda son inversamente proporcionales. La longitud de onda (λ) es la distancia entre cresta y cresta de la onda y se mide en unidades de longitud, en el Sistema Internacional su unidad es el metro [m]. La frecuencia (ν) representa el número de oscilaciones completas por segundo de la onda, su unidad es el Hertz [Hz] o [s^{-1}]. La velocidad de la onda (c) es una constante para un medio determinado, en el vacío es $300,000 \text{ km s}^{-1}$; las definiciones anteriores se relacionan de la siguiente forma: $\lambda\nu = c$

El espectro electromagnético está dividido de forma un poco arbitraria en regiones de longitud de onda y las ondas electromagnéticas se clasifican en este de acuerdo a su longitud de onda.^[60]

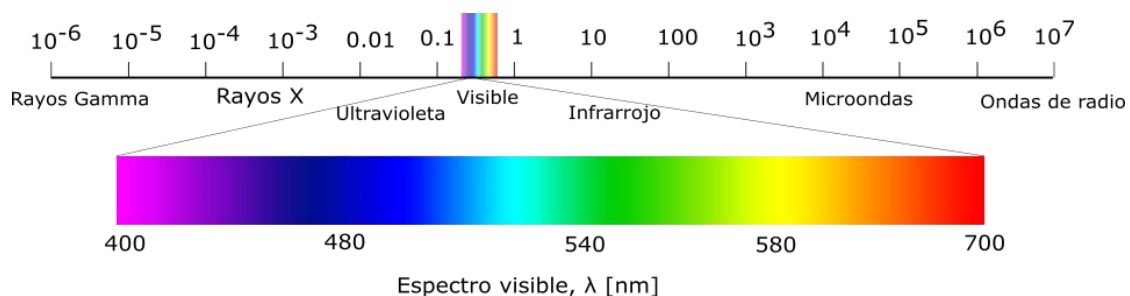


Figura 11. Clasificación del espectro electromagnético.

Como puede observarse en la figura 11 únicamente una pequeña porción del espectro electromagnético puede ser percibido por el ojo humano. Esta región es denominada *visible*, la percepción de esta región es la causa de la sensación de color que observamos.

Cuando la energía electromagnética, específicamente la luz visible, interactúa con la materia se producen distintos fenómenos como la reflexión en la cual un haz de luz que incide sobre una superficie es rebotado por ésta. La reflexión puede ser especular cuando la luz es rebotada en una dirección definida, mientras que si la luz incide sobre una superficie rugosa es reflejada en varias direcciones lo que se conoce como reflexión difusa. Otro fenómeno es la refracción, en éste un rayo de luz que incide en un medio con dirección y velocidad determinadas puede atravesarlo, al hacer esto su velocidad original cambia y como consecuencia también lo hace su dirección. El cambio de velocidad depende del índice de refracción del medio, el cual a su vez es dependiente de la densidad de éste. Mientras más denso sea, la velocidad a la cual el rayo atraviesa el medio será menor con respecto a la velocidad inicial.

La difracción es otro fenómeno que se produce cuando la luz al interactuar o chocar con un obstáculo de dimensiones comparables a su propia longitud de onda debe rodear el obstáculo causando perturbaciones en la propagación de su onda. Por último en la absorción, la porción del haz de luz que no es reflejada por la superficie puede ser transformada en otras formas de energía, como calor. El resultado de la absorción es la percepción de los colores de un objeto.

Los fenómenos descritos anteriormente han dado paso al desarrollo de diversas técnicas analíticas, las cuales aprovechan la interacción de la luz con la materia para estudiar sistemas. A estas técnicas pertenecen las utilizadas en el presente trabajo para estudiar la auto agregación de las moléculas de Casiopeína, espectrofotometría UV-Vis, dispersión dinámica y estática de la luz, las cuales serán descritas en las siguientes secciones.

2.2.4.1. Espectrofotometría ultravioleta y visible (UV-Vis).

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica basada en la interacción de la radiación electromagnética con la materia mediante la cual es posible identificar y cuantificar elementos presentes en distintos medios. Ésta técnica surge de considerar a la luz como una forma de energía electromagnética, la cual es caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) y una energía (E), la relación entre ellas está dada por la ecuación de Planck:

$$E = h\nu = hc / \lambda \quad (2.33)$$

Donde

E : Energía transportada por cuanto de radiación o fotón, [J].

h : Constante de Planck, [6.6256×10^{-34} J s].

c : Velocidad de la luz, [2.9979×10^8 m s⁻¹].

λ : Longitud de onda, [m].

ν : Frecuencia de la radiación, [s⁻¹].

Como ya se ha mencionado cuando la luz interactúa con la materia pueden producirse distintos fenómenos, en la espectrofotometría se consideran dos de éstos fenómenos: la absorción y la transmisión. Cuando se hace incidir radiación UV-Vis de intensidad inicial (I_0) sobre una sustancia que contiene especies capaces de absorber parte de esa radiación, denominados cromóforos, éstos adquieren energía como consecuencia de la absorción. Como resultado se produce la transición de un electrón de su estado basal A a un estado excitado A* ($A + h\nu \rightarrow A^*$). Debido a que una fracción de la radiación ha sido absorbida la intensidad del haz de luz incidente disminuirá al atravesar la muestra (I); la fracción de la radiación no absorbida por el cromóforo es denominada transmitancia ($T = I / I_0$).

La ley de Beer-Lambert-Bouguer permite relacionar la luz absorbida con la transmitida de acuerdo con la siguiente expresión: $A = -\log T = -\log(I / I_0)$.

En el desarrollo de esta técnica es indispensable la presencia de un cromóforo en la disolución, es decir una molécula con capacidad para absorber la radiación. De forma que la capacidad de absorción de la muestra será determinada por la concentración del cromóforo en ella, de la siguiente forma: $A = \varepsilon \ell c$ ^[62]

Donde

A : Absorbancia medida

ε : Coeficiente de absortividad molar, característico de cada sustancia absorbente a cada longitud de onda, [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$].

ℓ : Distancia de la trayectoria recorrida por la luz dentro de la muestra, [cm].

c : Concentración de la muestra, [mol L^{-1}].

Un experimento de espectrofotometría se realiza empleando un espectrofotómetro, el cual es un aparato que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución de referencia con la solución a estudiar. Para hacerlo se mide primero la absorbancia del disolvente, o blanco, al que se le asigna un valor de cero de forma que la intensidad incidente (I_0) y transmitida (I) sean iguales, y por lo tanto la absorbancia es cero. A continuación, se pone en el portador de muestras la celda con la muestra y se lee la absorbancia de ésta. El resultado del experimento se registra en un espectro de absorción, que es una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida por la muestra a diferentes valores de longitud de onda.

Un espectrofotómetro está constituido por los siguientes componentes: (i) una fuente luminosa que puede ser una lámpara incandescente de tungsteno para luz visible o un arco de deuterio para luz ultravioleta; (ii) un monocromador que consiste en: una ranura que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, un conjunto de espejos para hacer pasar la luz a través del sistema óptico, una red de difracción o prisma para separar las longitudes de onda de la radiación y una rendija de salida para seleccionar la longitud de onda con la cual se quiere iluminar la muestra; (iii) un portador de muestras que es un compartimento ajustado a la luz con una tapa que proporciona seguridad, puede sostener una o más celdas de la muestra que se analiza; (iv) una celda que usualmente es de cuarzo transparente, también las hay de cristal y plástico sin embargo estas últimas tienen la capacidad de absorber el UV, lo que limita su utilidad. La celda estándar es rectangular, su ancho interno es de 1 cm (en la ecuación de Beer-Lambert-Bouguer $\ell = 1$ cm), y su volumen interno es de 2.5 mL; (v) un sistema detector que recibe la intensidad luminosa que sale de la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la intensidad recibida; (vi) un sistema de procesamiento y lectura en el cual la señal recibida por el detector es amplificada y transformada para que su intensidad resulte proporcional al porcentaje de transmitancia/absorbancia. La señal es procesada por un software y convertida en un dispositivo de lectura.

La espectrofotometría se emplea generalmente en la determinación cuantitativa de la concentración de especies químicas en disolución, como compuestos orgánicos muy conjugados y iones metálicos de transición. Estos últimos presentan la propiedad de que las disoluciones que los contienen son coloridas ya que absorben luz visible debido a la excitación de los electrones del metal de un estado electrónico a otro.

Dado que las disoluciones de Casiopeína presentan un color azul debido al cobre que contienen esta técnica resulta ideal para estudiar la capacidad de absorción de las disoluciones en función de la concentración de Casiopeína en ellas y mediante un espectro de absorción determinar el punto en el que ocurre la agregación.^[42, 43, 63 - 65]

2.2.4.2. Dispersión de la luz.

La dispersión de la luz es un efecto combinado de la reflexión, la refracción y la absorción, en el cual se produce una alteración de la dirección e intensidad del haz de luz.

Como técnica analítica, la dispersión de la luz ofrece la ventaja de ser un método no invasivo el cual a partir del estudio de la interacción de la luz con las partículas en disolución o suspensión provee de información importante que permite describir y comprender el sistema de estudio, ejemplos de estas técnicas son la dispersión de la luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering) y la dispersión de luz estática (SLS, Static Light Scattering).

La diferencia entre estas técnicas es que en la dispersión de luz estática se obtiene información acerca del peso molecular de partícula a partir del estudio del promedio de la intensidad de luz dispersada en varios ángulos en un cierto intervalo de tiempo, lo que permite eliminar las fluctuaciones en la intensidad de la dispersión. En la dispersión de luz dinámica se mide la fluctuación de la luz dispersada con respecto al tiempo y se correlaciona con el movimiento Browniano de las partículas bajo estudio.^[66, 67]

Puesto que la dispersión de la luz estática proporciona información más significativa, en este trabajo se empleó únicamente esta técnica para estudiar la auto agregación de las Casiopeínas. Sin embargo, a continuación se presenta la descripción de la aplicación ambas técnicas al estudio del proceso de auto agregación.

2.2.4.2.1. Dispersión de la luz estática en el estudio de agregados.

También conocida como dispersión clásica de la luz, es una técnica no invasiva utilizada para determinar el peso molecular de macromoléculas y polímeros así como su radio de giro, denominado también radio o diámetro hidrodinámico mediante la intensidad de luz dispersada por la molécula.

La dispersión de luz estática se basa en la teoría de Rayleigh, la cual describe la relación entre la intensidad de la luz dispersada por una muestra con su tamaño y peso molecular, las propiedades de la luz dispersada varían dependiendo de la partícula que realiza la dispersión, lo cual es descrito en la ecuación de Rayleigh.

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{PM} + 2A_2C \right) \left(\frac{1}{P_{\theta}} \right) \quad (2.34)$$

Donde

R_θ : Es el radio de Rayleigh al ángulo de medida, relación entre la intensidad de la luz dispersada y la luz incidente.

C : Concentración de la muestra, [mol L^{-1}].

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

A_2 : Segundo coeficiente virial de la muestra, [$\text{mol g}^{-2} \text{L}^{-1}$]. Describe la fuerza de interacción entre las partículas bajo estudio y el disolvente o medio dispersante.

P_θ : Dependencia angular de la intensidad de dispersión de la muestra.

K : Constante óptica definida de la siguiente forma:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2.35)$$

Donde

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

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

n_0 : Índice de refracción del solvente.

$\frac{dn}{dc}$: Incremento diferencial del índice de refracción de la muestra.

La ecuación de Rayleigh establece que la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado es dependiente de ciertos factores como el peso molecular y tamaño de partícula de la muestra bajo estudio, por lo que moléculas de mayor peso y tamaño dispersarán más luz. Los incrementos en la intensidad de la luz dispersada varían de forma lineal con el peso molecular.

El término P_θ de la ecuación 2.34 incorpora la dependencia angular de la intensidad de la dispersión de una muestra, esta dependencia surge de la interferencia constructiva y destructiva de la dispersión de la luz desde diferentes posiciones de la misma partícula. Este fenómeno es denominado dispersión de Mie y ocurre cuando el tamaño de la partícula es del mismo orden que la longitud de onda de la luz. No obstante, cuando las partículas en la solución son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente se eliminará la dispersión múltiple de fotones, bajo estas condiciones el valor de P_θ se reducirá a 1 y la dependencia angular de la dispersión con la intensidad se perderá, este tipo de dispersión es conocida como dispersión de Rayleigh. Por lo cual la ecuación 2.34 es reescrita como sigue:

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{PM} + 2A_2C \right) \quad (2.36)$$

Para obtener información de la molécula bajo estudio a partir de esta técnica es necesario contar con una muestra estándar de la cual se conozca el valor de sus radios a diferentes longitudes de onda y temperatura, el tolueno es la muestra estándar más utilizada ya que además de cumplir con lo anterior presenta la gran ventaja de que puede ser obtenido en su forma pura muy fácilmente. Se determinará primero la intensidad de la luz dispersada de la muestra estándar y se obtendrá el radio de Rayleigh para ésta y luego se harán las determinaciones para la muestra bajo estudio a diferentes concentraciones y se comparará con la información obtenida para el estándar. En el caso de utilizar tolueno, el radio de Rayleigh se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$R_{\theta} = \frac{I_A n_0^2}{I_T n_T} R_T \quad (2.37)$$

Donde

I_A : Intensidad residual de la luz dispersada de la muestra bajo estudio (intensidad de la muestra-intensidad del solvente).

I_T : Intensidad de la dispersión del tolueno.

n_0 : Índice de refracción del solvente.

n_T : Índice de refracción del tolueno.

R_T : Radio de Rayleigh del tolueno.

El equipo Zetasizer μ V utilizado en este trabajo determina la intensidad de la luz dispersada (KC/R_{θ}) a varias concentraciones de la muestra bajo estudio a un ángulo con un valor determinado. El resultado es posteriormente comparado con la dispersión producida por la muestra estándar, lo que es después representado en un gráfico de Debye a partir del cual el peso molecular promedio de las partículas se determina directamente del punto de intersección cuando la concentración del soluto en la muestra es cero, es decir: $\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{PM} \right)$. [68-72]

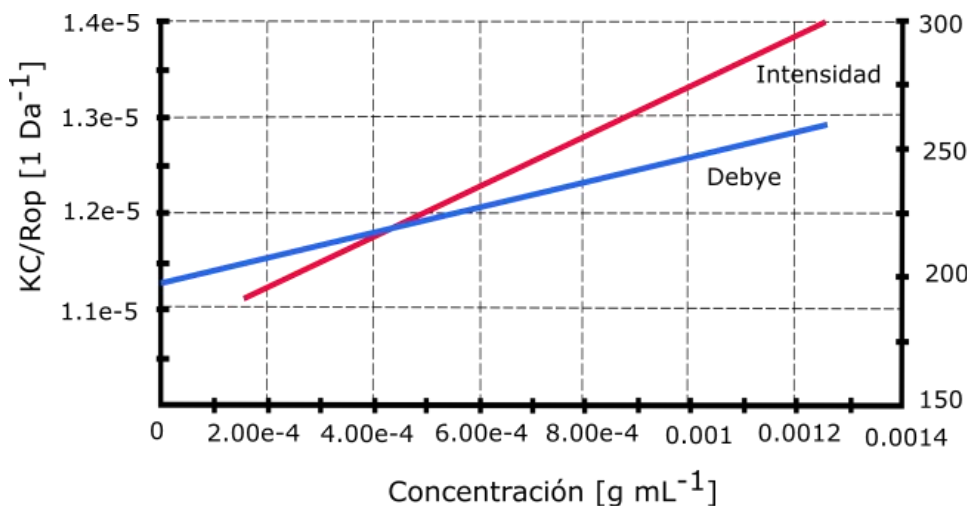


Figura 12. Gráfico de Debye.

2.2.4.2.2. Dispersión de la luz dinámica en el estudio de agregados.

La dispersión de la luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (PCS, Photon Correlation Spectroscopy), o como dispersión QELS (Quasi Elastic Light Scattering) es una técnica fisicoquímica que ha sido empleada tradicionalmente en la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en disolución como proteínas y polímeros. Recientemente debido a la sensibilidad que ofrece esta técnica en la evaluación de interacciones macromoleculares y en la detección de la formación de agregados en solución, la DLS ha sido aplicada al estudio del crecimiento de cristales y del inicio de la agregación o la nucleación de macromoléculas.^[73]

En esta técnica se considera el impacto de las moléculas de un disolvente contra las partículas suspendidas en él. Como consecuencia de estas colisiones las partículas suspendidas se desplazan de forma aleatoria con una velocidad inversamente proporcional al tamaño de la partícula, es decir moléculas más grandes se desplazan más lentamente que moléculas más pequeñas.

El fenómeno antes descrito, denominado movimiento Browniano ocasiona que la intensidad de luz dispersada por la disolución varíe con el tiempo. Esta fluctuación es totalmente dependiente del tamaño de las partículas, con las de mayor tamaño y poca movilidad la variación de la intensidad en un determinado tiempo será prácticamente indetectable, mientras que las partículas pequeñas con mayor facilidad de movimiento ocasionarán que la intensidad de luz dispersada varíe de

forma considerable. La intensidad de la luz dispersada es seguida en un gráfico a partir del cual es posible determinar el tamaño de la partícula, como se ilustra en la figura 13.

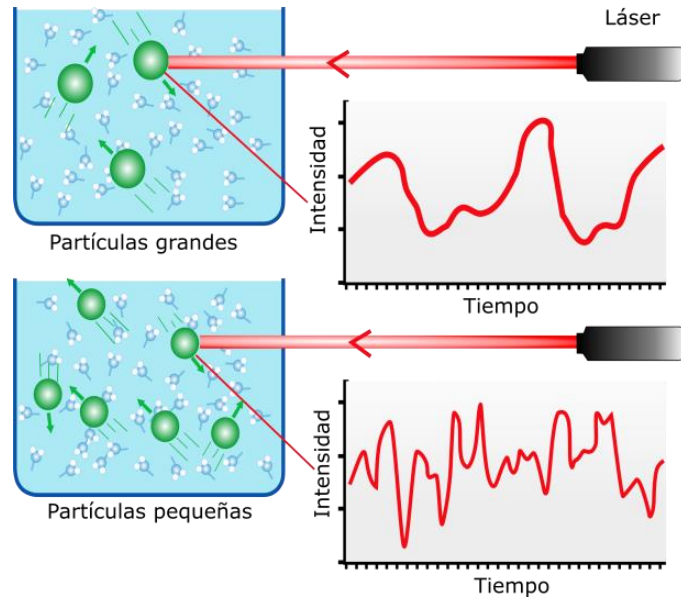


Figura 13. Gráfico de luz dispersada en un tiempo.

En un experimento de DLS una muestra es irradiada con un haz de luz de longitud de onda λ_0 y se determina la intensidad de la luz dispersada $I_{\theta_r}(t)$ a un ángulo de medición θ_r . A partir de la luz dispersada en cada ángulo de medición se obtiene la función de autocorrelación, la cual representa el promedio de los valores de la intensidad de luz medida a diferentes intervalos de tiempo.

La intensidad de luz dispersada en el tiempo es procesada mediante una función de correlación ($g(\tau)$) que compara la intensidad de luz dispersada a un tiempo inicial $I(t)$ con la intensidad de luz dispersada a un tiempo final $I(t + \tau)$.

$$g(\tau) = \frac{I(t)I(t + \tau)}{I(T)^2} \quad (2.38)$$

En un sistema monodisperso con movimiento Browniano la función de correlación disminuirá exponencialmente $g(\tau) = e^{-\Gamma\tau}$

Donde Γ es la velocidad a la cual disminuye $g(t)$, y está relacionada con la difusión de la siguiente forma: $\Gamma = -Dq^2$

Donde D es el coeficiente de difusión 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:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \operatorname{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.39)$$

Donde

λ_0 : Longitud del láser incidente en el vacío, [nm].

θ : Ángulo de dispersión.

n : Índice de refracción del disolvente.

Una vez determinado el coeficiente de difusión traslacional D , es posible obtener el diámetro hidrodinámico de la partícula de interés mediante la ecuación Stokes-Einstein.^[74]

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu D_H} \quad (2.40)$$

Donde

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

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

T : Temperatura, [K].

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

D_H : Diámetro hidrodinámico de las partículas en disolución, [nm].

2.3. Estudio teórico de la auto agregación.

2.3.1. Química computacional.

La química teórica puede ser definida como la descripción matemática de la química a partir de la cual es posible generar un método matemático que al ser desarrollado con suficiencia puede ser automatizado para ser implementado por una computadora, dando pauta al origen de la química computacional.

La química computacional es una herramienta valiosa ya que ofrece la posibilidad de obtener información y caracterizar un sistema químico complementando estudios experimentales.^[75 - 79]

El objetivo principal del estudio de un sistema (molécula) mediante química computacional es determinar las estructuras más estables de este a partir del cálculo de su energía total. A partir de este análisis es posible obtener información que permite caracterizar un sistema químico, como:

- Geometría molecular: forma de las moléculas, longitud de enlaces, ángulos y ángulos diedros.
- Reactividad química: donde se concentran los electrones (nucleofílico) y hacia donde van (electrofílico), para predecir donde diferentes tipos de reactivos atacarán a una molécula.
- Espectros de IR, UV, RMN.
- Propiedades físicas de las sustancias: dependen de las propiedades individuales de las moléculas y cómo interactúan en el material.

El cálculo de la energía de una molécula puede realizarse mediante distintos métodos los cuales pueden ser clasificados en dos grupos, los métodos de mecánica molecular y los métodos de mecánica cuántica.

La finalidad de la aplicación de la química computacional a este trabajo es simplemente complementar el estudio experimental realizado y no profundizar en un análisis computacional demasiado extenso y complejo, por lo cual los métodos mencionados anteriormente serán descritos de forma general y breve.^[75-79]

Los métodos de mecánica molecular se basan en un modelo mecánico clásico simple en el que las moléculas se consideran como un conjunto de átomos en el espacio unidos entre sí mediante enlaces y la energía de la molécula se expresa como función de su resistencia al estiramiento y encogimiento de los enlaces, y se utiliza esta función (ecuación) de energía para encontrar las longitudes de enlace, ángulos, y ángulos diedros que correspondan a la geometría con la menor energía molecular.

La ventaja de estos cálculos es que debido a su fundamento clásico, son muy rápidos y pueden ser aplicados a sistemas muy grandes, su desventaja es que al

ser clásicos no resuelven la ecuación de Schrödinger del sistema por lo cual no pueden ser aplicados a sistemas en los que se rompan o formen enlaces.

Dentro de sus más importantes aplicaciones se encuentran: la predicción de propiedades y estructuras de biomoléculas, el diseño de nuevos fármacos, la estimación de los productos más estables en síntesis orgánica así como diseñar rutas directas para obtener la molécula objetivo; en dinámica molecular se utiliza para generar las fuerzas que actúan sobre una molécula y calcular sus movimientos.

Los métodos de mecánica cuántica se basan en el postulado principal de que existe una función de onda Ψ para cada sistema químico y que si un operador apropiado actúa sobre esta función se obtendrá una propiedad observable del sistema de la siguiente forma: $\hat{\vartheta}\Psi = e\Psi$ Donde ϑ es un operador y e es el valor escalar de alguna propiedad del sistema.

Si la propiedad a obtener es el valor de la energía del sistema debe utilizarse el operador Hamiltoniano, por lo que se obtiene:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.41)$$

Donde

Ψ : Función de onda. La función de onda es una descripción probabilística del comportamiento de electrones, puede describir la probabilidad de que los electrones se localicen en cierto punto, pero no predice el lugar exacto donde se encuentran.

E : Energía.

\hat{H} : Operador Hamiltoniano.

La ecuación 2.41 fue propuesta en 1926 por Erwin Schrödinger para un sistema multielectrónico y multiatómico. La forma típica del operador Hamiltoniano considera cinco contribuciones para la energía total del sistema, la energía cinética de los electrones y el núcleo, la atracción de los electrones al núcleo, las repulsiones interelectrónicas y las repulsiones internucleares.

La ecuación 2.41 ha sido resuelta únicamente para un sistema de un núcleo y un electrón, para sistemas más grandes de M núcleos y N electrones es necesario hacer uso de métodos que den soluciones aproximadas a la ecuación de Schrödinger que permitan obtener la energía del sistema bajo estudio. Los métodos de mecánica cuántica abarcan métodos *ab initio*, métodos semiempíricos y los métodos de teoría de funcionales de la densidad (Density Functional Theory, DFT).

Los métodos *ab initio* del latín “desde el principio” son cálculos desarrollados a partir de principios teóricos sin inclusión de datos experimentales, resuelven la

ecuación de Schrödinger para una molécula y proporcionan la energía y la función de onda que es una función matemática utilizada para calcular la distribución de los electrones (y en teoría describir por completo a la molécula). A partir de la distribución electrónica se puede calcular la energía total, geometría molecular, frecuencias vibracionales, espectro, potenciales de ionización, y afinidad electrónica; y propiedades como momento dipolar, y en qué zonas la molécula es más propensa a ser atacada por nucleófilos o electrófilos.

Los métodos semi empíricos o semi experimentales son más rápidos que los métodos *ab initio* porque combinan la química teórica con la experimentación. Esto a pesar de ser una ventaja también representa un inconveniente ya que para realizar los cálculos se requieren parámetros que se obtienen a partir del ajuste de los resultados teóricos al experimento o al resultado de un cálculo *ab initio*. Si el sistema a calcular es similar a los utilizados para parametrizar el método contenidos en la base de datos los resultados serán buenos y confiables; por el contrario si la molécula es diferente a las empleadas por la base de datos los resultados serán muy pobres.

Teoría de funcionales de la densidad (Density Functional Theory, DFT), proviene de la teoría Thomas-Fermi-Dirac propuesta entre 1920 y 1928 en la cual se proponía que la energía de un sistema podía obtenerse como funcional de su densidad electrónica. Esta teoría fue formalizada en 1964 por Hohenberg y Kohn, quienes propusieron dos teoremas que en resumen establecen que el potencial externo de un sistema y el número N de electrones que determinan las propiedades de su estado fundamental están determinados por la densidad electrónica $\rho(x,y,z)$ y que la densidad electrónica del estado basal es aquella que minimiza al funcional de energía. Estos teoremas tienen una aplicación muy útil ya que la función de onda de un sistema de N electrones depende de N variables, mientras que la densidad electrónica solo depende de tres variables lo cual simplifica los cálculos computacionales.^[80]

2.3.2. Estudio de la auto agregación mediante química computacional.

En este trabajo se realizó un análisis teórico de la posible formación de agregados de Casiopeína con el objetivo de completar el análisis experimental.

Se realizó una primera aproximación a los sistemas bajo estudio mediante un método semi empírico (PM6), los resultados arrojados fueron posteriormente recalculados con un método de teoría de funcionales de la densidad (M052X), esto para obtener propiedades estructurales más cercanas a las presentadas por los sistemas analizados experimentalmente. Esta metodología se adoptó con base en estudios teóricos previos realizados para las Casiopeínas.^[18, 19, 82-84]

Mediante ambos métodos se calcularon en primer lugar las estructuras de las Casiopeínas III-Ea y IV-gly. Posteriormente se analizaron las estructuras de los posibles agregados formados, y se obtuvo información acerca de la energía de formación y estructura electrónica de estos. Estos resultados fueron utilizados como complemento de las técnicas experimentales descritas anteriormente.

Capítulo 3. Metodología.

3.1. Método experimental.

3.1.1. Preparación de las disoluciones.

Las Casiopeínas III-Ea y IV-gly fueron sintetizadas y obtenidas con un 99% de pureza de acuerdo al procedimiento reportado en la literatura.^[11, 12]

Las disoluciones para ambas Casiopeínas se prepararon utilizando agua ultrapura tipo I con una resistividad de 18.1 MΩ cm a 25 °C y con contenido de carbono orgánico menor a los 5 µg L⁻¹.

Los rangos de concentración de las disoluciones en agua pura fueron de 0.4 a 20 mmol L⁻¹ para la Casiopeína IV-gly y de 0.98 a 15 mmol L⁻¹ para la Casiopeína III-Ea.

Se prepararon además disoluciones en medio amortiguado, esto con el objetivo de simular un medio fisiológico. Inicialmente se preparó un medio amortiguado de ácido 4-(2-hidroxietil)-1- piperazinetanosulfónico (C₈H₁₈N₂O₄S), conocido como HEPES (Sigma-Aldrich), cuyo peso molecular es 238.30 g mol⁻¹, su rango de pH va de 6.8 a 8.2 y se presenta como un polvo blanco. Este compuesto es un zwitterion orgánico perteneciente a la lista de amortiguadores descritos por el doctor Norman Good, los cuales debido a sus características (valor de pKa entre 6.0 y 8.0, alta solubilidad, efecto limitado en reacciones bioquímicas, muy baja absorbancia en las regiones UV-Visible, estabilidad enzimática e hidrolítica, cambios mínimos debido a temperatura, efectos limitados debido a iones o sales presentes en solución, interacción limitada con cationes minerales y permeabilidad limitada en membranas biológicas) son ideales para la experimentación en biología y bioquímica.^[84] Debido a que la Casiopeína III-Ea presentó problemas de solubilidad en este medio se optó por estudiar esta Casiopeína en otro medio amortiguado. Se preparó entonces una disolución de tris(hidroximetil)aminometano (CH₂OH)₃H₂NC conocido simplemente como TRIS (Sigma-Aldrich). El cual tiene un peso molecular de 121.14 g mol⁻¹, su rango de pH va de 7 a 9, su pKa (25 °C) es de 8.1 y se presenta como un polvo blanco.

El medio amortiguado de HEPES se preparó a una concentración de 0.1 mol L⁻¹ utilizando agua ultrapura tipo I con una resistividad de 18.1 MΩ cm a 25 °C y con contenido de carbono orgánico menor a los 5 µg L⁻¹. A continuación la disolución se llevó a un pH = 7.40 ± 0.01 agregando pastillas de NaOH con una pureza de 99%. Por otro lado la disolución de TRIS se preparó a una concentración de 0.1 mol L⁻¹ utilizando agua tipo I con una resistividad de 18.1 MΩ cm⁻¹ a 25 °C y con contenido de carbono orgánico menor a los 5 µg L⁻¹. Finalmente se ajustó a un valor de pH = 7.40 ± 0.01 agregando gotas de HCl concentrado.

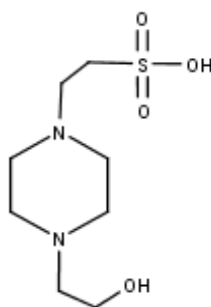


Figura 14. Estructura de (titration) (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico). (HEPES).

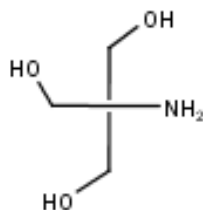


Figura 15. Estructura de tris(hidroximetil)aminometano. (TRIS).

Con el objetivo de fijar la fuerza iónica de las disoluciones amortiguadoras, se añadió gradualmente KCl a estas, de tal forma que su concentración en cada disolución fuera de 0.1 mol L^{-1} .

Para garantizar la ausencia de partículas provenientes de la preparación de los medios amortiguados, éstos fueron filtrados antes de disolver las Casiopeínas. El rango de concentración para las disoluciones amortiguadas fue para la Casiopeína IV-gly de 2 a 20 mmol L^{-1} , y de 1 a 15 mmol L^{-1} para la Casiopeína III-Ea.

3.1.2. Estudio de las disoluciones.

3.1.2.1. Tensión superficial.

El valor de tensión superficial se determinó por triplicado para el agua ultrapura tipo I y para las disoluciones amortiguadas, con la finalidad de obtener un valor de referencia. Posteriormente se determinó por triplicado el valor de tensión superficial para las disoluciones de Casiopeína III-Ea y IV-gly en agua pura y medios amortiguados. A partir de estas determinaciones se obtuvieron valores promedio que se presentan en la sección de resultados. Todas las determinaciones se realizaron a 25 ± 0.1 °C empleando un tensiómetro Krüss K8 (Krüss, Hamburgo, Alemania) el cual está basado en el método del anillo de Du Noüy como fundamento de medición.

3.1.2.2. Conductimetría.

Se determinó por triplicado el valor de la conductividad del agua pura y de los medios amortiguados. Igualmente se obtuvo el valor de la conductividad de las disoluciones de Casiopeína en agua pura y medio amortiguado, a partir de estas mediciones se obtuvieron los valores promedio que se presentan en la sección de resultados. Todas las mediciones se realizaron a 25 ± 0.1 °C mediante un conductímetro PC 2700 (Oakton Instruments, Vernon Hills, E. U. A.) con una constante de celda $k_{\text{celda}} = 1 \text{ cm}^{-1}$, el cual fue calibrado utilizando disoluciones de KCl con conductividad de 1413 μS , 100 μS y 12.9 mS. Las disoluciones fueron agitadas durante las determinaciones y después de cada determinación la celda fue limpiada con agua tipo I y posteriormente enjuagada con una pequeña cantidad de la disolución a medir.

3.1.2.3. Calorimetría de titulación isotérmica.

Los calores de disociación para ambas Casiopeínas se determinaron por triplicado a 25 °C en agua pura y en medios amortiguados. Las mediciones se realizaron mediante un instrumento VP ITC (Microcal, Northampton, EUA).

Las concentraciones de trabajo elegidas fueron 12.9 mmol L⁻¹ para la Casiopeína III-Ea en agua pura y de 10.64 mmol L⁻¹ en medio amortiguado. Mientras que para la Casiopeína IV-gly se eligió 15 mmol L⁻¹ en agua pura y 12.43 mmol L⁻¹ en medio amortiguado.

La jeringa fue llenada con una de las diferentes disoluciones de Casiopeína mencionadas y se realizó la titulación en una celda que contenía únicamente el medio acuoso en el cual había sido disuelta la Casiopeína. Esto con el fin de evitar el desarrollo de un calor adicional debido al desajuste del medio acuoso y el calor de dilución correspondiente.

Tanto las disoluciones de Casiopeína como los diferentes medios acuosos fueron desgasificados en un sonicador durante treinta minutos antes de ser depositadas en la jeringa y en la celda de reacción respectivamente. Se realizaron titulaciones de 5 μ L cada 700 s. Las señales calorimétricas fueron integradas mediante el software Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, E. U. A.) para obtener el calor asociado a cada adición de disolución de Casiopeína.

3.1.2.4. Espectrofotometría UV-Vis.

La determinación de la absorbancia del agua pura y de los medios amortiguados, así como para las disoluciones de Casiopeína en ambos medios se realizó por triplicado empleando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, Australia) a 25 ± 0.1 °C. La muestra a medir fue depositada en una celda de cuarzo que fue limpiada con agua tipo I entre la medición de cada una de las disoluciones y posteriormente enjuagada con una pequeña cantidad de la disolución próxima a medir.

3.1.2.5. Dispersión de luz estática.

La dispersión de luz estática se realizó mediante un equipo Zetasizer μ V (Malvern Instruments, Worcestershire, R. U.) equipado con un láser de 60 mW de He-Ne que emite a una longitud de onda de 830 nm con un ángulo de detección de 90° en una celda de cuarzo equilibrada a una temperatura de 25 ± 0.1 °C durante cinco minutos.

El análisis mediante esta técnica se realizó únicamente para la Casopeína III-Ea disuelta en agua pura. Esto con base en los resultados obtenidos en las técnicas experimentales previas, las disoluciones se estudiaron a concentraciones por arriba de la concentración de agregación crítica. Las muestras fueron filtradas con un filtro de 220 nm de diámetro de poro 48 horas antes de realizar las determinaciones. Para cada concentración se realizaron 10 mediciones con una duración de 30 s cada una, con un total de cinco repeticiones

La viscosidad e índice de refracción para el agua pura fueron de 1.000 cP y 1.330 respectivamente, estos valores fueron provistos por el software Zetasizer V. 7.11,

mismo con el que se realizó el análisis de datos se realizó mediante el software Zetasizer V. 7.11, proporcionado por el fabricante del instrumento

3.2. Método teórico.

Mediante el método semi empírico PM6 contenido en el software Gaussian09^[85], se realizó una optimización en la energía de las estructuras de los monómeros para ambas Casiopeínas tanto en vacío como en medio acuoso. A partir de los resultados de optimización las estructuras fueron recalculadas en vacío y medio acuoso empleando la base 6-311G(d, p) y el funcional híbrido M05-2X contenidos en el mismo software, este funcional permite obtener propiedades estructurales y electrónicas más cercanas a las de los sistemas estudiados experimentalmente.^[86] Tanto el método como la base utilizada se eligieron considerando estudios teóricos previos realizados para algunas Casiopeínas. Para corroborar que los monómeros calculados fueran acertados, las distancias intermoleculares obtenidas para ambas Casiopeínas fueron comparadas con las reportadas por estos estudios.^[18, 81 - 83]

Una vez obtenidos los monómeros de las Casiopeínas se procedió a estudiar la posible auto agregación de cada una. Para realizar este estudio se planteó el agregado más simple que podría formarse, es decir, un dímero. Se propusieron distintos posibles arreglos de los dímeros para las dos Casiopeínas estudiadas y se realizó un cálculo de energía total para los sistemas, primero mediante el método semi empírico PM6 en vacío y medio acuoso. Las estructuras cuyos valores de energía total fueron mínimos se consideraron estables y se recalcularon utilizando el método M052X y la base 6-311G(d,p) en los medios ya mencionados.

Capítulo 4. Resultados y discusión.

4.1. Resultados experimentales.

4.1.1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)H₂O]NO₃ (Casiopeína III-Ea).

4.1.1.1. Conductimetría

Los resultados del estudio de la conductividad en función de la concentración de Casiopeína III-Ea a 25 ± 0.1 °C en agua pura y medio amortiguado (0.1 mol L⁻¹ Tris- HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4 \pm 0.01) se muestran en las figuras 16 y 17.

En la figura 16 se observa que en agua pura la conductividad aumenta de manera lineal con la concentración, esta conducta corresponde al de un electrolito en solución. Se observa que la pendiente del gráfico cambia en el rango de concentración de 7.8 a 8.88 mmol L⁻¹, lo que ocasiona que el comportamiento de la conductividad sea descrito por hgdos regiones. La primera corresponde al rango de concentración de 0.98 a 7.8 mmol L⁻¹ y es descrita por la ecuación $\kappa = 118.78[\text{Casiopeína III} - \text{Ea}] - 24.45$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.994$. La segunda región corresponde al rango de concentración de 8.88 a 12.90 mmol L⁻¹ y está definida por la ecuación $\kappa = 60.21[\text{Casiopeína III} - \text{Ea}] + 393.87$, con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.943$.

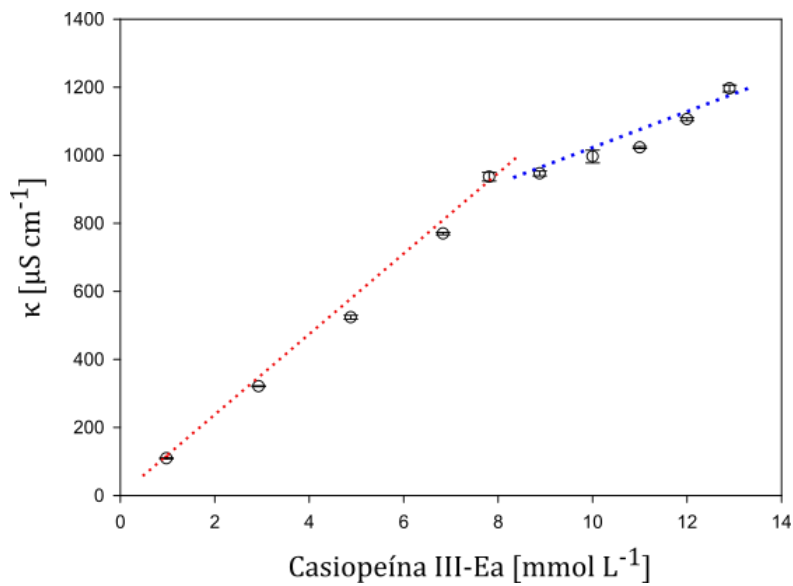


Figura 16. Conductividad en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura a 25 ± 0.1 °C.

El cambio en el gráfico puede explicarse considerando que ninguna reacción química ha sido favorecida en este proceso y que como se mencionó en la sección 2.2.2.2 cuando ocurre un proceso de auto asociación la conductividad del agregado formado presentará un comportamiento distinto a la del monómero precursor. Dadas estas condiciones el cambio en la tendencia del gráfico en la figura 16 solo puede ser relacionado con un proceso de auto agregación.

Por otro lado, en medio amortiguado se aprecia que la conductividad aumenta también de forma lineal con la concentración de Casiopeína como sucede con electrolitos convencionales. Sin embargo, en este gráfico no es claro un cambio trascendental en la pendiente de la recta, lo que significa que en este medio la técnica de conductimetría no ha sido sensible al proceso de auto asociación.

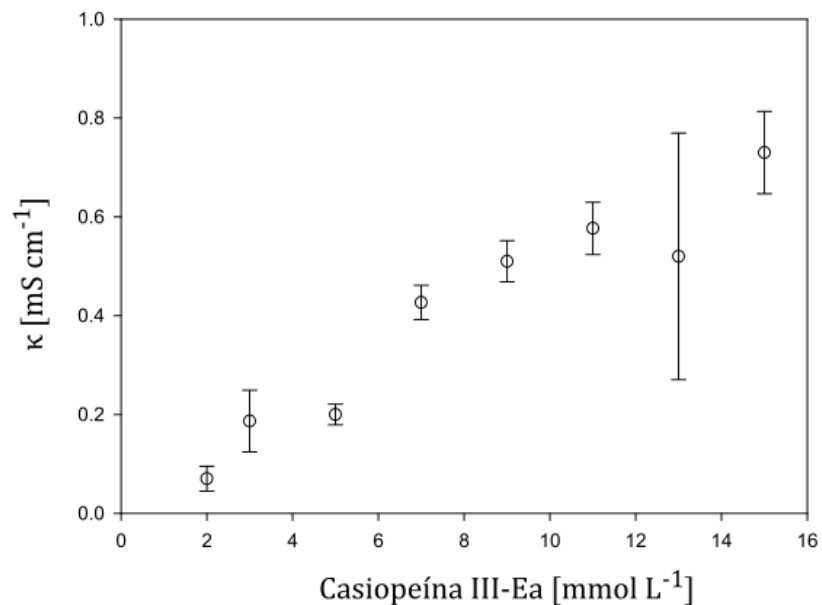


Figura 17. Conductividad en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

4.1.1.2. Calorimetría de titulación isotérmica.

Las isotermas resultantes del estudio por calorimetría de la Casiopeína III-Ea a 25 °C en agua pura y medio amortiguado (0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4) se muestran en las figuras 18 y 19 respectivamente.

Se observa para ambos casos que cuando se realiza la primera inyección al inicio del experimento el valor de la potencia aplicada por el equipo es mucho mayor que la potencia aplicada al final del experimento. Esto se debe a que al inicio del experimento, cuando comienza a adicionarse la disolución concentrada de Casiopeína en la celda de reacción se favorece un proceso de disociación y la energía asociada a este proceso provoca una diferencia de temperatura entre las celdas que deberá ser compensado con una potencia proporcional aplicada por el equipo.

A medida que avanza el experimento, el aumento de la concentración de Casiopeína en la celda de reacción ocasiona que gradualmente el proceso de disociación sea desfavorecido y comience a promoverse un proceso de asociación, al mismo tiempo la diferencia de temperatura entre las celdas por efecto del proceso de disociación disminuye y por consiguiente también lo hace la potencia aplicada por el equipo, lo cual se ve reflejado en la disminución paulatina del tamaño de las barras hasta ser prácticamente constante.

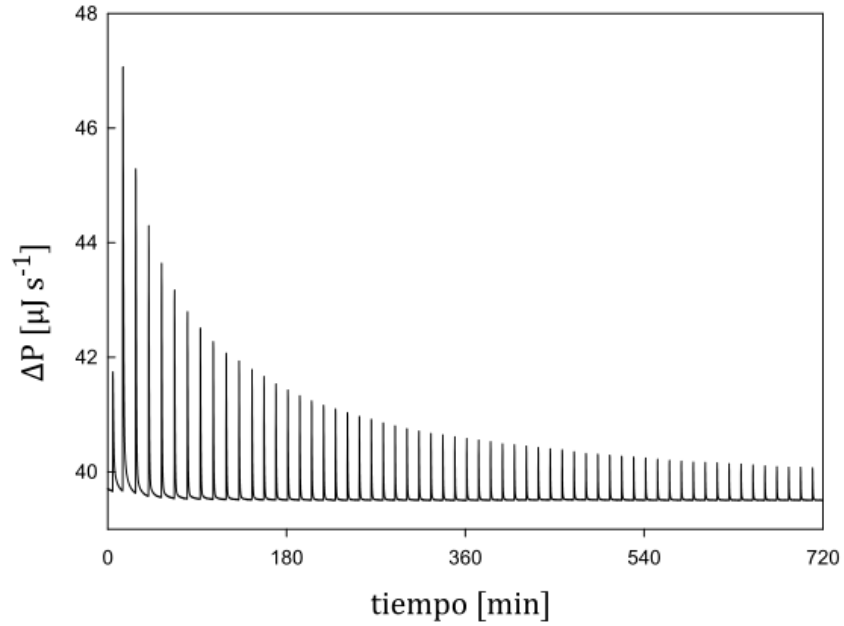


Figura 18. Resultado experimental del estudio por calorimetría de titulación isotérmica para la Casiopeína III-Ea disuelta en agua pura a 12.9 mmol L^{-1} y titulada en el mismo medio a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

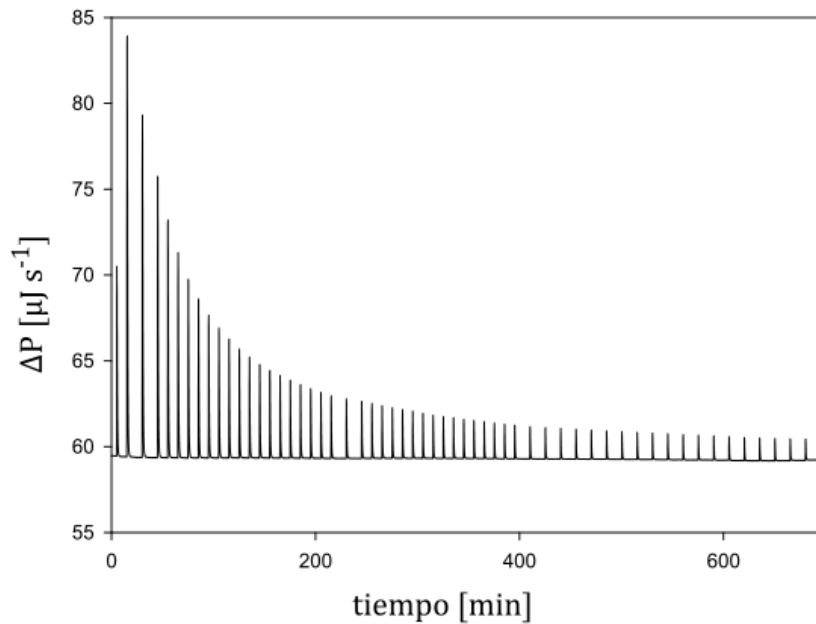


Figura 19. Resultado experimental del estudio por calorimetría de titulación isotérmica para la Casiopeína III-Ea disuelta en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4$, a $10.64 \text{ mmol L}^{-1}$ y titulada en el mismo medio a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

En las figuras 20 y 21 se presentan los gráficos de la entalpía del proceso de disociación en función de la concentración de Casiopeína en la celda de reacción en agua pura y medio amortiguado. En ambos gráficos los círculos representan los datos experimentales. Estos datos se analizaron mediante un logaritmo no lineal de mínimos cuadrados iterativo en el cual se propuso el modelo de disociación presentado en la ecuación 2.32 para dímeros, siendo los parámetros de ajuste K_D , ΔH_D y el número de agregación n . Este análisis permitió obtener los valores teóricos que corresponden a la entalpía del proceso de disociación, que se presentan en los gráficos como una línea continua. Se observa que la tendencia de la curva teórica coincide con la experimental, lo cual indica que el modelo teórico utilizado es apropiado, con valores de χ^2 (ji-cuadrado) de 0.520 para agua pura y 0.0114 para medio amortiguado. Los valores resultantes para K_D y ΔH_D a partir de los cuales se calcularon ΔG_D y ΔS_D , de acuerdo a las ecuaciones 2.25 y 2.26, así como número de agregación n se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir del ajuste de los datos calor de dilución como función de la concentración para la Casiopeína III-Ea a 25 °C.

Casiopeína III-Ea.		
Parámetro termodinámico.	Agua pura.	Medio amortiguado (0.1 mol L ⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L ⁻¹ KCl, pH=7.4 ± 0.01).
n	2	2
K_D	7.686×10^{-5}	1.091×10^{-4}
ΔH_D [kJ mol ⁻¹]	34.36	106.507
ΔG_D [kJ mol ⁻¹]	23.47	22.60
ΔS_D [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	37.88	281.55

En los gráficos de las figuras 20 y 21 se observa que a medida que la concentración de Casiopeína en la celda de reacción aumenta, el valor de la entalpía del proceso de disociación disminuye hasta mantenerse constante, este descenso proporciona una evidencia de que ha ocurrido un proceso de disociación. Es notable que con las primeras inyecciones de Casiopeína en la

celda el valor de la entalpía del proceso de disociación es ligeramente mayor para el medio amortiguado, esto puede explicarse si se considera que hay dos tipos de interacciones presentes, Casiopeína-Casiopeína y Casiopeína-disolvente. Un mayor valor de entalpía de disociación para Tris implica que en este medio se favorece que la interacción Casiopeína-Casiopeína por encima de la interacción Casiopeína-disolvente, por lo cual se requiere más energía para disociar el agregado.

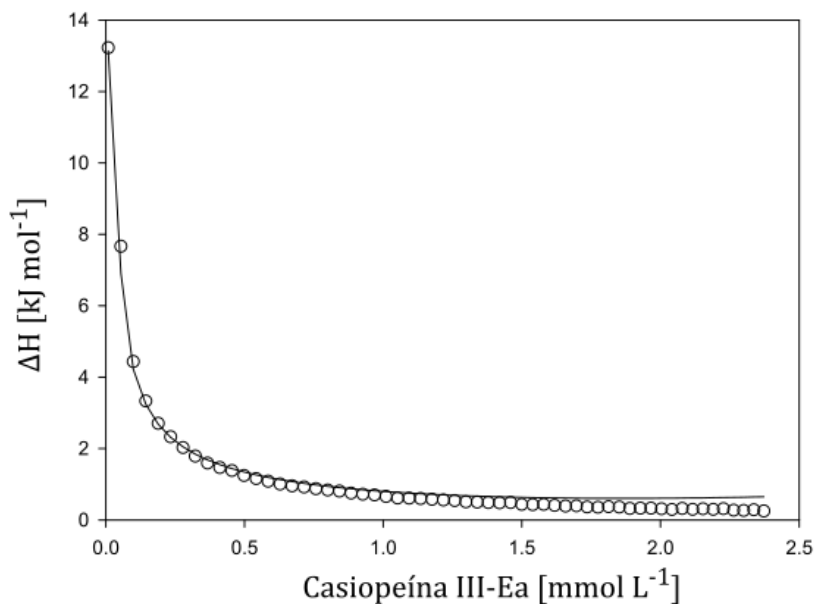


Figura 20. Calor de dilución en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura a 25 °C.

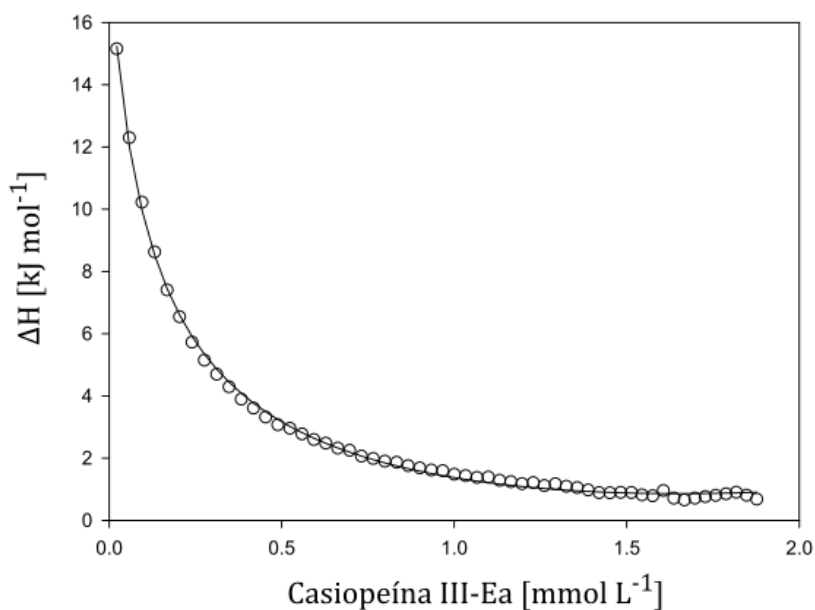


Figura 21. Calor de dilución en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 °C.

4.1.1.3. Tensión superficial.

La figuras 22 y 23 muestran los perfiles de la tensión superficial como función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura y medio amortiguado (0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4 \pm 0.01$) respectivamente a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

En la figura 22 se observa que la tensión superficial del agua pura disminuyó de 72 a 54.5 mN m^{-1} al disolver la Casiopeína en ella; lo que indica que esta Casiopeína posee actividad superficial. A partir del perfil de la curva es posible considerar que esta actividad corresponde a la que presenta un tensoactivo tipo III (figura 7).

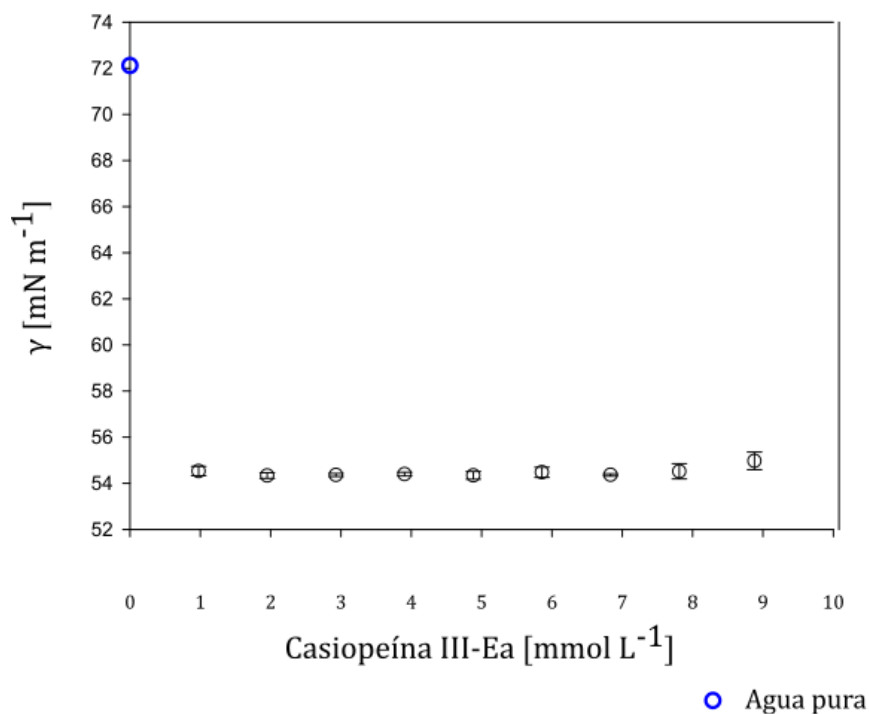


Figura 22. Tensión superficial en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

En la figura 23 se aprecia que la tensión superficial del medio amortiguado disminuye de 64.8 a 52.3 mN m^{-1} al agregar Casiopeína, lo que apunta a que en este medio la Casiopeína también posee actividad superficial. El resultado obtenido para Tris es interesante porque la tensión superficial del medio cae notablemente al comenzar a agregar la Casiopeína con el comportamiento de un tensoactivo tipo II, pero al aumentar la concentración del soluto la tensión superficial aumenta gradualmente adquiriendo el comportamiento de un tensoactivo tipo I. Este comportamiento puede explicarse si se considera la

interacción entre las moléculas de Casiopeína y del disolvente, cuando la concentración de Casiopeína en la disolución es baja su movilidad es mayor ya que hay suficiente espacio para que fácilmente migre del seno de la disolución a la interfase, lo que afecta la tensión superficial del disolvente; ahora bien la movilidad de la Casiopeína comienza a disminuir a medida que la concentración de la misma en la disolución aumenta ya que hay menos espacio para que la Casiopeína migre de seno de la disolución a la interfase, lo cual ocasiona un incremento gradual en la tensión superficial de la disolución.

Es importante señalar que esta Casiopeína tiene una actividad distinta en cada medio, al disminuir la tensión superficial en 17.5 unidades en agua pura y en 12.5 unidades en medio amortiguado; además de esto, los perfiles de los gráficos para ambos medios son diferentes. Las propiedades anteriores indican que el medio tiene una relación directa con la movilidad de la Casiopeína III-Ea, y por consiguiente con su comportamiento. El agua es una molécula pequeña, lo cual permite que la Casiopeína se mueva con mayor facilidad del seno de la solución a la superficie lo que provocará una caída evidente en el valor de la tensión superficial del agua pura. Por otro lado la molécula de Tris al ser más voluminosa limita el movimiento de la Casiopeína, por lo cual la caída del valor de tensión superficial es menor que para el agua pura.

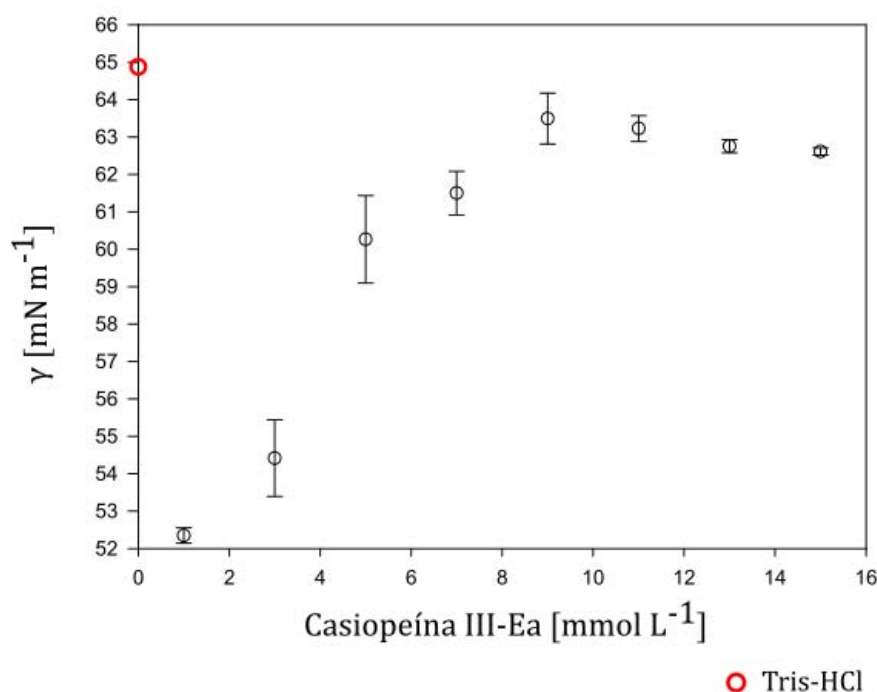


Figura 23. Tensión superficial en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

4.1.1.4. Absorbancia.

El espectro de absorción ultravioleta y visible se obtuvo para ambos medios con el objetivo de determinar la mejor longitud de onda para estudiar la variación de la absorbancia con la concentración de Casiopeína, los espectros resultantes se muestran en las figuras 24 y 25. La longitud de onda obtenida para el agua pura fue de 593 nm, mientras que para el medio amortiguado (0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4) fue de 600 nm.

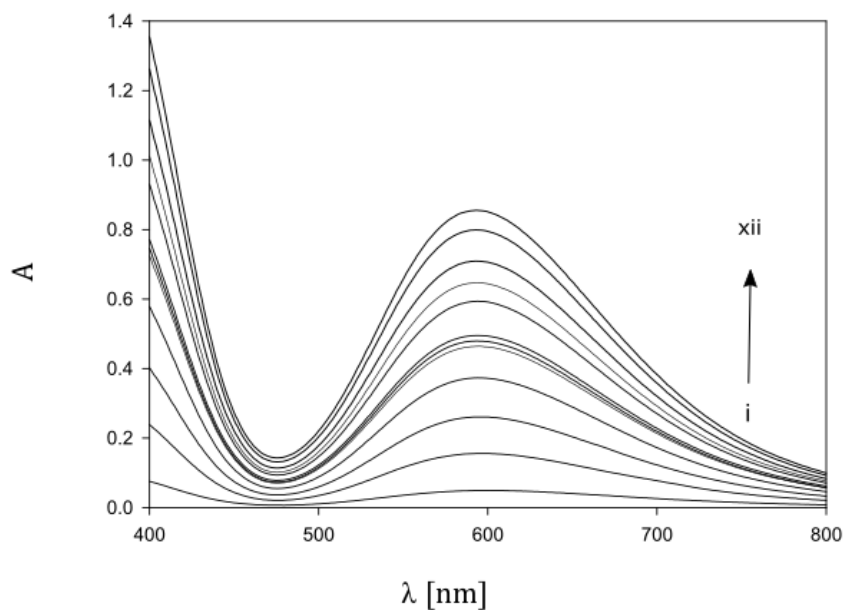


Figura 24. Espectro de absorción de ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína III-Ea en agua pura a 25 ± 0.1 °C. [i) 0.98, ii) 2.93, iii) 4.88, iv) 6.83, v) 7.81, vi) 8.88, vii) 10, viii) 11, ix) 12, x) 13, xi) 14, xii) 15 mmol L⁻¹].

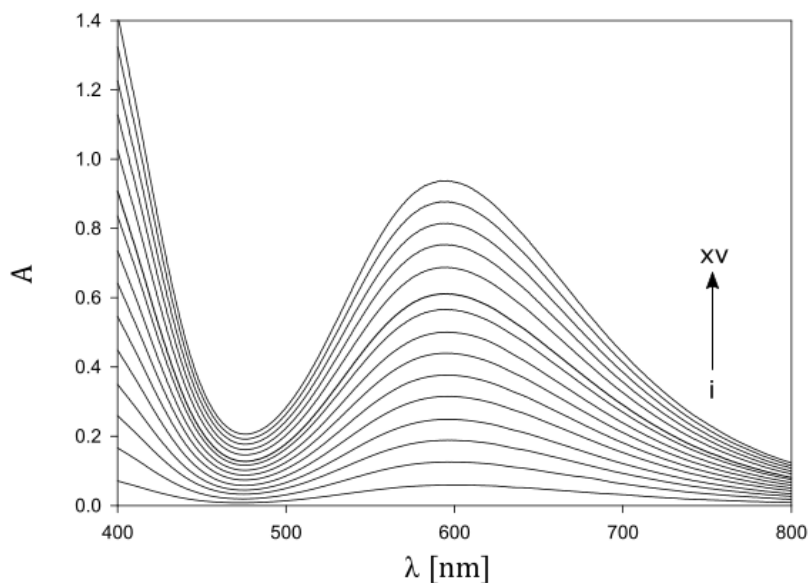


Figura 25. Espectro de absorbancia de ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína III-Ea en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4$, a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. [i) 1, ii) 2, iii) 3, iv) 4, v) 5, vi) 6, vii) 7, viii) 8, ix) 9, x) 10, xi) 11, xii) 12, xiii) 13, xiv) 14, xv) 15 mmol L^{-1}].

Una vez determinados los valores máximos de longitud de onda para ambos medios se estudió el comportamiento de la absorbancia a estas longitudes de onda como función de la concentración de Casiopeína, los perfiles se muestran en las figuras 26 y 27.

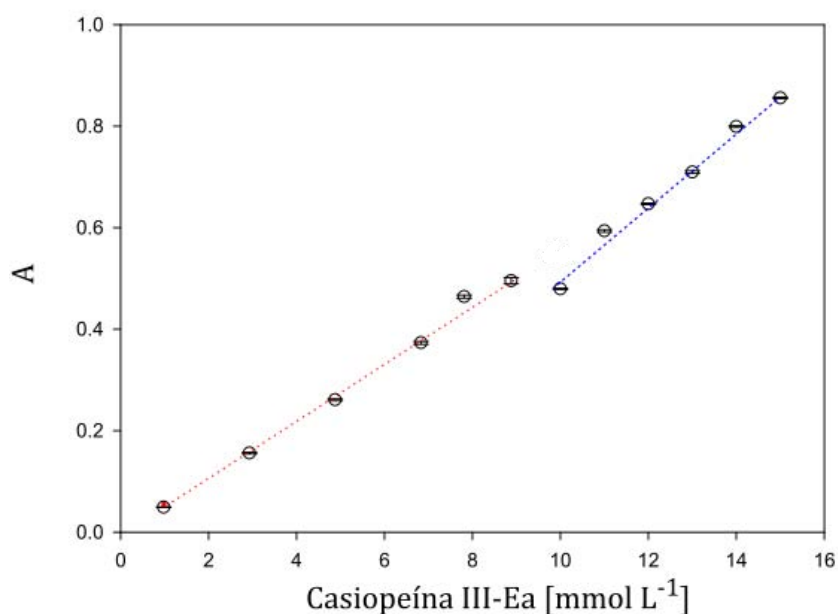


Figura 26. Absorbancia, 593 nm en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

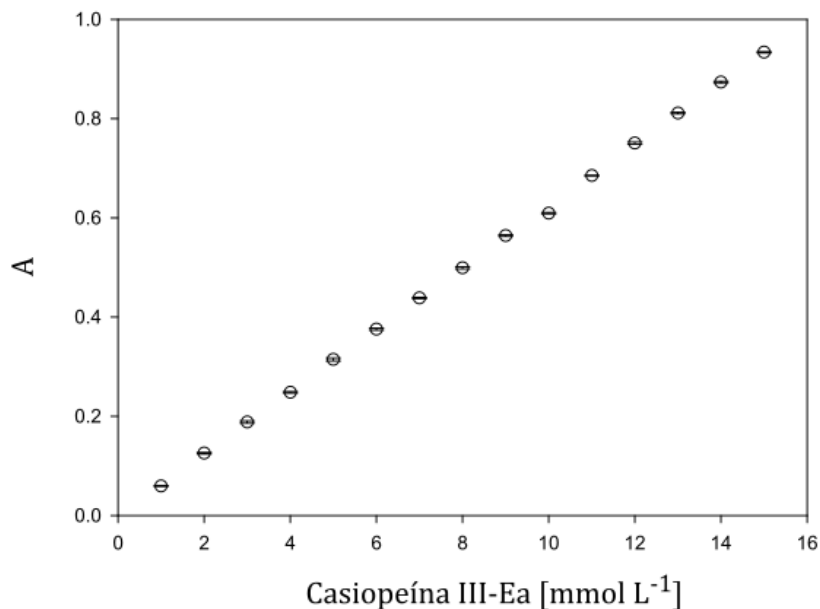


Figura 27. Absorbancia, 600 nm en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

En la figura 26 se aprecia un cambio en la tendencia del gráfico en el rango de concentración de Casiopeína de 8.8 a 10 mmol L⁻¹. Este cambio permite diferenciar dos regiones, la primera es descrita por la ecuación $A = 0.0581[\text{Casiopeína III} - \text{Ea}] - 0.0131$ y un coeficiente de correlación $r^2 = 0.995$, y representa la absorbancia antes de que comience el proceso de auto asociación. Puesto que el ancho de la celda utilizada es de 1 cm, el valor del coeficiente de absortividad molar que corresponde a esta región es designado por la pendiente de la recta, es decir $\epsilon_{593} = 58.1 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La segunda región representa la absorbancia de la muestra una vez iniciado el proceso de auto asociación, es descrita por la ecuación $A = 0.0731[\text{Casiopeína III} - \text{Ea}] - 0.234$ y un coeficiente de correlación $r^2 = 0.988$. El valor del coeficiente de absortividad molar es $\epsilon_{593} = 73.1 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Al no haberse observado turbidez en las disoluciones estudiadas, el cambio en el gráfico solo puede atribuirse a un proceso de auto asociación y a los efectos sobre la constante dieléctrica efectiva de los agregados formados que modifican los estados excitados de las moléculas.

En la figura 27 se aprecia que la absorbancia mantiene un incremento proporcional al aumento de concentración del monómero de Casiopeína en la disolución, el hecho de que la tendencia de este gráfico no presenta cambios

sugiere que mediante esta técnica no se ha detectado un proceso de auto asociación en este medio. Este gráfico está descrito por la ecuación $A = 0.0623[\text{Casiopeína III} - E_a] + 0.0004$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.999$. En este caso el valor del coeficiente de absorptividad molar es de $\epsilon_{600.4} = 62.3 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.1.1.5. Dispersión de la luz estática.

La figura 28 muestra el gráfico de la intensidad de la luz dispersada en función de la concentración de Casiopeína. Es evidente que la intensidad de la luz dispersada aumenta proporcionalmente con la concentración de Casiopeína. Esto puede explicarse considerando lo establecido en la ecuación de Rayleigh (ecuación 2.36) entre mayor sea el tamaño de la partícula bajo estudio mayor será la intensidad de la luz dispersada por ésta. Cuando la concentración de Casiopeína es pequeña, las moléculas se encuentran dispersas en el disolvente y con facilidad de movimiento, por lo que la intensidad de la luz que dispersan es pequeña. A medida que la concentración de Casiopeína aumenta se produce una saturación de ésta en la disolución lo que da inicio al proceso de auto asociación, los agregados formados son especies con mayor tamaño por lo cual dispersarán la luz incidente con mayor intensidad. Este cambio se observa a una concentración de Casiopeína de 11 mmol L^{-1} .

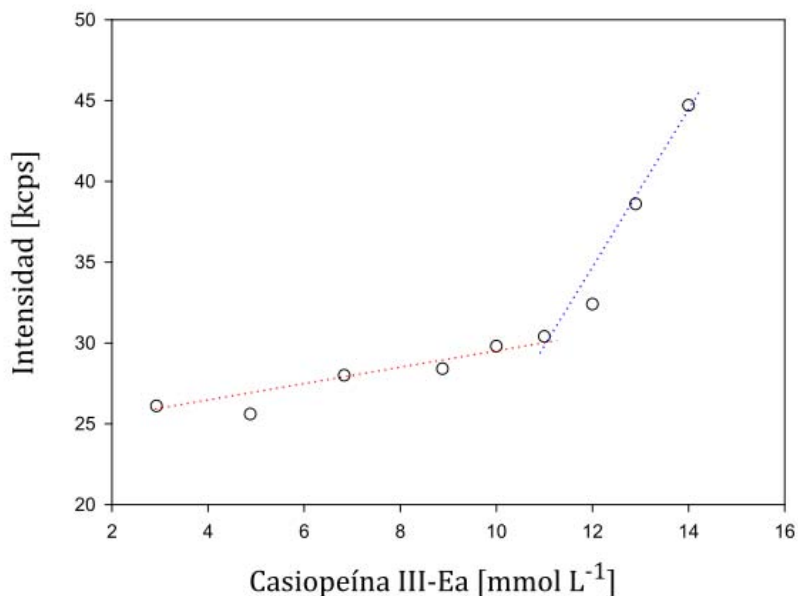


Figura 28. Intensidad de la luz dispersada en función de la concentración de Casiopeína III-Ea en agua pura a 25 ± 0.1 °C.

A partir de las determinaciones experimentales y la aplicación de la ecuación de Rayleigh que proporciona la intensidad de la luz dispersada en función de la concentración de Casiopeína en g L^{-1} , se obtuvo el gráfico de Debye que se presenta en la figura 29.

Este gráfico es descrito por la línea recta $K [\text{Casiopeína III} - \text{Ea}]/R_{\theta} = -0.0001[\text{Casiopeína III} - \text{Ea}] + 0.0011$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.96$. La línea punteada corresponde a la curva obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Rayleigh (ecuación 2.36).

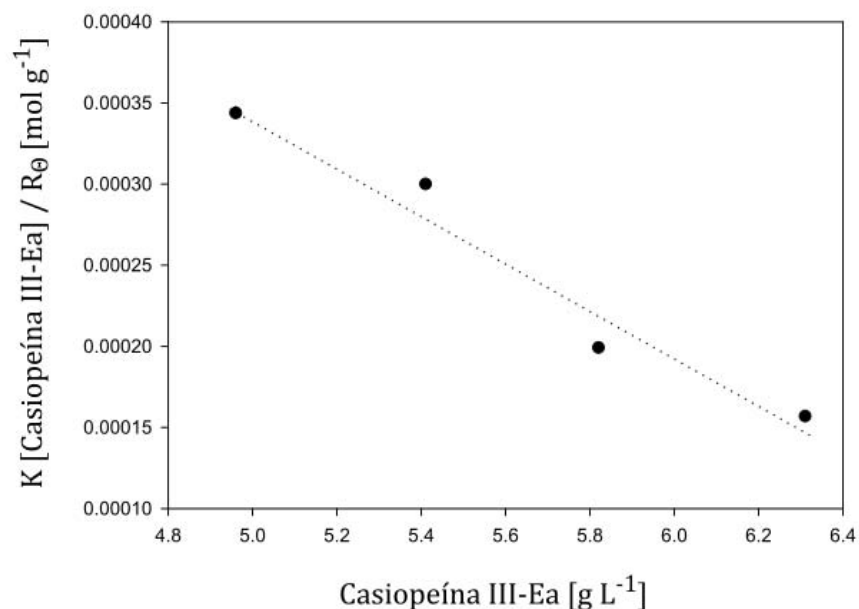


Figura 29. Gráfico de Debye para la Casiopeína III-Ea en agua pura a 25 ± 0.1 °C.

El valor de la intersección cuando el valor de la concentración de Casiopeína es cero es de 0.0011, a partir del inverso de esta cantidad se obtuvo que el peso molecular de la especie estudiada, es decir del agregado, es de $926.4661 \text{ g mol}^{-1}$. Este valor dividido entre $450.92 \text{ g mol}^{-1}$ que es el peso molecular de una sola molécula de Casiopeína III-Ea arroja el valor de 2.0546 el cual corresponde al número de monómeros que conforman el agregado.

La tabla 4 muestra una comparación de la concentración de agregación crítica para esta Casiopeína únicamente en agua pura mediante las técnicas por las que pudo determinarse este valor.

Tabla 4. Concentración de agregación crítica de la Casiopeína III-Ea en agua pura a 25°C .

Casiopeína III-Ea en agua pura a 25°C .	
Técnica	CAC [mmol L ⁻¹]
Conductimetría	8.8
Espectrofotometría	8-10
Dispersión de la luz	11

Como se explicó en la sección 2.1, el proceso de auto asociación de una molécula anfifílica se da paulatinamente durante un rango de concentración, por lo tanto es común encontrar que los valores para la CAC varíen un poco de acuerdo a la técnica utilizada para su determinación. Los resultados expuestos en la tabla 4 indican que el rango de concentración en el cual se da el proceso de auto asociación para esta Casiopeína está entre 8 y 11 mmol L⁻¹.

4.1.2. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H₂O]NO₃ (Casiopeína IV-gly).

4.1.2.1. Conductimetría.

Los gráficos de las figuras 30 y 31 muestran el comportamiento de la conductividad de las disoluciones en agua pura y medio amortiguado (0.1 mol L⁻¹ HEPES, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4 ± 0.01) en función de la concentración de Casiopeína IV-gly a 25 ± 0.1 °C.

En la figura 30 se observa que la conductividad de la Casiopeína disuelta en agua pura presenta un incremento proporcional a la concentración de Casiopeína en ella. Este comportamiento es el esperado para un electrolito en disolución y es descrito por la ecuación $\kappa = 89.23[\text{Casiopeína IV - gly}] - 20.467$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.998$. El incremento sin cambio de la conductividad indica que durante el experimento se ha determinado la conductividad de la misma especie, lo que sugiere que la auto asociación de esta Casiopeína en agua pura no se ha detectado mediante esta técnica

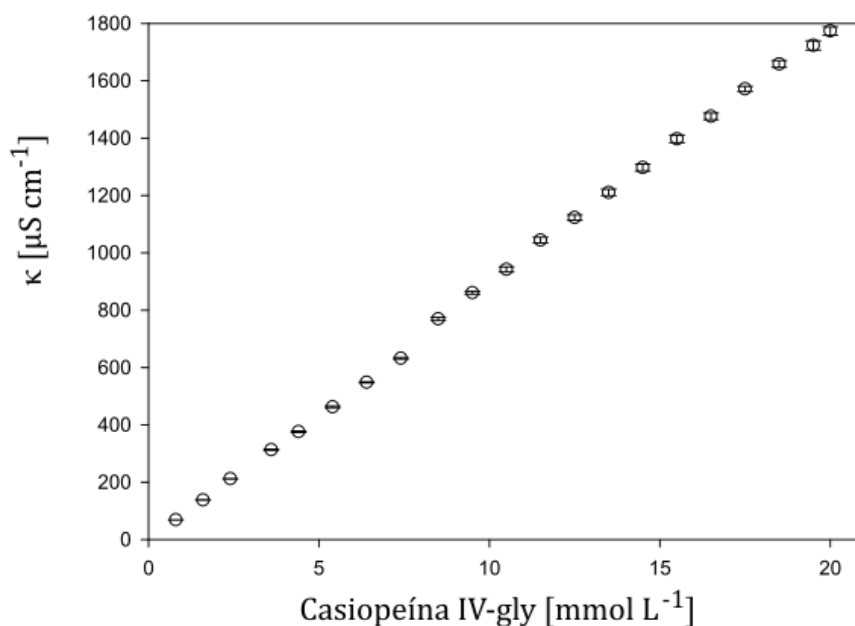


Figura 30. Conductividad en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en agua pura a 25 ± 0.1 °C.

En la figura 31 se aprecia que el comportamiento de la conductividad de la disolución en medio amortiguado presenta un incremento proporcional respecto a la concentración de Casiopeína. Este resultado apunta a que durante todo el

experimento se ha registrado el valor de conductividad de una misma especie electrolítica presente en la disolución que es el monómero.

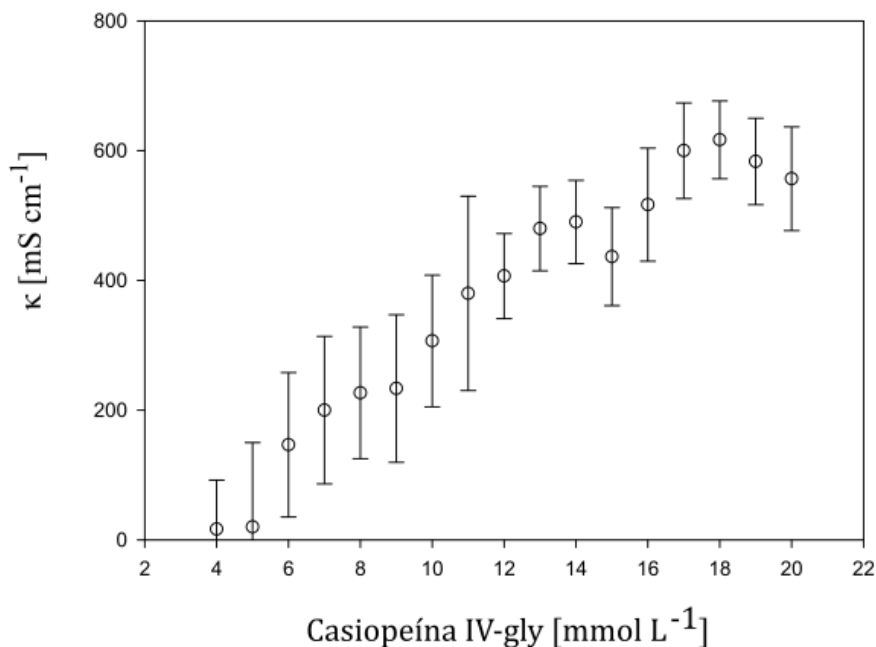


Figura 31. Conductividad en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ HEPES, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

4.1.2.2. Calorimetría de titulación isotérmica.

Las isothermas resultantes del estudio de la Casiopeína IV-gly en agua pura y medio amortiguado (0.1 mol L⁻¹ HEPES, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4 ± 0.01) se muestran en las figuras 32 y 33.

En las dos isothermas se observa que al inicio del experimento se registra un mayor valor de potencia debido a que en la celda se genera un proceso de disociación acompañado por un cambio de temperatura. Al avanzar el experimento la concentración de Casiopeína en la celda aumenta, como consecuencia el equilibrio del proceso tiende hacia la auto asociación y el potencial que debe ser aplicado para compensar la diferencia de temperatura entre las celdas disminuye paulatinamente hasta ser casi constante.

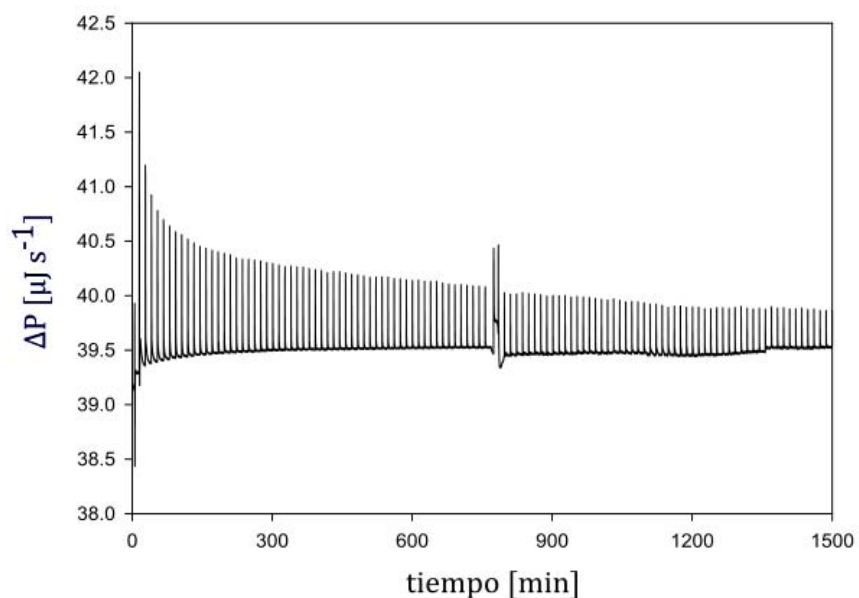


Figura 32. Resultado experimental del estudio por calorimetría de titulación isotérmica para la Casiopeína IV-gly disuelta en agua pura a 15 mmol L^{-1} y titulada en agua en el mismo medio a 25 C .

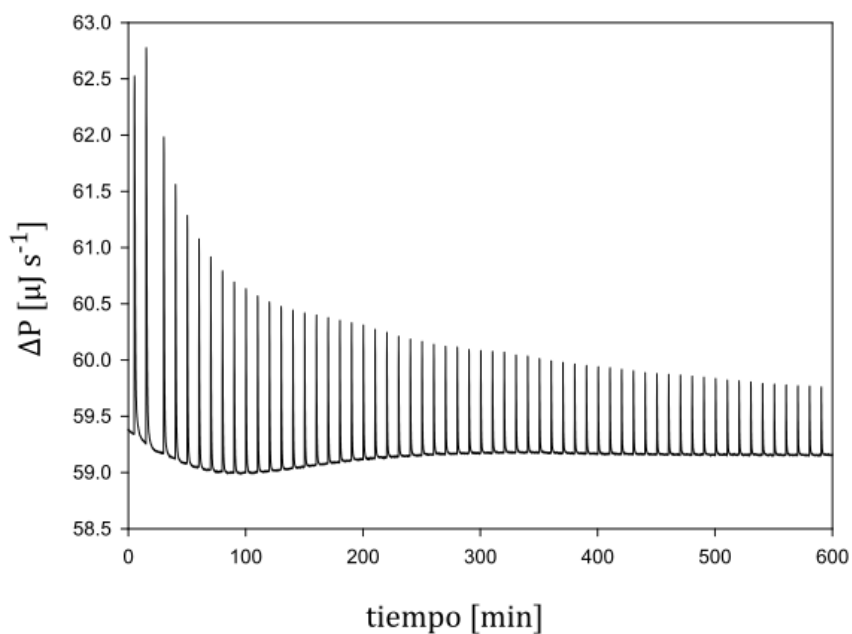


Figura 33. Resultado experimental del estudio por calorimetría de titulación isotérmica para la Casiopeína IV-gly disuelta en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} HEPES, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4$ a $10.64 \text{ mmol L}^{-1}$ y titulada en el mismo medio a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las figuras 34 y 35 presentan la entalpía del proceso de disociación en función de la concentración de Casiopeína en la celda de reacción en agua pura y medio amortiguado. Los círculos representan los datos experimentales y la línea recta los resultados obtenidos a partir de una optimización en los valores de K_D , ΔH_D y la estequiometría del equilibrio de formación de agregados mediante la ecuación 2.32.

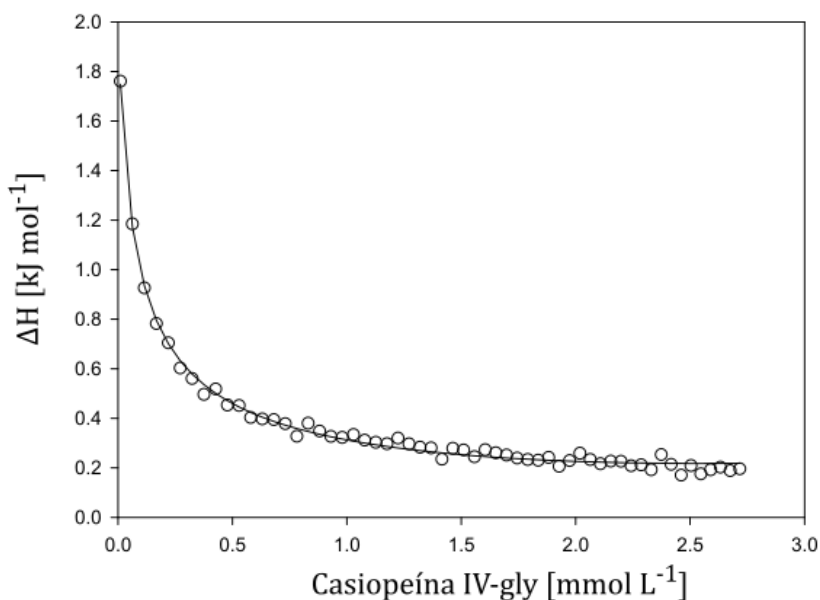


Figura 34. Calor de dilución en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en agua pura a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

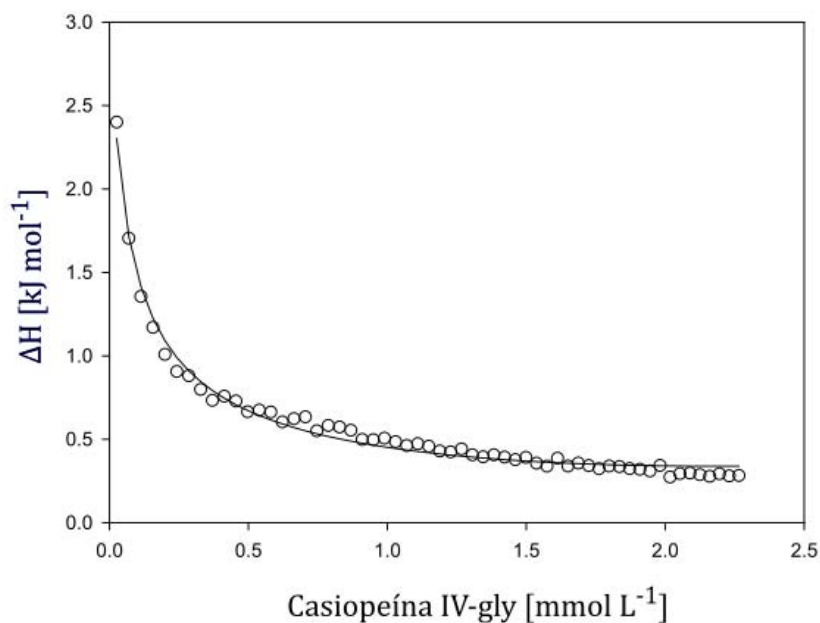


Figura 35. Calor de dilución en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} HEPES, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

La entalpía del proceso en ambos medios desciende gradualmente al aumentar la concentración de Casiopeína en la celda hasta llegar a un valor constante. Este comportamiento indica que al inicio del experimento con las primeras inyecciones se produce un proceso de disociación, pero al aumentar la cantidad de Casiopeína se da paso a un proceso de asociación.

Es importante destacar que en este caso los valores de entalpía del proceso de disociación son mayores para el medio amortiguado lo cual significa que como sucedió con la Casiopeína III-Ea, se requiere más energía en este medio para separar el agregado ya que la interacción Casiopeína-Casiopeína es mayor que la interacción Casiopeína-HEPES.

En los dos gráficos los círculos representan los datos experimentales, estos datos también fueron analizados a través de un logaritmo no lineal de mínimos cuadrados iterativo mediante el modelo de disociación de la ecuación 2.32 propuesto para dímeros, los valores teóricos para la entalpía del proceso de disociación se presentan como una línea continua en los gráficos. En estos gráficos se observa que los valores teóricos presentan buena concordancia con los resultados experimentales, los valores de χ^2 (ji-cuadrado) para agua pura y medio amortiguado son 3.69×10^{-4} y 1.38×10^{-3} respectivamente. A partir del ajuste realizado, se obtuvieron los valores de ΔG_D y ΔS_D de acuerdo a las ecuaciones 2.25 y 2.26, así como número de agregación n . Los parámetros termodinámicos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir del ajuste de los datos calor de dilución como función de la concentración para la Casiopeína IV-gly a 25 °C.

Casiopeína IV-gly.		
Parámetro termodinámico.	Agua pura.	Medio amortiguado (0.1 mol L ⁻¹ HEPES, 0.1 mol L ⁻¹ KCl, pH=7.4 ± 0.01).
n	2	2
K_D	1.28×10^{-4}	1.29×10^{-4}
ΔH_D [kJ mol ⁻¹]	6.549	9.83
ΔG_D [kJ mol ⁻¹]	22.20	22.18
ΔS_D [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	-52.54	-41.44

Se observa que los valores de ΔS_D son negativos, esto como resultado de que el valor de ΔH_D obtenido es muy pequeño, lo cual como se mencionó anteriormente implica que el proceso de auto asociación para esta Casiopeína es poco energético.

4.1.2.3. Tensión superficial.

Los gráficos de las figuras 36 y 37 muestran el comportamiento de la tensión superficial en función de la concentración de Casiopeína en agua pura y medio amortiguado a 25 ± 0.1 °C.

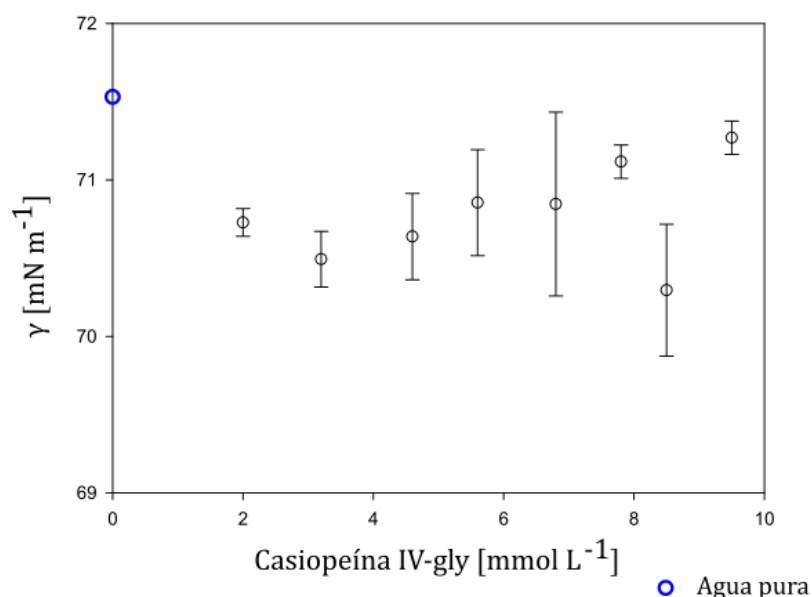


Figura 36. Tensión superficial en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en agua pura a 25 ± 0.1 °C.

En la figura 36 se observa que el valor de la tensión superficial del agua pura disminuye de 72 a 70.7 mN m^{-1} al añadir Casiopeína, mientras que en medio amortiguado disminuye de 72.4 a 65.8 mN m^{-1} . La caída en el valor de tensión superficial permite afirmar que la Casiopeína IV-gly posee actividad superficial en los medios estudiados, sin embargo la diferencia en la disminución del valor de tensión superficial en cada medio indica que la actividad de la Casiopeína IV-gly varía según el medio en el que sea disuelta.

Es importante resaltar que comparada con la Casiopeína III-Ea, la actividad superficial de la Casiopeína IV-gly en ambos medios es pequeña.

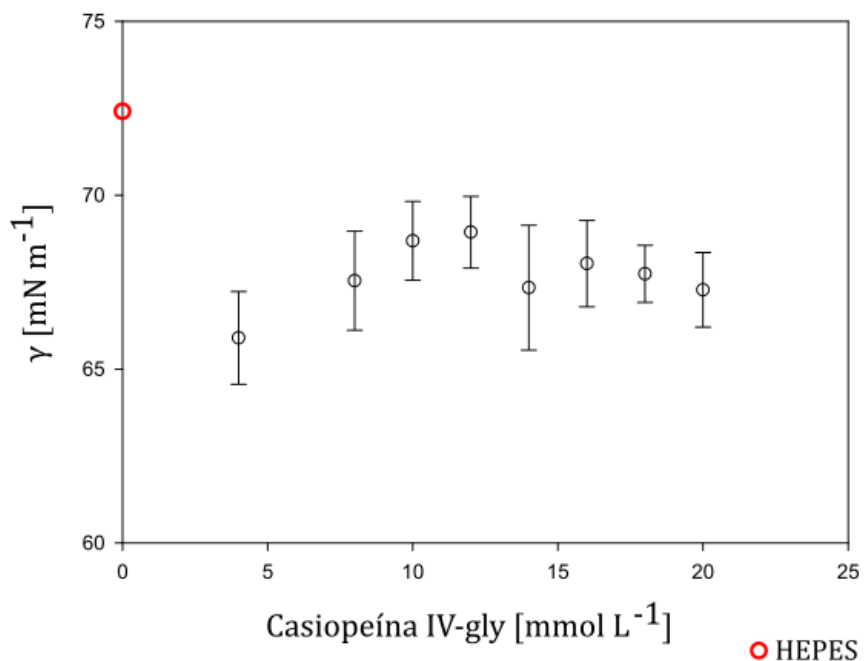


Figura 37. Tensión superficial en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en medio amortiguado 0.1 mol L⁻¹ HEPES, 0.1 mol L⁻¹ KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

4.1.2.4. Absorbancia.

De la misma forma que se realizó para la Casiopeína III-Ea, se determinó el espectro de absorción ultravioleta y visible para ambos medios para determinar la mejor longitud de onda para el estudio. Los resultados fueron 606 nm para agua pura y 605 para el medio amortiguado y se muestran en las figuras 38 y 39.

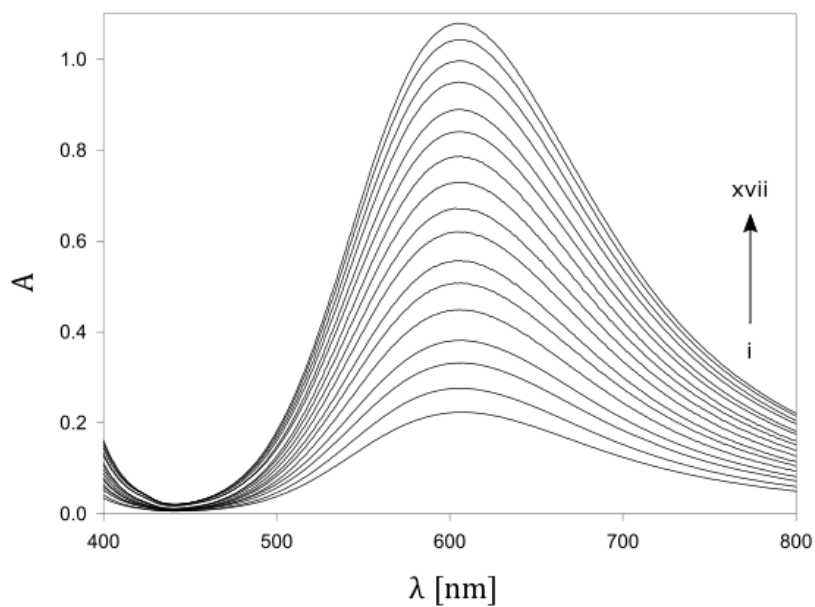


Figura 38. Espectro de absorbancia ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína IV-gly en agua pura a 25 ± 0.1 °C. [i) 4.2, ii) 5.2, iii) 6.2, iv) 7.2, v) 8.5, vi) 9.5, vii) 10.5, viii) 11.5, ix) 12.5, x) 13.5, xi) 14.5, xii) 15.5, xiii) 16.5, xiv) 17.5, xv) 18.5, xvi) 19.5, xvii) 20 mmol L^{-1}].

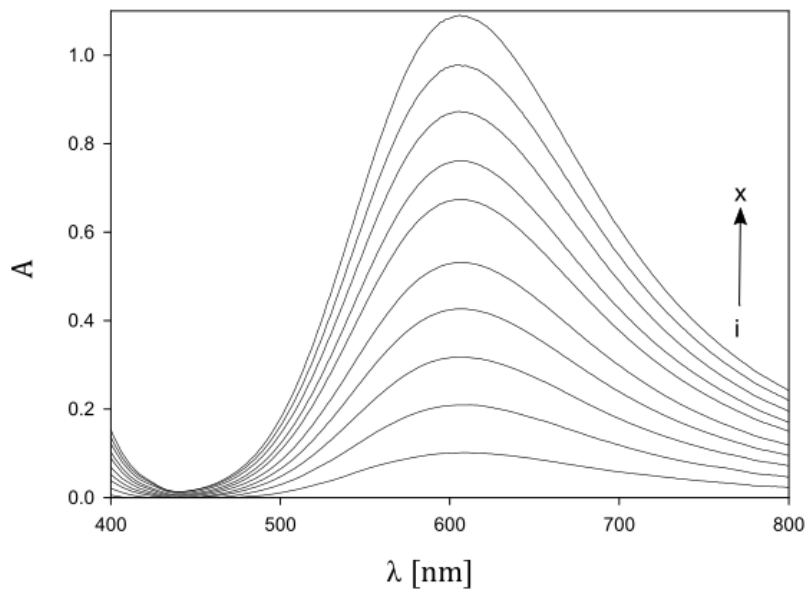


Figura 39. Espectro de absorbancia de ultravioleta y visible a distintas concentraciones de Casiopeína IV-gly en medio 0.1 mol L^{-1} HEPES, 0.1 mol L^{-1} KCl, $\text{pH}=7.4$, a 25 ± 0.1 °C. [i) 2, ii) 4, iii) 6, iv) 8, v) 10, vi) 12, vii) 14, viii) 16, ix) 18, x) 20 mmol L^{-1}].

Una vez establecidas las longitudes de onda para ambos medios se determinó el comportamiento de la absorbancia en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en estos los resultados se presentan en las figuras 40 y 41.

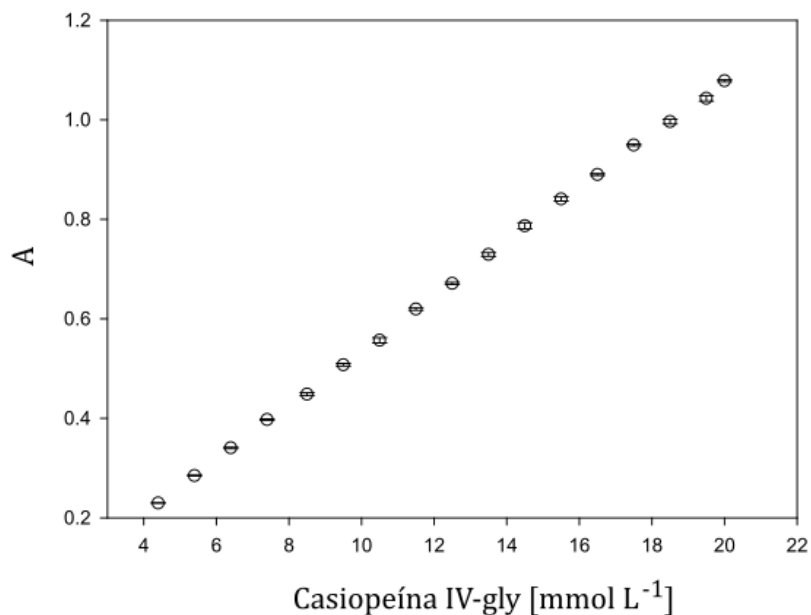


Figura 40. Absorbancia, 606 nm en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en agua pura. a 25 ± 0.1 °C.

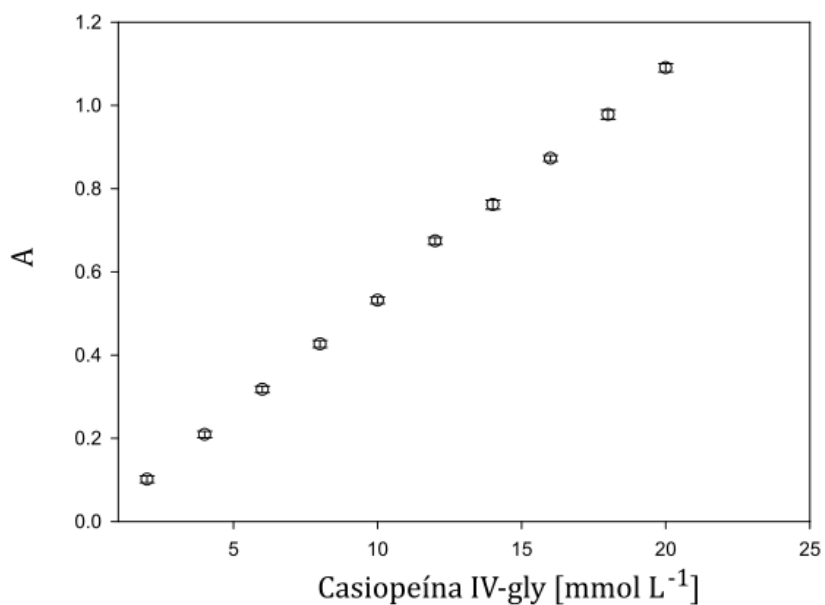


Figura 41. Absorbancia, 605 nm en función de la concentración de Casiopeína IV-gly en medio amortiguado 0.1 mol L^{-1} HEPES, 0.1 mol L^{-1} KCl, pH=7.4, a 25 ± 0.1 °C.

Se observa que en ambos medios la absorbancia presenta un incremento proporcional a la concentración de Casiopeína, por lo cual en ambos medios el comportamiento de la absorbancia puede ser descrito mediante una línea recta. En el caso del agua pura $A = 0.0544[\text{Casiopeína IV} - \text{gly}] - 0.00841$ con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.999$, y con un coeficiente de absortividad molar de $\varepsilon = 54.4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En medio amortiguado el comportamiento es descrito por la ecuación $A = 0.0552[\text{Casiopeína IV} - \text{gly}] - 0.0106$, con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.999$; en este caso el valor del coeficiente de absortividad molar es $\varepsilon = 55.2 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. No se aprecia algún cambio en la tendencia de los gráficos que pueda ser relacionado con la presencia de una nueva especie en las disoluciones, lo cual sugiere que el proceso de auto agregación no ha sido detectado mediante esta técnica.

4.2. Análisis teórico.

4.2.1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)H₂O]NO₃ (Casiopeína III-Ea).

La figura 42 muestra la estructura optimizada para el monómero de Casiopeína III-Ea en vacío.

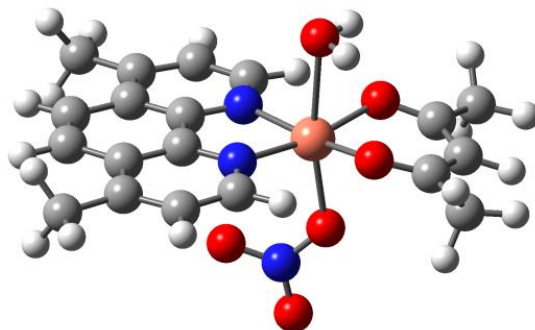
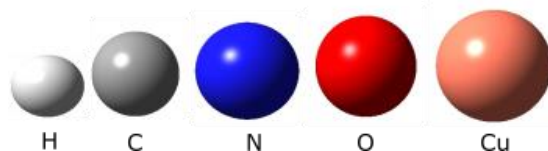


Figura 42. Estructura optimizada en vacío a 25 °C del sistema [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato) H₂O]NO₃ (Casiopeína III-Ea).

Donde:



Los orbitales moleculares HOMO- α (orbital molecular de mayor energía ocupado por sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO- α (orbital molecular de menor energía no ocupado, por sus siglas en inglés Lowest Unoccupied Molecular Orbital) se presentan en la figura 43 en vacío y 44 en medio acuoso. Las zonas rojas representan la fase negativa del orbital, mientras que la fase positiva es atribuida a las zonas verdes.

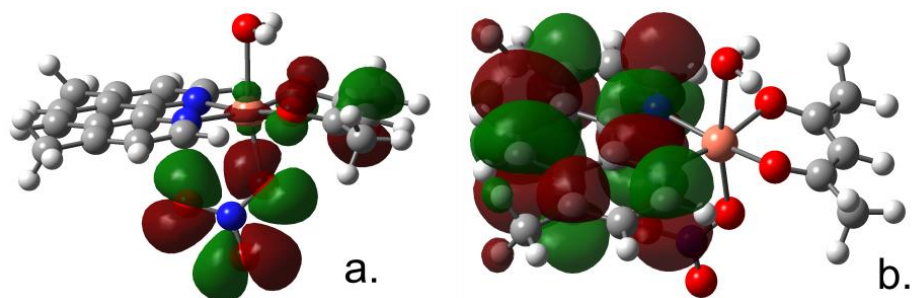


Figura 43. Orbitales moleculares en vacío a. HOMO- α . b. LUMO- α .

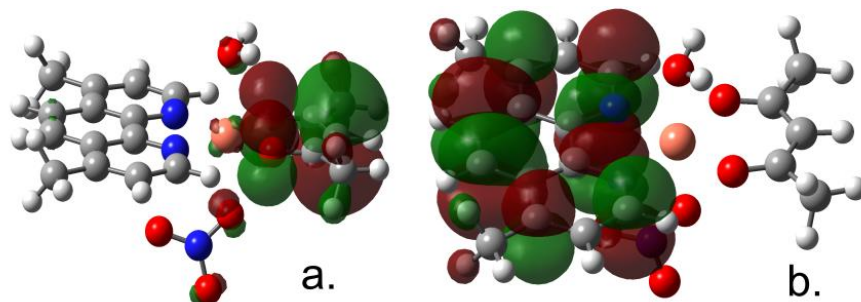


Figura 44. Orbitales moleculares en medio acuoso a. HOMO- α . b. LUMO- α .

Se observa una re distribución de las fases para el orbital HOMO- α cuando la molécula se estudia en medio acuoso, esto es porque la interacción con el medio ocasiona un cambio en el momento dipolar de la Casiopeína, de 8.72 D en vacío a 15.46 D en medio acuoso.

La superficie de energía potencial para esta molécula en vacío se presenta en la figura 45, las zonas con mayor y menor densidad electrónica están representadas en color rojo y azul respectivamente. Se observan dos zonas reactivas, la que corresponde a la molécula de agua y la que corresponde al contraión, siendo esta última la más reactiva. En medio acuoso no se observaron cambios cualitativos en la superficie de energía potencial.

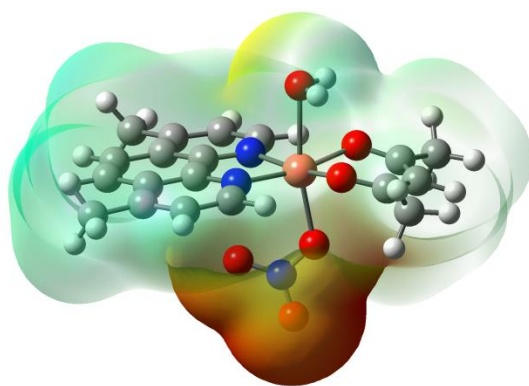


Figura 45. Superficie de energía potencial en vacío.

De acuerdo a las zonas reactivas observadas para esta Casiopeína, se propusieron distintas configuraciones para los dímeros, de los cuales solo dos resultaron energéticamente estables.

En el primer caso (i) las Casiopeínas se aproximaron de forma horizontal, con el fin de favorecer la interacción contraíón-fenantrolina.

En el segundo caso (ii) las Casiopeínas se aproximaron también de forma horizontal, pero esta vez buscando la interacción contraíón-agua.

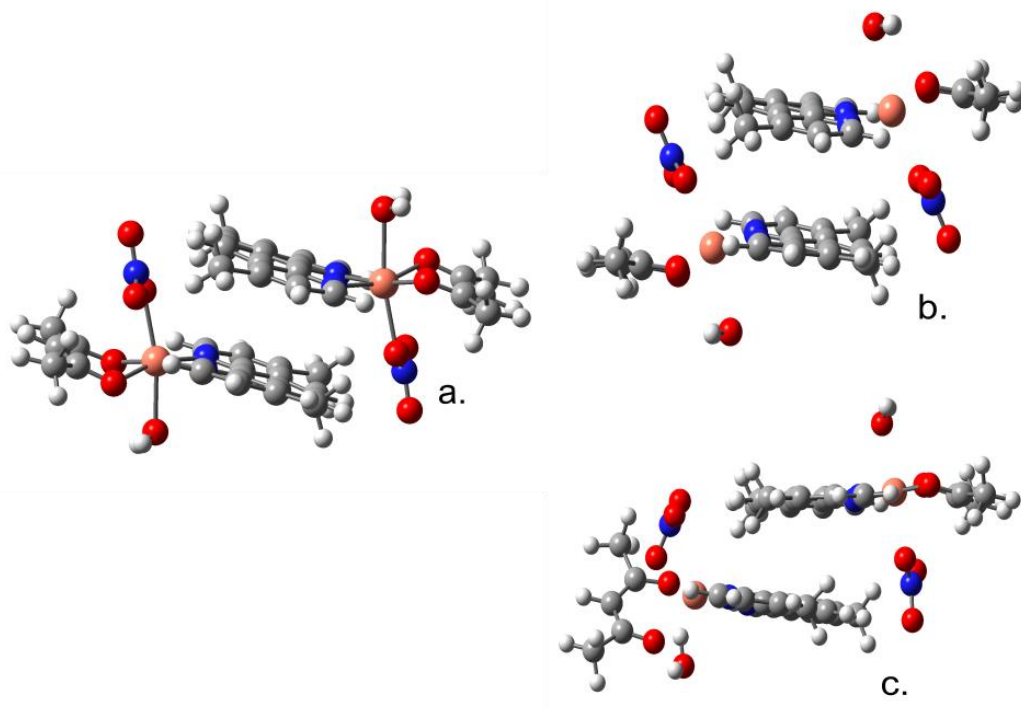


Figura 46. a. Estructura inicial del dímero caso i. b. Estructura final del dímero en vacío. c. Estructura final del dímero en medio acuoso.

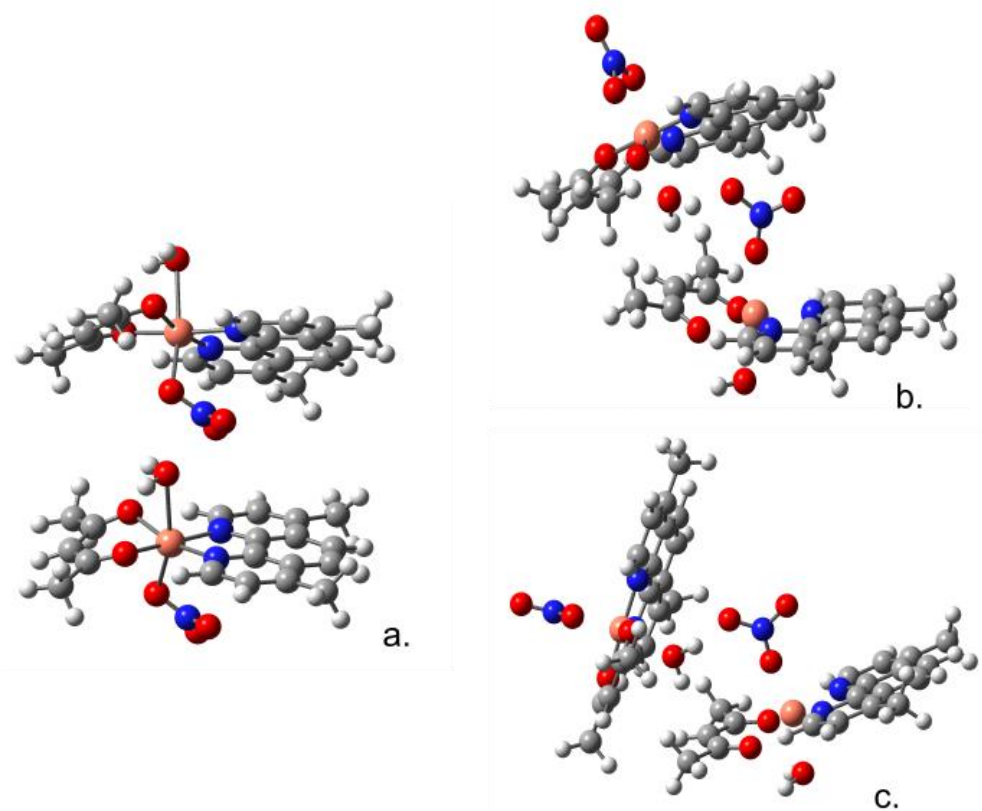


Figura 47. a. Estructura inicial del dímero caso ii. b. Estructura final del dímero en vacío. c. Estructura final del dímero en medio acuoso.

4.2.2. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H₂O]NO₃ (Casiopeína IV-gly).

La estructura optimizada del monómero de Casiopeína IV-gly en vacío se muestra en la figura 48 .

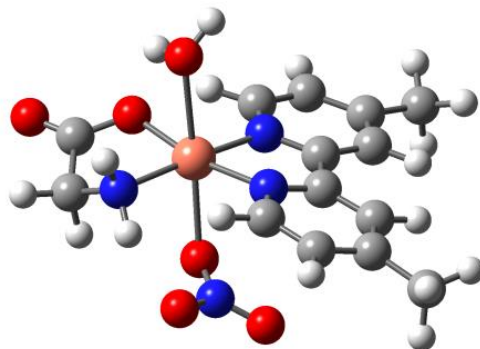


Figura 48. Estructura optimizada en vacío del sistema [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H₂O]NO₃ (Casiopeína IV-gly).

Los orbitales moleculares HOMO- α y LUMO- α de esta molécula se presentan en la figura 49 en vacío y 50 en medio acuoso. Las zonas rojas representan la fase negativa del orbital, mientras que la fase positiva es atribuida a las zonas verdes.

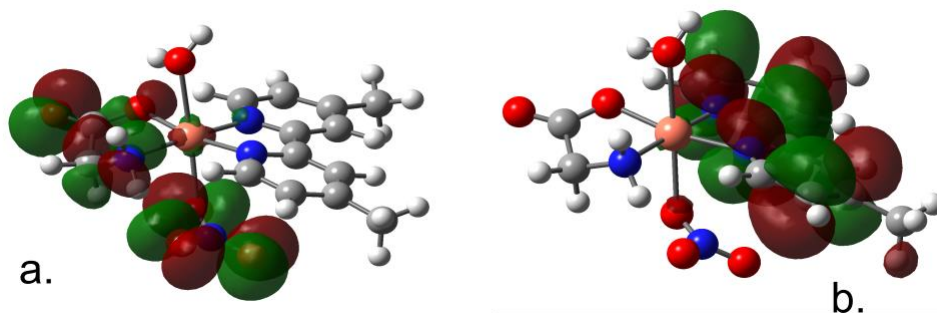


Figura 49. Orbitales moleculares en vacío a. HOMO- α . b. LUMO- α .

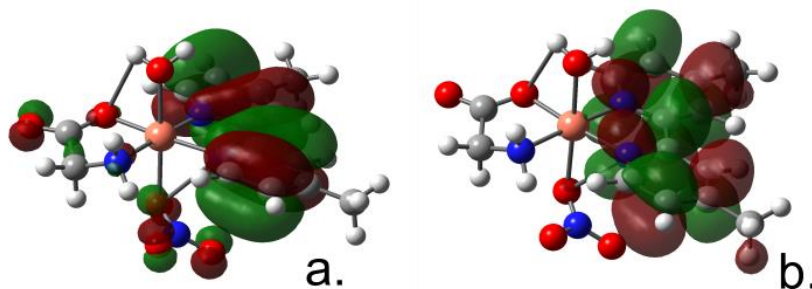


Figura 50. Orbitales moleculares en medio acuoso a. HOMO- α . b. LUMO- α .

Para esta Casiopeína también se observa una re distribución de fases en el orbital HOMO- α asociado al cambio en el momento dipolar ocasionado por la interacción de la Casiopeína con el medio acuoso, de 12.49 D en vacío a 19.33 D en medio acuoso.

La superficie de energía potencial para la Casiopeína IV-gly en vacío se presenta en la figura 51, las zonas con mayor y menor densidad electrónica están representadas en color rojo y azul respectivamente. Se observan dos zonas reactivas, la que corresponde al contraión y la que corresponde al glicinato, no se observaron cambios cualitativos en medio acuoso.

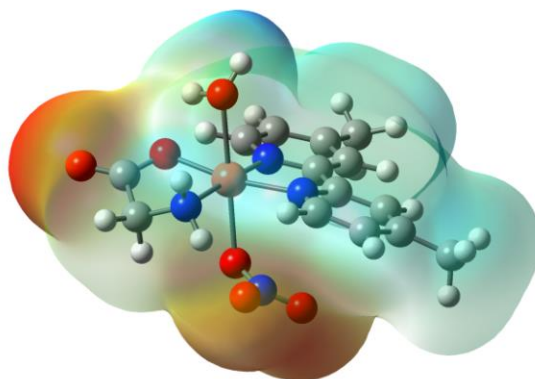


Figura 51. Superficie de energía potencial en vacío.

Con base en los resultados observados se propusieron distintos arreglos para los dímeros de esta Casiopeína, de los cuales solo dos presentaron valores mínimos de energía. En el primer caso (i) observado en la figura 52, las Casiopeínas se aproximaron una horizontal y la otra verticalmente, a fin de propiciar la interacción entre los grupos biperidina y glicinato. En el segundo caso (ii) presentado en la figura 53, ambas Casiopeínas se aproximaron horizontalmente con el objetivo de promover la interacción biperidina-glicinato y contraión-agua.

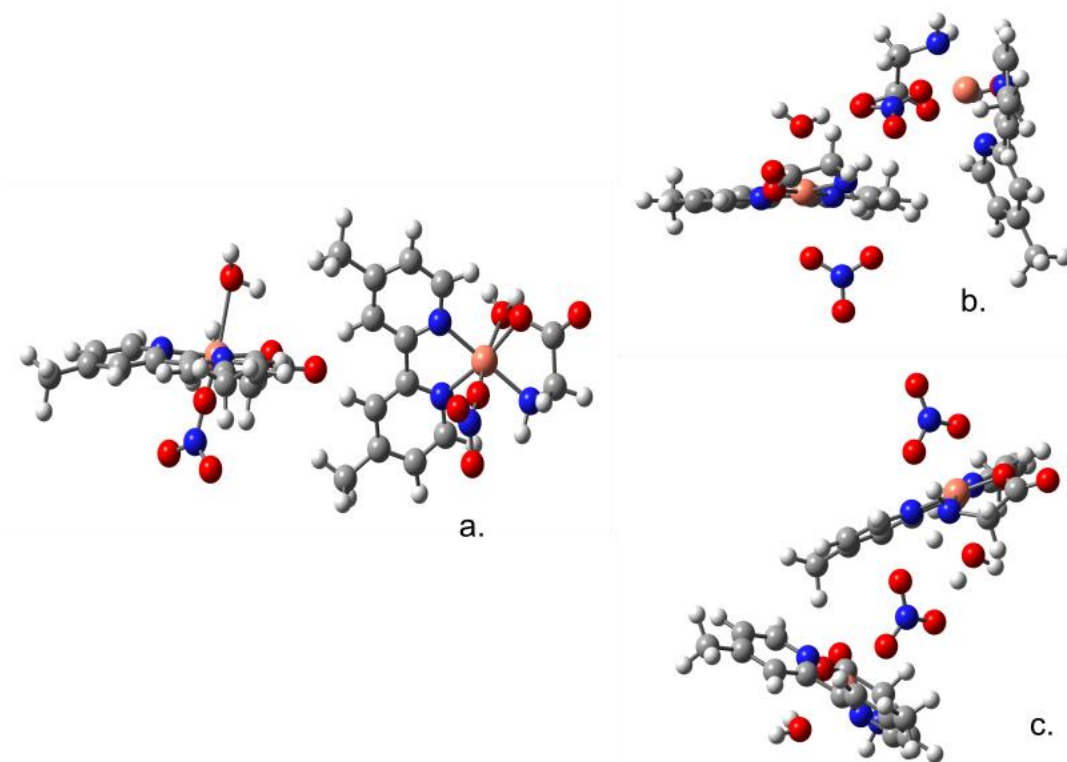


Figura 52. a. Estructura inicial del dímero caso i. b. Estructura final del dímero en vacío. c. Estructura final del dímero en medio acuoso.

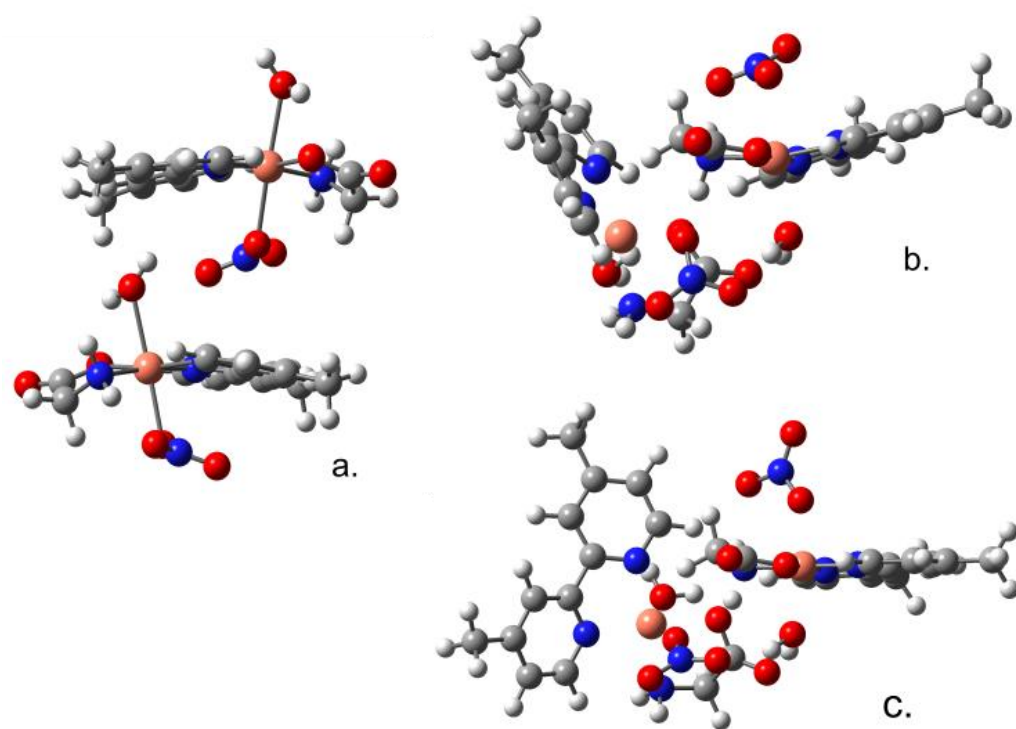


Figura 53. a. Estructura inicial del dímero caso ii. b. Estructura final del dímero en vacío. c. Estructura final del dímero en medio acuoso.

La tabla 6 muestra una comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos para la energía total y momento dipolar, donde los valores más negativos de energía total representan el sistema más estable para cada método.

Se observa que para la Casiopeína III-Ea el dímero propuesto en el caso i presenta un valor más pequeño en vacío, sin embargo en medio acuoso el dímero propuesto en el caso ii presenta un menor valor de energía total, por lo cual este dímero es el más estable y el que se esperaría encontrar experimentalmente.

Por otro lado, se observa que para la Casiopeína IV-gly el dímero propuesto en el caso i tiene un menor valor de energía en vacío y medio acuoso, por lo cual este es el arreglo que se esperaría observar de manera experimental.

Tabla 6. Comparación de los valores obtenidos para la energía total y momento dipolar.

	PM6		M052-X	
	Energía [u.a]	Momento dipolar [Debye]	Energía [u.a.]	Momento dipolar [Debye]
Casiopeína III-Ea				
Monómero				
Vacío	-0.231	11.155	-2992.822	8.72
Medio acuoso	-0.275	20.235	-2992.862	15.4589
Dímero caso i				
Vacío	-0.401	29.204	-5985.518	0.0523
Medio acuoso	-0.356	35.6296	-5985.587	45.6361
Dímero caso ii				
Vacío	-0.431	5.107	-5985.587	4.9386
Medio acuoso	-0.494	10.170	-5985.575	7.2481
Casiopeína IV-gly				
Monómero				
Vacío	-0.233	14.315	-2855.221	12.4979
Medio acuoso	-0.285	22.881	-2855.266	19.3306
Dímero caso i				
Vacío	-0.451	12.553	-5710.350	12.909
Medio acuoso	-0.515	8.133	-5710.399	3.040
Dímero caso ii				
Vacío	-0.454	7.732	-5710.364	7.778
Medio acuoso	-0.518	20.310	-5710.418	13.863

Capítulo 5. Conclusiones y trabajo a futuro.

5.1. Conclusiones.

Se estudiaron disoluciones acuosas de dos complejos de cobre, Casiopeína III-Ea y Casiopeína IV-gly, que han mostrado ser buenos candidatos para la formulación de fármacos anticancerígenos con el objetivo de determinar si estos complejos pueden llevar a cabo un proceso de auto agregación y de ser así, obtener información acerca de la concentración de agregación crítica, el número de agregación y el peso molecular de los agregados. El estudio se realizó mediante las técnicas de calorimetría de titulación isotérmica, conductimetría, espectrofotometría, dispersión de la luz estática y tensión superficial.

Al estudiar la Casiopeína III-Ea se encontró que este complejo posee actividad superficial en los dos medios utilizados, al disminuir la tensión superficial de 72 a 54.5 mN m⁻¹ en agua pura y de 64.8 a 52.3 mN m⁻¹ en el medio amortiguado con TRIS.

En el estudio por conductimetría de esta molécula se observó en ambos medios el comportamiento usual de los electrolitos, la conductividad aumenta de manera proporcional a la concentración de Casiopeína. Se observó que en agua pura el comportamiento de la conductividad es descrito por dos regiones, esto ocasionado por un cambio en la pendiente que indica la formación de agregados. A partir de este cambio se determinó que el valor de la concentración de agregación crítica es de 8.8 mmol L⁻¹. En el medio amortiguado con TRIS no se observaron indicios de la formación de agregados.

El estudio por espectrofotometría para ambos medios dio como resultado un gráfico donde se observa que la absorbancia aumenta proporcionalmente con la concentración. No obstante en agua pura se observó un cambio de tendencia en el gráfico, por lo cual para este medio la absorbancia es definida por dos regiones a partir de las cuales se determinó que el valor de la concentración de agregación crítica se encuentra en el rango de 8 a 10 mmol L⁻¹.

Mediante el estudio por dispersión estática de la luz de esta Casiopeína en agua pura se obtuvo la intensidad de la luz dispersada en función de la concentración de esta molécula. En este gráfico se observa que cuando la concentración es de 11 mmol L⁻¹ la intensidad de la luz dispersada aumenta, lo cual indica que a partir de esta concentración existe una nueva especie más grande y de mayor peso molecular. A partir de esta información se obtuvo el gráfico de Debye, mediante el cual se determinó que el peso molecular del agregado formado es de 926.46 gmol⁻¹, lo cual corresponde a 2 veces el peso molecular de una molécula de Casiopeína III-Ea.

El estudio por calorimetría de titulación isotérmica para ambos medios originó la isoterma característica para un proceso de disociación, lo cual corrobora que esta Casiopeína posee la capacidad de auto asociarse. A partir del ajuste de los

resultados experimentales a un modelo de dímeros se obtuvieron los siguientes parámetros termodinámicos correspondientes al proceso de auto asociación K_D 7.686×10^{-5} en agua pura y 1.091×10^{-4} en medio amortiguado, ΔH_D 34.26 y 106.507 kJ mol⁻¹ en agua pura y medio amortiguado respectivamente, ΔG_D 23.47 kJ mol⁻¹ en agua pura y 22.60 kJ mol⁻¹ en medio amortiguado. Finalmente ΔS_D 37.88 J mol⁻¹ K⁻¹ en agua pura y 281.55 J mol⁻¹ K⁻¹ en medio amortiguado.

El estudio por tensión superficial de la Casiopeína IV-gly mostró que este compuesto posee actividad superficial, al disminuir la tensión superficial de 72 a 70.7 mN m⁻¹ en agua pura y de 72.4 a 65.8 mN m⁻¹ en medio amortiguado con HEPES.

A partir del estudio de esta Casiopeína por conductimetría y espectrofotometría no se observaron cambios en los gráficos que pudieran ser considerados como indicadores de la formación de agregados, por lo cual no se realizó el estudio por dispersión estática de la luz. Sin embargo, el estudio por calorimetría dio como resultado la isoterma propia de un proceso de disociación. Los resultados experimentales fueron ajustados a un modelo de dímeros, a partir del cual se obtuvieron como parámetros termodinámicos K_D 1.28×10^{-4} en agua pura y 1.29×10^{-4} en medio amortiguado, ΔH_D 6.549 kJ mol⁻¹ en agua pura y 9.83 kJ mol⁻¹ en medio amortiguado, ΔG_D 22.20 kJ mol⁻¹ y 22.18 kJ mol⁻¹ respectivamente en agua pura y medio amortiguado, ΔS_D -52.54 J mol⁻¹ K⁻¹ en agua pura y -41.44 J mol⁻¹ K⁻¹ en amortiguado.

El mecanismo exacto mediante el cual las Casiopeínas llevan a cabo el proceso de auto agregación es desconocido. Sin embargo, se realizó un análisis teórico de las moléculas y sus agregados basado en un modelo de dímeros. A partir del cual se propusieron las posibles estructuras en las cuales estos complejos podrían asociarse.

5.2. Trabajo a futuro.

El estudio por las técnicas de calorimetría, espectrofotometría y tensión superficial no mostraron sensibilidad a la presencia de agregados tanto para la Casiopeína III-Ea en medio amortiguado como para la Casiopeína IV-gly en los dos medios elegidos, por esta razón no se realizó el estudio por dispersión estática de la luz para éstos. No obstante, a partir del estudio por calorimetría se obtuvieron las isotermas propias de un proceso de disociación a partir de las cuales se obtuvieron algunos parámetros termodinámicos del proceso de asociación, por lo cual es importante realizar el estudio de dispersión estática de la luz para complementar la caracterización del proceso.

De manera teórica se propusieron los dímeros más probables a formarse de acuerdo a su valor de energía, para verificar estos resultados es conveniente realizar un análisis de dispersión dinámica de la luz para ambas Casiopeínas a fin de obtener el radio hidrodinámico de los agregados y compararlo con las distancias obtenidas para los dímeros propuestos teóricamente.

Dado que se encontró que el comportamiento auto asociativo de las Casiopeínas varía según el medio en el cual sean disueltas y considerando que el objetivo primordial es proponer y caracterizar fármacos anti cancerígenos a partir de estas moléculas, es importante realizar un análisis teórico experimental con otros medios fisiológicos a fin de conseguir una caracterización completa del comportamiento de las Casiopeínas.

Capítulo 6. Referencias.

1. Rehder D., (May/June 2008), Introduction to Inorganic Chemistry. Lecture notes. University of Lund. En línea, https://www.chemie.uni-hamburg.de/ac/rehder/Lund_BioinorgChem_08.pdf
2. Bertini I., Gray H. B., Lippard S. J., Valentine J. S. (1994) *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, E. U. A.
3. Guo Z., Sadler P. J. (1999). Metals in Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38(11), 1512-1531.
4. Ruiz-Azuara L., Bravo-Gómez M. E. (2010). Cooper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, 17(31), 3606-3615.
5. Aguilar Cuevas O., Castro Ramírez R., Sánchez García J. J., López-Sandoval H., Barba-Behrens N. (2012). Química inorgánica medicinal: vanadio, platino, oro. *Educación Química. Profesores al día (Química inorgánica)*. Universidad Nacional Autónoma de México., 23(1), 33-40.
6. Prestayko A. W., Crooke S. T., Carter S. K. (1980), *Cisplatin current status and new developments.*, Academic Press Inc. Ltd., London, U. K.
7. El cáncer. Instituto Nacional del cáncer. En línea, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer>
8. Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. B., Hartinger C. G., Keppler B. K., (2008). Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.*, 14(2), 183-194.
9. McKeage M. J., Higgins III J. D., Kelland L. R. (1991). Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. A commentary on the sixth international symposium: San Diego, California, 23-26th January 1991. *Br. J. Cancer.*, 64(4), 788-792.
10. Lippert B., (Ed.), (1999), *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH: Zürich.
11. Ruiz-Azuara L., (1992), Process to obtain new mixed cooper aminoacidate complexes from phenylatephananthroline to be used as anticancerigenic agents. US Patent No. 5, 107, 005.
12. 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.
13. Bravo-Gómez M. E., Hernández de la Paz A. L., Gracia-Mora I. (2013). Antineoplastic Evaluation of two mixed chelate copper complexes (Casiopeínas®) in HTC-15 Xenograft Model. *J. Mex. Chem. Soc.*, 57(3), 205-211.
14. García Ramos J. C., 2007, Estudio QSAR de compuestos de cobre tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM
15. Alemón M. R., Sánchez M. J. L., Ruiz-Azuara L., Cruz M. M. T. (2006). Determinación de la actividad oxidativa de las Casiopeínas Cas-II gly, Cas-III-I-A y Cas-III-E-A en células HeLa., 2do Congreso Nacional de Química Médica (CNQM), 4-8 septiembre 2006, Querétaro, Qro., México.

16. López-Rodríguez A., Cárabez-Trejo A., Rosas-Sánchez F., Mejía C., Ruiz-Azuara L., Miledí R., Martínez-Torres A. (2011). The metal-coordinated Casiopeina III Ea induces the petite-like phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*, 24(6), 1189-1196.
17. Rivero-Müller A., De Vizcaya-Ruiz A., Plant N., Ruiz L., Dobrota M. (2007). Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly ®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, 165(3), 189-199.
18. Galindo-Murillo R., Hernández-Lima J., González-Rendón M., Cortés-Guzmán F., Ruíz-Azuara L., Moreno-Esparza R. (2011). π - stacking between Casiopeínas and DNA bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(32), 14510-14515.
19. García-Ramos J. C., Tovar-Tovar A., Hernández-Lima J., Cortés-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Ruiz-Azuara L. (2011). A new kind of intermolecular stacking interaction between cooper (II) mixed chelate complex (CasiopeínaIII-ia) and adenine. *Polyhedron*, 30(16), 2697-2703.
20. Breña V. M., Serment G. J., Ruiz A. L. (2010). Mecanismos de acción de antineoplásicos de nueva síntesis y su posible uso en terapia combinada con radiación. En *Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al avance de la Ciencia y la tecnología en México*. Edición conmemorativa 2010. México.
21. 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(1), 1-18.
22. Vértiz G., García-Ortuño L. E., Bernal J. P., Bravo-Gómez M. E., Lounejeva E., Huerta A., Ruiz-Azuara L., (2014). Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel cooper-based anticancer agent: Casiopeina III-Ea, after a single intravenous dose in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 28(1) 78-87.
23. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002), *Biología molecular de la célula.*, Capítulo 17: El ciclo de la célula y la muerte celular programada. (4ta ed.), Nueva York: Garland Science.
24. Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Moreno-Sánchez R., (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas ®) on mitochondrial functions., *Biochem. Pharmacol.* 65(12), 1979-1989.
25. Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Gómez-Ruiz C., Tinoco-Méndez M., Márquez-Quiñones A., Romero-De Lira L., Marín-Hernández A., Macías-Rosales L., Bravo-Gómez M. E. (2001). Knighth's move in the periodic table, from cooper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cáncer cell line panel. *Metal based drugs.*, 8(1), 19-28.
26. Marín-Medina A., García-Ramos J. C., Ruiz-Azuara L., Carrillo-Nava E. (2016). Investigation on the self-association of an inorganic coordination

- compound with biological activity (Casiopelina III-ia) in aqueous solution. *Chem. Cent. J.*, 10:65.
27. Moroi Y. Micelles. (1992), *Theoretical and applied aspects.*, Springer Science +Business Media. New York, USA.
 28. Surfactants and critical micelle concentration (CMC). DataPhysics Instruments. Understanding Interfaces. En línea, <http://www.dataphysics.de/2/start/understanding-interfaces/basics/surfactants-and-critical-micelle-concentration-cmc/>
 29. Blandamer M. J., Cullis P. M., Soldi L. G., Engberts J. B. F. N., Kacperska A., Van Os N. M., Subha M. C. S. (1995). Thermodynamics of micellar systems: a comparison of mass action and phase equilibrium models for the calculations of standard Gibbs energies of micelle formation. *Adv. Colloid Interfac.*, 58(2), 171-209.
 30. Attwood D., (1995). The mode of association of amphiphilic drugs in aqueous solution. *Adv. Colloid Interfac.*, 55, 271-303.
 31. Maibaum L., Dinner A. R., Chandler D. (2004). Micelle formation and the hydrophobic effect. *J. Phys. Chem. B.*, 108(21), 6778-6781.
 32. Cosgrove T. (Ed.), (2005), *Colloid Science. Principles, methods and applications.*, Department of Chemistry, University of Bristol, Blackwell Publishing Ltd., Bristol, UK.
 33. Myers D., (1999), *Surfaces, interfaces, and colloids. Principles and applications.*, (2nd ed.), John Wiley & sons, Inc., Wiley-VCH, New York, USA.
 34. Adamson A. W., Gast A. P., (1997), *Physical Chemistry of Surfaces.* (6th ed.), A Wiley-Interscience publications. John Wiley & Sons, Inc., USA.
 35. Katime I., Quintana J. R., Villacampa M. (2003). Micelas. *Revista Iberoamericana de Polímeros.*, 4(2), 123-150.
 36. Streng W.H., Yu D. H. -S., Zhu C. (1996). Determination of solution aggregation using solubility, conductivity, calorimetry, and pH measurements. *Int. J. Pharm.*, 135(1-2), 43-52.
 37. Zhu C., Streng W. H. (1996). Investigation of drug self-association in aqueous solution using calorimetry, conductivity, and osmometry. *Int. J. Pharm.*, 130(2), 159-168.
 38. Zana R., (1996). Critical micellization concentration of surfactants in aqueous solution and free energy of micellization. *Langmuir.*, 12(5), 1208-1211.
 39. Phillips J. N., (1955). The energetics of micelle formation. *Trans. Faraday Soc.*, 51, 561-569.
 40. Schreier S., Malheros S. V. P., de Paula E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1508(1-2), 210-234.

41. Pérez-Rodríguez M., Prieto G., Rega C., Varela L. M., Sarmiento F., Mosquera V. (1998). A comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements. *Langmuir.*, 14(16), 4422-4426.
42. Benito I., García M. A., Monge C., Saz J. M., Marina M. L. (1991). 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(2-3), 221-224.
43. Domínguez A., Fernández A., González N., Iglesias E., Montenegro L., (1997). Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *J. Chem. Educ.*, 74(10), 1227-1231.
44. Nesmêrák K., Nêmcová I. (2006). Determination of critical micelle concentration by electrochemical means. *Analytical Letters.*, 39(6), 1023-1040.
45. Sharma S. K., Patil S. R., Rakshit A. K., Glenn K., Doiron M., Palepu R. M., Hassan P. A. (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(34), 12804-12812.
46. 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(2), 459-464.
47. Castellan W. (1983), *Physical Chemistry.*, (3rd ed.), Addison-Wesley, USA.
48. Maron S., Prutton C., (2001) *Fundamentos de Fisicoquímica*, Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores, México, D.F., México.
49. Dorsey E. N. (1926). Measurement of surface tension. *Scientific papers of the Bureau of standards.*, 21, 563-592.
50. 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.
51. Zuidema H. H., Waters G. W. (1941). Ring method for the determination of interfacial tension. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 13(5), 312-313.
52. Khang G. N., Sai C. L. (1980). The concept of conductivity and molar conductivity of an aqueous solution. *Institute of Education Singapore Journal of Education*, 3(1), 27-31.
53. Conductivity. Theory and practice. Radiometer analytical. En línea, http://www.analytical-chemistry.uoc.gr/files/items/6/618/agwgimometria_2.pdf
54. Conductivity guide. A guide to conductivity measurement. Theory and practice of conductivity applications. Mettler Toledo. En línea, <http://www.mt.com/ch/en/home/library/guides/lab-analytical-instruments/Conductivity-Measurement-Theory-Guide.html>

55. Baeza A., García A., 2011, Principios de electroquímica analítica. 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
56. Freire E., Mayorga O. L., Straume M. (1990). Isothermal Titration. *Analytical Chemistry*, 62(18), 950A-959A.
57. Calorimetría de titulación isotérmica para estudiar las interacciones biomoleculares. Malvern. En línea, <http://www.malvern.com/es/products/technology/isothermal-titration-calorimetry/>
58. Velazquez-Campoy A., Leavitt A. S., Freire E. (2004). Characterization of protein-protein Interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.*, 261, 35-54.
59. Paula S., Süss W., Tuchtenhagen J., Blume A. (1995). Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity calorimetry study. *J. Phys. Chem.*, 99(30), 11742-11751.
60. Stedwell C. N., Polfer N. C. (2013). Spectroscopy and the electromagnetic spectrum. En Polfer N.C. & Dugourd P. (Ed.), *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-separated Biomolecular Ions.*, Springer International Publishing. Springer Science & Business Media, Switzerland
61. Dundee Satellite Receiving Station. Electromagnetic Spectrum. University of Dundee. En línea, <http://www.sat.dundee.ac.uk/spectrum.html>
62. Castro de Esparza M. L., Litter M. I., Wong M., Mori V. (2009), Métodos espectrofotométricos UV-Vis. En Litter M.I., Armenta M.A., Farias S.S. (Ed), *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos.*, IBEROARSEN, Argentina.
63. Corrin M. L., Harkins W.D. (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(3), 679-683.
64. Harris D. C., (1992) *Análisis Químico Cuantitativo.* (3ra ed.), Grupo editorial Iberoamérica., México.
65. Mukerjee P., Mysels K. J. (1955). A Re-evaluation of the spectral change method of determining critical micelle concentration. *J. Am. Chem. Soc.*, 77(11), 2937-2943.
66. Kim H. A., Seo J. K., Kim T., Lee B. T. (2014). Nanotrometrology and its perspectives in environmental research. *Environ. Health Toxicol.*, 29(0), 1-9.
67. Li X., Mya K. Y., Ni X., He C., Leong K. W., Li J. (2006). Dynamic and static light scattering studies on self-aggregation behavior of biodegradable amphiphilic Poly(ethylene oxide)-Poly[α -3-hydroxybutyrate]-Poly(ethylene oxide) Triblock copolymers in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B.*, 110(12), 5920-5926.

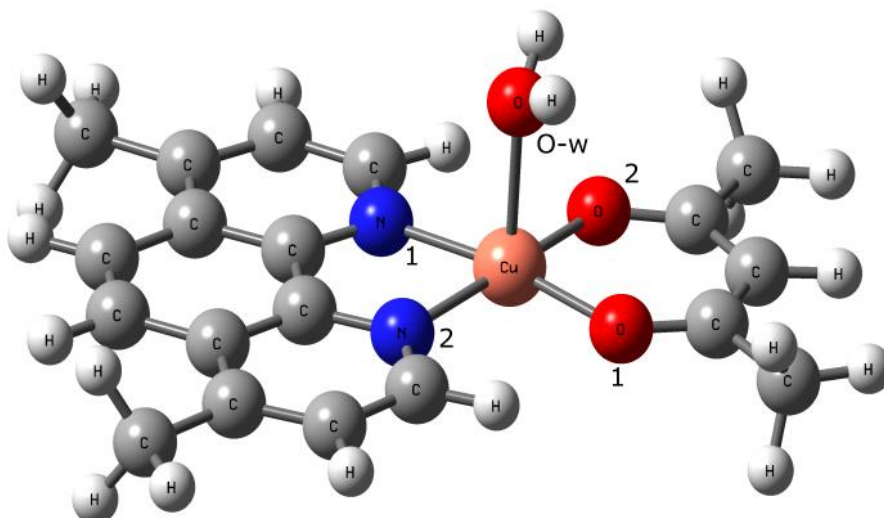
68. Debye P., (1947). Molecular determination by light scattering. *J. Phys. Chem.*, 51(1), 18-32.
69. Berry G. C., Cotts P. M. (1991). Static and dynamic light scattering. En *Experimental Methods in Polymer Characterization.*, Pethnick R.A., Stein R.S. (Ed.) 1999., John Wiley, Nueva York, E.U.A.
70. Wyatt P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chem. Acta.*, 271(1), 1-40.
71. Static light scattering technologies for GPC-SEC explained. Whitepaper. (2015.), Malvern Instruments Limited.
72. Zetasizer nano series. User manual.(2013), U.K., Malvern Instruments Ltd.
73. Cuadros-Moreno A., Casañas P. R., San Martín-Martínez E., Yañes F. J., (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. Phys. Educ.*, 8(4), 4314-1 – 4314-5.
74. Li Y., Barron A. R., Dynamic light scattering., Openstax CNX. En línea, <https://cnx.org/contents/P8mNrZNN@2/Dynamic-Light-Scattering>
75. Errol G. Lewars., (2011), *Computational Chemistry. Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics.* (2nd ed.), Springer. DOI 10.1007/978-90-481-3862-3
76. Valles-Sánchez A., Rosales-Marines L., Serrato-Villegas I. E., Farías-Cepeda L. (2014). Métodos y usos de la química computacional., *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.*, 6(11),16-21.
77. Jensen, F., (2007), *Introduction to computational chemistry.*, (2nd ed.), John Wiley & Sons, Ltd., England, U.K.
78. David C. Young, (2001), *Computational chemistry. A practical guide for applying techniques to real-world problems.*, John Wiley & Sons. Inc., New York, USA.
79. Cramer C. J. (2004), *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models.* (Second edition.), John Wiley & Sons, Ltd., England U.K.
80. P. Hohenberg & W. Kohn, (1964), Inhomogeneous Electron Gas., *Phys. Rev.*, 136(3B), B864-B871.
81. García-Ramos J. C., Galindo-Murillo R., Tovar-Tovar A., Alonso Saenz A. L., Gómez-Vidales V., Flores-Álamo M., Ortiz-Frade L., Cortes-Guzmán F., Moreno-Esparza R., Campero A., Ruiz-Azuara L. (2014). The π -Back-Bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu^{II} antineoplastic compounds: An experimental and theoretical study. *Chem. C*
82. Galindo-Murillo R., García-Ramos J. C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T. E., Cortés-Guzmán F. (2015). Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Res.*, 43(11), 5364-5376.
83. Galindo-Murillo R., Ruiz-Azuara L., Moreno-Esparza R., Cortés-Guzmán F. (2012). Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 15539-15546.

84. Good. N. E., Winget G. D., Winter W., Connolly T. N., Izawa S., Singh M. M. (1996). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry.*, 5(2), 467-477.
85. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09* (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009).
86. Zhao Y., Schultz N. E., Truhlar D.G. (2006). Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Theory Comput.*, 2(2), 364-382.

Apéndice.

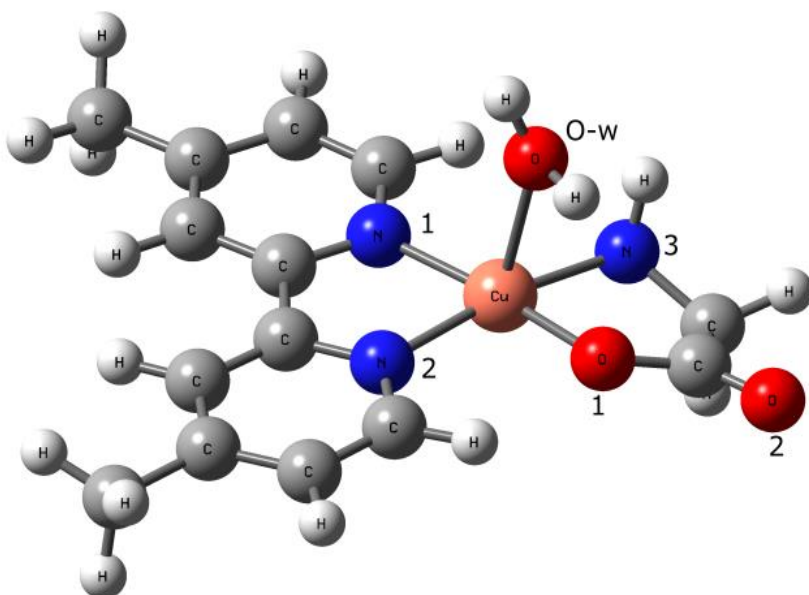
Comparación de las distancias intermoleculares obtenidas con las reportadas.^[18, 81- 83]

- I. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)H₂O]NO₃
(Casiopeína III-Ea).



Enlace	Distancia reportada [Å]	Distancia obtenida [Å]
Cu-N1	1.919	2.02505
Cu-N2	1.944	2.0249
Cu-O1	1.852	1.918
Cu-O2	1.790	1.918
Cu-Ow	2.335	2.248
N1-Cu-N2	84.342	81.316
N1-Cu-O1	169.124	171.915
N1-Cu-O2	89.072	92.293
N1-Cu-Ow	97.276	93.75
N2-Cu-O1	92.177	92.296
N2-Cu-O2	170.445	171.923
N2-Cu-Ow	92.472	93.807
O1-Cu-Ow	93.158	91.606
O2-Cu-Ow	95.229	91.526
O1-Cu-O2	93.035	93.615

II. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)H₂O]NO₃ (Casiopeína IV-gly).



Enlace	Distancia reportada [Å]	Distancia obtenida [Å]
Cu-N1	2.0339	2.023
Cu-N2	2.0164	2.0017
Cu-N3	2.0652	2.0482
Cu-O1	1.9017	1.9008
Cu-O1w	2.2980	2.283
N1-Cu-N2	80.494	80.76
N1-Cu-N3	102.431	102.862
N1-Cu-O1	173.175	173.247
N1-Cu-O1w	99.332	99.854
N2-Cu-N3	165.179	170.635
N2-Cu-O1	92.819	92.53
N2-Cu-O1w	105.352	100.139
N3-Cu-O1	84.383	83.885
N3-Cu-O1w	88.626	87.831
O1-Cu-O1w	81.036	80.479