

**DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE
ACIDEZ Y COMPLEJACIÓN CON $Cu(II)$ DEL
4-TERBUTIL-2,6-BIS(TIOMORFOLIN-1-ILMETIL)
FENOL.**

Tesis que presenta
Q. Agustín Ibarra Escutia.
Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias (Química)

Asesor:
Dr. Alberto Rojas Hernández.

Jurado calificador:

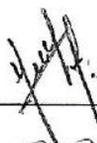
Presidenta: **Dra. María Teresa Ramírez Silva**

Secretario: **Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna**

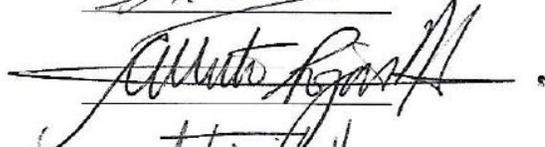
Vocal: **Dr. Alberto Rojas Hernández**

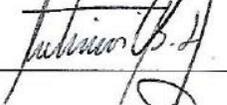
Vocal: **Dra. Patricia Balderas Hernández**

Vocal: **Dr. Francisco Miguel Castro Martínez**











México D.F., Febrero de 2017.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00128

Matrícula: 209382231

Determinación de las constantes de acidez y complejación con Cu(II) del 4-terbutil-2,6-bis (tiomorfolin-1-ilmetil)fenol.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 9 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA
DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ
DRA. PATRICIA BALDERAS HERNANDEZ
DR. FRANCISCO MIGUEL CASTRO MARTINEZ
DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA



AGUSTIN IBARRA ESCUTIA
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: AGUSTIN IBARRA ESCUTIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA

DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA

VOCAL

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

VOCAL

DRA. PATRICIA BALDERAS HERNANDEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO MIGUEL CASTRO MARTINEZ

SECRETARIO

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

INDICE

| | Pag. |
|---|------|
| RESUMEN | vi |
| CAPÍTULO 1 | 8 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.2 HIPERTENSIÓN | 10 |
| 1.2.1 PRESIÓN ARTERIAL | 12 |
| 1.2.2 TRATAMIENTO | 13 |
| 1.2.3 FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS | 14 |
| 1.3 ANTECEDENTES | 15 |
| 1.4 CONSTANTES DE DISOCIACIÓN ÁCIDA | 20 |
| 1.5 COMPLEJOS METÁLICOS | 21 |
| 1.5.1 APLICACIONES MÉDICAS DE COMPLEJOS METÁLICOS | 23 |
| 1.6 OBJETIVOS | 26 |
| 1.6.1 OBJETIVOS GENERALES | 26 |
| 1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| CAPÍTULO 2 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ | 28 |
| 2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 29 |
| 2.1.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE) | 29 |
| 2.1.2 PARTE EXPERIMENTAL ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS | 31 |
| 2.1.3 ESTABILIDAD DEL LQM303 | 32 |
| 2.2 MODELO QUÍMICO PARA EL CÁLCULO DE pKa | 35 |
| 2.3 MODELO ESPECTROFOTOMÉTRICO | 37 |
| 2.4 DETERMINACIÓN DE pK _a POR CZE | 39 |
| 2.4.1 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM303 (T = 25 °C; I = 0.05 M) | 39 |
| 2.4.2 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM303 (T = 37 °C; I = 0.05 M) | 47 |
| 2.4.3 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM314 (T = 37 °C; I = 0.05 M) | 49 |
| 2.5 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CONSTANTES DE ACIDEZ | 52 |
| 2.5.1 DETERMINACIÓN DE pK _a a T = 25 °C | 52 |
| 2.5.2 DETERMINACIÓN DE pK _a a T = 37 °C y I = 0.15 M | 55 |
| 2.6 CONCLUSIONES | 60 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 3 CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN Cu(II)-LQM | 61 |
| 3.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 62 |
| 3.1.1 MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES..... | 62 |
| 3.1.2 PARTE EXPERIMENTAL..... | 63 |
| 3.2 RELACIÓN MOLAR <i>Cu-LQM</i> | 65 |
| 3.2.1 Adición LQM a Cu ²⁺ | 65 |
| 3.2.2 Adición Cu ²⁺ a LQM..... | 69 |
| 3.3 RELACIÓN MOLAR <i>Cu/LQM</i> CONSTANTE..... | 73 |
| 3.3.1 ANÁLISIS DE “RELACIÓN MOLAR 1:1”..... | 73 |
| 3.3.2 ANÁLISIS DE “RELACIÓN MOLAR 2-1”..... | 77 |
| 3.3.3 ANÁLISIS DE “RELACION MOLAR 1-2”..... | 81 |
| 3.4 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES “DATAN”..... | 84 |
| 3.5 CÁLCULO DE CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN - <i>Cu-LQM</i> (medio acuoso)..... | 88 |
| 3.6 CÁLCULO DE CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN <i>Cu-LQM</i> (en metanol)..... | 97 |
| 3.7 CONCLUSIONES..... | 104 |
| | |
| CAPÍTULO 4 ESTUDIO TEÓRICO DE LQM’s | 105 |
| 4.1 RUTAS DE DESPROTONACIÓN..... | 106 |
| 4.1.1 METODOLOGÍA..... | 106 |
| 4.1.2 <i>B3LYP</i> - LQM303..... | 107 |
| 4.1.3 <i>B3LYP</i> - LQM314..... | 109 |
| 4.1.4 <i>M052X</i> - LQM303..... | 110 |
| 4.1.5 COMPARACIÓN ENTRE <i>B3LYP</i> Y <i>M052X</i> | 113 |
| 4.1.6 INFLUENCIA DEL SUSTITUYENTE - <i>para</i> | 115 |
| 4.2 CONCLUSIONES..... | 117 |
| | |
| CONCLUSIONES GENERALES | 118 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 119 |
| | |
| PERSPECTIVAS | 120 |
| | |
| APÉNDICE | 121 |

| | |
|--|-----|
| APÉNDICE A | 122 |
| DETERMINACIÓN DE <i>logP</i> para LQM314 | 122 |
| APÉNDICE B | 126 |
| ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA..... | 126 |
| APÉNDICE C | 129 |
| ESPECTROSCOPÍA UV-VIS..... | 129 |
| APÉNDICE D | 131 |
| ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 131 |
| REFERENCIAS | 134 |

AGRADECIMIENTOS

De mi madre aprendí que nunca hay que darse por vencido sin importar que tan cansado o fastidiado estés, siempre debes entregar todo en el camino. Hoy quiero agradecer todos esos años de apoyo, consejos y regaños que me han ayudado a concluir esta etapa en mi vida profesional. Espero que éste logro pueda recompensar un poquito tanta ausencia de mi parte... te amo Nani.

Quiero agradecerles a mis padres *Agustin y Estela*, a mis hermanos *Cristobal, Pedro y Joel*, gracias por estar siempre juntos a pesar de las dificultades de la vida.

Agradezco a *Guadalupe Mendoza Damián* por tantos años de amistad y por acompañarme en este camino de la vida.

Asimismo quiero agradecer al Dr. Alberto Rojas Hernández por la confianza y apoyo para impartir mis primeras clases en UAM-I. Siempre estaré en deuda por toda la ayuda y asesoría que me brindo para realizar este proyecto.

Quiero agradecer:

A la *Dra. Ma. Teresa Ramírez Silva* por el apoyo brindado a lo largo de estos años.

A la *Dra. Annia Galano* por toda la ayuda para desarrollar la parte teórica de este trabajo, y sobre todo gracias por su paciencia.

A los miembros del jurado por todas sus aportaciones para mejorar este trabajo de tesis:

Dra. María Teresa Ramírez Silva

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Dr. Alberto Rojas Hernández

Dra. Patricia Balderas Hernández

Dr. Francisco Miguel Castro Martínez

A la *Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa* por brindarme la oportunidad de realizar este posgrado.

Al *CONACYT* por la beca No. 228918 otorgada para realizar los estudios de posgrado.

A los cómplices por compartir tantas cosas en estos años: *Carlos, Daniel, Manuel, y Lauri*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento a través de la beca otorgada para la realización de estudios de posgrado (CVU: 328555 y No. De Becario: 228918) y del proyecto de investigación 237997. También al Programa de Desarrollo del Profesorado de la SEP (PRODEP) por la beca otorgada a través de la Red Nacional de Investigación en Química Analítica y Electroquímica (RedNIQAE).

RESUMEN

En este trabajo se presenta la determinación de las constantes de acidez del *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol* o LQM303 (por sus siglas: Laboratorio de Química Medicinal), a dos diferentes temperaturas, 25°C y 37°C, con una fuerza iónica de 0.05M. Estas determinaciones se llevaron a cabo por dos técnicas experimentales, electroforesis capilar de zona y espectrofotometría ultravioleta visible. En el caso de la determinación de pKa por espectrofotometría a 37°C, la fuerza iónica se impuso a 0.15M,

Se observó que a valores de pH mayores a 7.0 el compuesto LQM303 precipita, por lo cual no es posible la determinación del tercer valor de pK_a mediante estas técnicas. De acuerdo a esto se propuso un modelo de dos equilibrios en los ajustes realizados con SQUAD para la determinación de las constantes de acidez.

Asimismo, se describe el estudio de formación de complejos de Cobre-LQM303, mediante el uso del método de relaciones molares con el cual se determinaron las posibles estequiometrias de los complejos formados. Como resultado del método de relaciones molares se encontraron tres posibles estequiometrias, 1:1, 2:1 y 1:2 de Cu-LQM. Posteriormente se analizaron estas tres relaciones molares fijas en función del pH.

Se determinaron las constantes de complejación, se aplicó el análisis de componentes principales para conocer cuántas especies absorben diferente en el sistema. A través del software DATAN se determinó que hay entre 5 y 6 componentes principales presentes, los cuales se interpretan como especies químicas que absorben radiación electromagnética de forma diferente. Finalmente se propuso un modelo de 5 especies de Cu-LQM, el cual se alimentó al programa SQUAD; con los resultados obtenidos se construyeron los espectros ajustados y al comparar con los espectros experimentales se observa un buen ajuste en la forma del espectro. Esto es un indicativo de que el modelo propuesto describe el comportamiento químico del sistema Cu-LQM303.

Para comprobar el modelo propuesto para la formación de complejos en medio acuoso, se realizó un estudio similar utilizando metanol como medio. El intervalo de estudio fue en la

región visible del espectro electromagnético, entre 400 y 800 nm. Se obtuvo prácticamente el mismo modelo, utilizado en medio acuoso. El modelo se compone de cuatro de las cinco especies propuestas para medio acuoso.

Como información adicional a este trabajo de tesis se efectuó un estudio teórico mediante la teoría de funcionales de la densidad, iniciando con un estudio conformacional del LQM303, posteriormente se determinó la estructura de menor energía del compuesto. También se propone la ruta de desprotonación del LQM303. En este caso se utilizaron los funcionales B3LYP y M052X.

Finalmente se trabajó en la determinación de constantes de acidez del LQM314 (*4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzonitrilo*) mediante electroforesis capilar de zona. Y se determinó el valor de $\log P$ entre octanol y agua, mediante el método de extracción líquido-líquido. Se concluye con esto que el LQM314 cumple con la regla de Lipinski, $\log P < 5$.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

La química moderna tiene importantes principios teóricos, dentro de los cuales se puede mencionar aquellos que están basados en la observación de cambios en la estructura molecular y su efecto producido en el equilibrio ácido-base. En farmacología un tema de vital importancia es el carácter ácido-base, así la caracterización fisicoquímica de compuestos que presentan actividad biológica incluye la determinación de sus constantes de acidez y formación de complejos con iones metálicos de interés biológico [1].

Las propiedades fisicoquímicas de un fármaco condicionan muchos de los procesos de absorción del mismo, es por ello que estas propiedades son de gran importancia para la biodisponibilidad de dicha sustancia.

Algunos factores de los cuales depende el mecanismo por el cual se produce la absorción (difusión pasiva, filtración y transporte activo) y la velocidad a la que se realiza, comprenden el peso molecular que condiciona el tamaño de la molécula, la liposolubilidad y su carácter ácido o alcalino, que junto con su pK_a , condicionan el grado de ionización [1].

En la investigación y desarrollo de nuevas moléculas con principios activos de interés biológico (por ejemplo nuevos fármacos), una de las primeras etapas en esta cadena de desarrollo es la preformulación que puede describirse como la fase del proceso de desarrollo en la que se caracterizan las propiedades fisicoquímicas.

Este trabajo se enfoca en el análisis de un nuevo compuesto con propiedades antihipertensivas, llamado comúnmente LQM303 el cual se muestra en la *figura 1.1*. Este análisis abarcará la determinación de algunos parámetros de gran interés fisicoquímico, como son las constantes de acidez y las constantes de formación de complejos utilizando como elemento metálico al Cu(II).

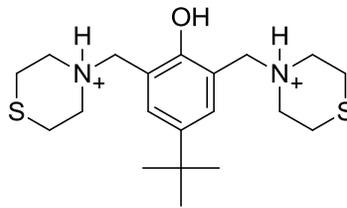


Figura 1.1. Especie diprotonada del LQM303 (4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol) [2]

La realización de este estudio es de gran relevancia, ya que el tema de hipertensión es de especial interés debido a la prevalencia de este mal en nuestro país, por lo tanto el desarrollo de medicamentos que atiendan estos padecimientos es vital para la sociedad.

1.2 HIPERTENSIÓN

En la actualidad, la salud humana se ve influida en todo el mundo por los mismos factores como: envejecimiento de la población, urbanización acelerada y generalización de modos de vida insano. Cada vez más, los países con economías de primer mundo y países pobres se enfrentan a los mismos problemas de salud. Uno de los ejemplos más notables de este cambio es que las enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes o las enfermedades pulmonares crónicas han superado a las enfermedades infecciosas como principales causas de mortalidad en el mundo [3].

La hipertensión arterial (HTA) es un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y renales. La mortalidad por estas complicaciones ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas. En 2008, en el mundo se habían diagnosticado de hipertensión aproximadamente el 40% de los adultos mayores de 25 años. En general, la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados (35%) que en los países de otros grupos de ingresos [3].

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total [4]. Entre ellas, las complicaciones por la hipertensión causan anualmente 9,4 millones de muertes [5]. La hipertensión es la causa

de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular.

La HTA afecta a 31.5% de los adultos mexicanos y se encuentra entre las más altas a nivel mundial, y cerca del 60% de los individuos afectados desconoce su enfermedad. Aunque el diagnóstico oportuno ha aumentado en el caso de enfermedades como la diabetes, la proporción de individuos con diagnóstico oportuno de HTA no ha presentado esta misma tendencia en los últimos seis años (a pesar de que éste es más sencillo y no invasivo) [6].

Las consecuencias adversas de la hipertensión para la salud son complejas ya que muchos de los afectados tienen además otros factores de riesgo que aumentan la probabilidad de infarto al miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal. Entre esos factores de riesgo se encuentran el consumo de tabaco, la obesidad, la hipercolesterolemia y la diabetes mellitus. El tabaquismo aumenta el riesgo de complicaciones de la hipertensión en los afectados.

En 2008 había 1000 millones de fumadores en el mundo y la prevalencia mundial de la obesidad casi se había duplicado desde 1980. La prevalencia mundial de la hipercolesterolemia entre los adultos mayores de 25 años era del 39%, y la de la diabetes del 10% [7].

Alrededor de un 10 a un 15% de los casos de hipertensión tiene su causa en enfermedades como disfunciones renales y desórdenes endocrinos y neurogénicos. Este tipo de hipertensión se denomina hipertensión secundaria y, usualmente, puede ser tratada por métodos directos. El resto de los casos se engloban en lo que se denomina hipertensión primaria, también llamada esencial o idiopática. Este tipo de hipertensión también se caracteriza por la elevación sostenida de la presión arterial, pero no se acompañan de ningún signo patológico, ni está asociada a un factor etiopatogénico establecido [8].

Los principales efectos de la elevación en la presión arterial pueden dividirse en: aquellos que son resultado directo del aumento de presión (hemorragia cerebral, retinopatía,

hipertrofia ventricular izquierda, aneurisma y ruptura vascular), los que resultan de aterosclerosis (resistencia vascular coronaria, cerebral y renal aumentada) y los resultantes de un flujo sanguíneo disminuido e isquemia (infarto del miocardio, trombosis e infarto cerebral). Se ha sugerido que el daño cerebral funcional y la demencia senil pueden ser más comunes en personas hipertensas que en individuos normotensos [9].

1.2.1 PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial (BP por sus siglas en inglés) se mide en milímetros de mercurio (mm Hg) y se registra en forma de un par de números separados por una línea. El primero corresponde a la presión arterial sistólica, la más alta, que se produce cuando el corazón se contrae. El segundo corresponde a la presión arterial diastólica, la más baja, que se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro. La presión arterial normal en un adulto se define como una presión sistólica de 120 mm Hg y una presión diastólica de 80 mm Hg. Sin embargo, los beneficios cardiovasculares de la presión arterial normal se extienden incluso por debajo de esos niveles de presión sistólica (105 mm Hg) y diastólica (60 mm Hg).

La hipertensión se define como una presión sistólica igual o superior a 140 mm Hg y una presión diastólica igual o superior a 90 mm Hg. Los niveles normales de ambas, sistólica y diastólica, son particularmente importantes para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro o los riñones, para la salud y el bienestar en general.

Debido a nuevos datos sobre riesgo de vida, de la hipertensión y el impresionante aumento en el riesgo de complicaciones cardiovasculares asociadas con niveles de la presión arterial que antes se consideraban normales, ha introducido una nueva clasificación por la JNC (Joint National Committee) que incluye el término "pre-hipertensión" para aquellos con presión arterial que van desde 120 hasta 139 mm Hg sistólica y/o diastólica 80-89 mmHg. Esta nueva designación pretende identificar a los individuos en los que la intervención temprana podría reducir la presión arterial mediante la adopción de estilos de vida saludables, y hasta prevenir la hipertensión por completo [10].

Tabla 1.1. Clasificación de la hipertensión con base en la presión arterial [10].

| Categoría de Presión Sanguínea | Sistólica / mmHg (por arriba de) | Diastólica / mm Hg (por debajo de) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Normal | < 120 | < 80 |
| Prehipertensión | 120 – 139 | 80 – 89 |
| Hipertensión (Etapa 1) | 140 – 159 | 90 – 99 |
| Hipertensión (Etapa 2) | ≥160 | ≥ 100 |
| Hipertensión (Crisis) | ≥180 | ≥ 110 |

De acuerdo con la ecuación hidráulica, la presión arterial es directamente proporcional al producto del riego sanguíneo (gasto cardiaco, CO) y la resistencia del paso de la sangre por las arteriolas precapilares (resistencia vascular periférica, PVR):

$$BP = CO \times PVR$$

En términos fisiológicos, la presión sanguínea se mantiene en individuos normales e hipertensos por una regulación momento a momento del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica.

1.2.2 TRATAMIENTO

Si la hipertensión se detecta pronto es posible minimizar el riesgo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal. En algunos casos, los cambios en el modo de vida no bastan para controlar la tensión arterial y son necesarios medicamentos de dispensación con receta. Los medicamentos para la tensión arterial actúan por diferentes vías, como la eliminación del exceso de sal y líquidos del organismo, la disminución de los latidos cardíacos, la relajación y dilatación de los vasos sanguíneos.

No todos los pacientes diagnosticados de hipertensión requieren tratamiento farmacológico, sin embargo, aquellos con riesgo de moderado a alto necesitarán uno o más medicamentos esenciales de estos grupos farmacológicos para reducir el riesgo cardiovascular: diuréticos tiazídicos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes de los canales de calcio de acción prolongada, betabloqueantes, insulina, estatinas y aspirina.

1.2.3 FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

Los fármacos pueden ser sólidos a temperatura ambiente, líquidos o gaseosos. A menudo esta característica determina la mejor vía de administración (intravenosa, intramuscular, oral, etc.). Muchos fármacos orgánicos son ácidos o bases débiles. Este hecho tiene implicaciones muy importantes en la forma en que el cuerpo los metaboliza, ya que las diferencias de pH en los diversos sitios del cuerpo pueden alterar el grado de ionización de tales sustancias [11, 12].

Todos los antihipertensivos actúan y producen sus efectos por interferencia con los mecanismos normales de regulación de la presión arterial. Una clasificación útil de tales agentes los ordena de acuerdo con el sitio de regulación principal o los mecanismos por los que actúan. Debido a los mecanismos de acción comunes, los fármacos dentro de cada categoría tienden a producir una variedad similar de toxicidades [12].

1. **Diuréticos.** Disminuyen la presión sanguínea sobre todo por agotamiento de la reserva de sodio corporal. Al principio, los diuréticos aminoran la presión sanguínea por disminución del volumen sanguíneo y el gasto cardiaco;
2. **Agentes Simpaticolíticos.** Reducen la presión arterial por decremento de la resistencia bascular periférica, inhibición de la función cardiaca y aumento de la acumulación de sangre venosa en vasos de capacitancia. Estos fármacos se subdividen de acuerdo a sus sitios de acción en el arco reflejo simpático: fármacos simpaticolíticos de acción central, antagonistas ganglionares, antagonistas adrenérgicos neuronales, antagonistas de los receptores adrenérgicos α y β .
3. **Vasodilatadores.** Reducen la presión sanguínea por relajación del musculo liso vascular, de tal manera que dilatan así los vasos de resistencia y aumentan también en grados variables la capacitancia. Esta clase de fármacos incluye a los vasodilatadores orales hidralazina y minoxidilo que se usan para el tratamiento externo de largo plazo de la hipertensión; los vasodilatadores parenterales

nitroprusiato, diazóxido y fenoldopam, que se emplean para tratar urgencias hipertensivas; los antagonistas de los conductos de calcio que pueden administrarse en ambas circunstancias; y los nitratos, que se indican sobre todo en la angina de pecho.

- 4. Inhibidores de la angiotensina.** Fármacos que suprimen la producción o acción de la angiotensina y, aminoran la resistencia vascular periférica y el volumen sanguíneo.

1.3 ANTECEDENTES

Desde principios del siglo pasado la búsqueda de un fármaco antiarrítmico ideal fue de gran importancia. La quinidina tuvo un papel fundamental como la droga de elección para el tratamiento crónico de arritmias. La relación entre la acción antimalarial y antiarrítmica no se ha limitado a la quinina y quinidina [13]. A pesar de su popularidad, la quinidina, como todos fármacos antiarrítmicos, tiene varios efectos secundarios dañinos, más notablemente cardiotoxicidad.

La quinidina es un inhibidor de la enzima *CYP2D6* del hígado, por lo que puede causar un aumento en los niveles sanguíneos de la lidocaína, *beta bloqueadores*, *opioides* y algunos antidepresivos. La quinidina puede también inhibir la *glucoproteína P* del hígado, por lo que puede causar que ciertos fármacos de acciones periféricas como la *loperamida* tengan efectos sobre el sistema nervioso central, tales como depresión de los centros respiratorios con la administración conjunta de ambos medicamentos.

Los efectos gastrointestinales de la quinidina incluyen diarrea, náusea y vómitos observados en un tercio a la mitad de los pacientes. La intoxicación con quinidina puede producir síntomas como tinnitus y cinchonismo, caracterizado por dolores de cabeza, sordera y síntomas de congestión cerebral. La trombocitopenia mediada por quinidina es inducida por el sistema inmune y puede conllevar a una púrpura trombocítica. Fiebre y hepatitis han sido reportados en raros casos.

En 1979, un grupo de investigación en China mientras estudiaban las propiedades antimalarial de derivados de la febrifugina, notó a través de ensayos clínicos que la changrolina era efectiva como agente antiarrítmico. Descubrieron que la changrolina exhibió efectos protectores y terapéuticos significativos contra las arritmias inducidas [14]. En 1982, David M. Stout y su grupo de investigación del *American Hospital Supply Corporation, McGaw Park, Illinois*, retomó esta investigación sintetizando una serie de compuestos (derivados estructurales de la changrolina) y probando la existencia de actividad antihipertensiva [15-17].

Para ello, tomaron como base estructural a la changrolina (*figura 1.2*), dividiéndola para su estudio en tres regiones: 1) la región heteroaromática (quinazolina), 2) la región aromática (con el *bis (pirrolidinil-metil)fenol*), 3) la región que une las dos regiones anteriores. Comenzaron su investigación con una modificación sistemática de cada región con el objetivo de determinar que característica de la molécula era necesaria para tener la actividad antiarrítmica. Encontraron que mientras el *bis (pirrolidinil-metil)fenol*, base de la changrolina, parecía ser óptima en esta serie, existía una amplia libertad para el sustituyente heteroarilo para mantener una buena actividad antiarrítmica [15-17].

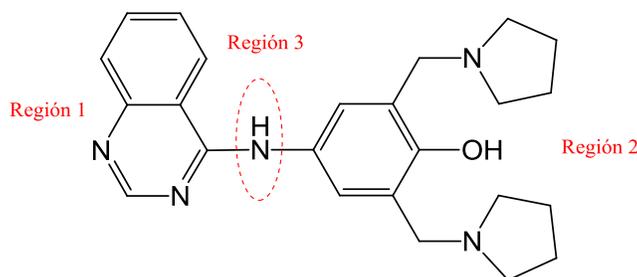


Figura. 1.2. Estructura de la changrolina, tres regiones de importancia para su estudio [15].

El objetivo de esta investigación era encontrar un nuevo compuesto que pudiera ser usado como antihipertensivo, que no tuviera efectos secundarios como lo tenían los medicamentos comercializados en esa época, ya que incluso la changrolina tenía reacciones desfavorables no deseadas.

En 2007, el Dr. Enrique Ángeles y su grupo de investigación sintetizaron algunos compuestos que han mostrado tener efectos cardiovasculares. La síntesis de estos compuestos inicia tomando la molécula de fenol y los anillos de metil-pirrolidina como requisito estructural para tener los efectos antiarrítmicos que mencionó David M. Stout en su publicación, y sustituyendo los anillos de metil-pirrolidina por anillos de metil-morfolina y metil-tiomorfolina, además de probar distintos sustituyentes en la posición *-para* del fenol [2]. En el artículo publicado en 2008, Enrique Ángeles y col. [2] presentan cinco compuestos (*Tabla 1.2*) de una amplia serie de especies sintetizadas, de las cuales destaca el compuesto llamado *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol* o *LQM303* como lo etiquetaron por simplicidad.

En este trabajo E. Ángeles y col. realizan un estudio del efecto hipotensor que tiene cada uno de estos nuevos compuestos sintetizados, y los comparan con el efecto de Captopril, Losartán y Omapatrilat (*Tabla 1.3*), los cuales son fármacos de uso comercial. Las gráficas presentadas en esta publicación muestran los resultados del estudio *efecto-dosis* en la presión sistólica, presión diastólica y presión media de la serie de cinco compuestos sintetizados y los tres fármacos comerciales. Captopril mostró mayor eficiencia y potencia; el compuesto LQM303 mostró una similitud con Captopril en la presión diastólica y presión media, pero difieren en la presión arterial sistólica (*figura 1.3*).

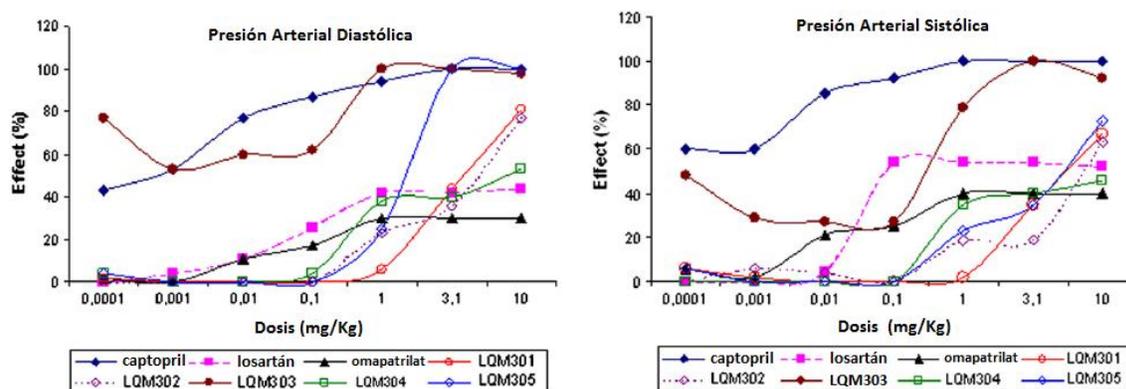


Figura 1.3 Curvas Efecto-Dosis de cinco compuestos tiomorfolinicos, captopril, losartán y omapatrilat (fármacos antihipertensivos). La gráfica muestra la eficacia y potencia en la presión arterial sistólica y diastólica [2].

En los resultados finales de este trabajo mencionan que el LQM303 presenta una de las mejores eficiencias en la reducción de la presión sistólica, así como de la presión diastólica, superando a losartán y omapatrilat.

Tabla 1.2. Estructuras presentadas por E. Ángeles y col. en *European J. of Med. Chem.* **43**, 486-500 (2008).

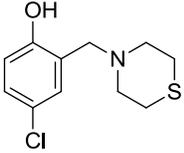
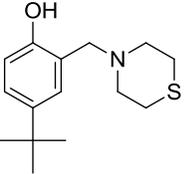
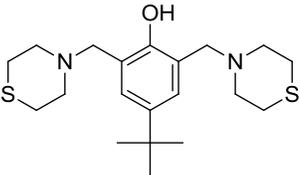
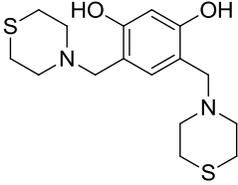
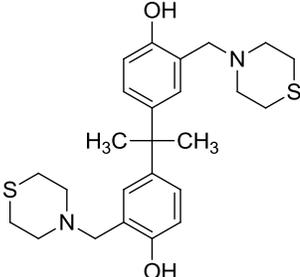
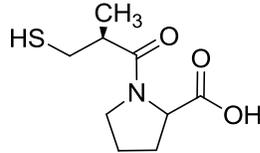
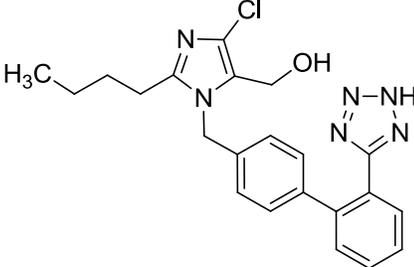
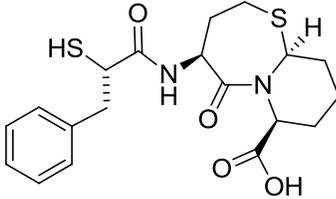
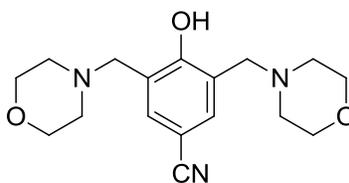
| Nombre | Clave | Estructura |
|--|---------------|--|
| 4-cloro-2-(tiomorfolin-4-ilmetil)fenol | LQM301 |  |
| 4-terbutil-2-(tiomorfolin-4-ilmetil)fenol | LQM302 |  |
| 4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol | <u>LQM303</u> |  |
| 4,6-bis(tiomorfolin-4-ilmetil)1,2,3-bencenotriol | LQM304 |  |
| 4-[1-(4-Hidroxi-3-(tiomorfolin-4-ilmetil)phenil)-1-metiletil]-2-(tiomorfolin-4-ilmetil)fenol | LQM305 |  |

Tabla 1.3. Fármacos antihipertensivos comerciales usados en la comparación con la serie de LQM's sintetizados.

| | |
|-------------|---|
| Captopril |  |
| Losartán |  |
| Omapatrilat |  |

Otro de los compuestos sintetizados de esta serie LQM es el *4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzonitrilo*, mostrado en la *figura 1.4*, al igual que el LQM303, también exhibe propiedades antihipertensivas. El principio de síntesis de este compuesto fue la misma que en el LQM303. Se basó en la región 2 de la changrolina (*Figura 1.2*), sustituyendo los anillos de pirrolidina por anillos de morfolina, y teniendo como sustituyente un grupo nitrilo en la posición *-para* del anillo fenólico. Este compuesto se le llama también LQM314.

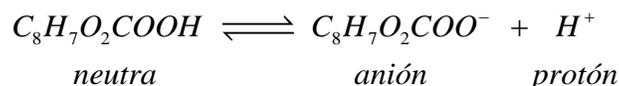


LQM314

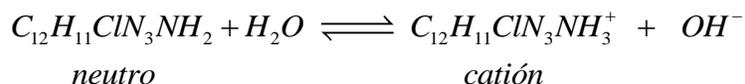
Figura 1.4. LQM314 (4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzonitrilo) [18].

1.4 CONSTANTES DE DISOCIACIÓN ÁCIDA

Los procesos de absorción, distribución y eliminación requieren el paso del fármaco a través de membranas biológicas formadas por una bicapa lipídica. La penetración de los fármacos en el organismo ocurre por varios mecanismos, el más frecuente es la difusión pasiva en medio acuoso o lipídico. En el caso de ácidos y bases débiles, la capacidad para desplazarse de un medio acuoso a uno lipídico o viceversa dependerá de su grado de ionización y de su pK_a . Con respecto a los fármacos, la mejor definición de un ácido débil ($K_a/C_0 < 10^{-2.6}$) es el de una molécula neutra que puede disociarse de forma reversible en un anión y un protón. Por ejemplo, el ácido acetilsalicílico:



Un fármaco que es una base débil puede definirse como una molécula neutra que puede formar un catión al combinarse con un protón. Por ejemplo, la pirimetamina:



La proporción entre la forma liposoluble y la forma hidrosoluble de un ácido o base se puede expresar mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch. La forma del ácido débil unida al protón es la forma neutra (forma no ionizada) más liposoluble, y difundirá libremente hasta que se equilibre a ambos lados de la membrana. La forma ionizada, por ser hidrofílica, no pasará. La ley de acción de masas requiere que estas reacciones se desplacen a la izquierda en un ambiente ácido y a la derecha en un ambiente alcalino. La ecuación de Henderson-Hasselbalch relaciona la proporción de un ácido débil o base débil, con el pK_a de la molécula y el pH del medio [1, 12]:

$$\log \frac{(\textit{Disociada})}{(\textit{No disociada})} = pK_a - pH$$

Con base en esta ecuación confirmamos que cuanto más bajo sea el pH con respecto al pK_a , mayor será la fracción del fármaco en su forma disociada. Como la forma sin carga es la más liposoluble, más porcentaje de un ácido débil se encontrara en la forma liposoluble en un pH ácido, mientras que una mayor proporción de un agente alcalino estará en su forma liposoluble en un pH alcalino [12].

Lo anterior explica la importancia de la determinación de las constantes de acidez de los nuevos compuestos sintetizados con propiedades antihipertensivas, LQM303 y LQM314. Los estudios realizados son un paso importante para la caracterización fisicoquímica de estos compuestos con propiedades farmacológicas.

1.5 COMPLEJOS METÁLICOS

La formación de complejos en disolución acuosa puede identificarse por distintos métodos, de los cuales el ensayo clásico de modificación de las propiedades químicas es solamente uno de ellos, y no muy confiable, puesto que todas las reacciones tienen constantes de equilibrio y las pruebas químicas son solamente una investigación de los valores relativos de dichas constantes. Los métodos físicos (como la investigación de las propiedades coligativas, los espectros electrónicos o vibracionales, la solubilidad, la conductividad o los potenciales de electrodo) son pruebas más fiables y, en circunstancias favorables conducen a valores de constantes de equilibrio de formación de complejos [19].

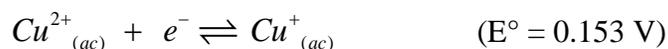
Los ejemplos de complejos que se encuentran al comenzar el estudio de la química contienen un solo ion metálico, el cual se combina con uno o más ligandos aniónicos o neutros. Los complejos neutros suelen ser escasamente solubles en agua, pero frecuentemente son solubles en disolventes orgánicos.

COBRE.

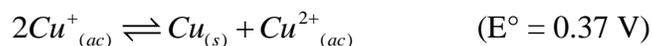
El cobre es considerado uno de los metales más nobles de la primera serie de transición y se puede encontrar en varios lugares. Su mena más común es la *calcopirita* o *pirita de cobre*, $CuFeS_2$, que tiene estructura de la blenda de zinc con los átomos de este reemplazados la

mitad por cobre y la otra mitad por hierro; otros minerales son la *malaquita*, $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)$, *cuprita*, Cu_2O , etc.

El cobre es un metal blando de color rojizo, es un conductor excelente del calor y la electricidad, así como resistente a la corrosión, hay una gran demanda de él como conductor eléctrico y para tuberías de agua. Se utiliza, también, en varias aleaciones que son más tenaces que el propio cobre. El sulfato de cobre (II) se utiliza mucho como fungicida. Se encuentran pequeñas cantidades de cobre en varias enzimas relacionadas con reacciones bioquímicas redox. Los compuestos de cobre son también catalizadores de muchas reacciones inorgánicas y orgánicas en la industria. Los estados de oxidación relevantes en medios biológicos son el cobre (I) (sistema d^{10}) y el cobre (II) (sistema d^9) [19]. La estabilidad relativa de ambos estados de oxidación en disolución acuosa viene determinada por sus valores de potencial:



de acuerdo con ellos, el proceso de dismutación o desprotonación del Cu(I) en agua:



y tiene una constante de equilibrio

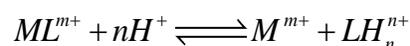
$$K = \frac{[\text{Cu}_{(ac)}^{2+}]}{[\text{Cu}_{(ac)}^+]^2} = \sim 10^6$$

lo que indica que, sólo pueden existir pequeñas concentraciones ($< 10^{-2}$ M) de $\text{Cu}_{(ac)}^+$ debido a su tendencia a dismutarse para dar $\text{Cu}_{(ac)}^{2+}$ y el metal libre [20].

1.5.1 APLICACIONES MÉDICAS DE COMPLEJOS METÁLICOS

Dos de los factores más importantes en los sistemas biológicos son, la estabilidad de los complejos formados y su alto grado de selectividad por el hecho de que todos los iones metálicos están sujetos a interacciones con ligandos neutros presentes en los fluidos corporales, esto con el propósito de almacenamiento, transporte y regulación de iones metálicos que son necesarios en distintos procesos metabólicos. Por lo tanto, para que un ligando sea eficaz en sistemas biológicos, o un complejo de metal conserve su integridad en competencia con los portadores naturales, la estabilidad de dichos complejos debe ser maximizada [21].

Hay que señalar que en la elección de ligandos, la formación del complejo casi siempre está acompañada por el desplazamiento de protones. Por lo tanto, el hecho de que un ligando puede tener una muy alta constante de formación puede ser engañoso si los valores de pKa del ligando son muy altos:



Una manera de saber la forma en la cual estará presente un ligando en el pH biológico es el valor de pM, el cual toma en cuenta la constante de desprotonación del ligando así como los efectos de dilución debido al hecho de que los ligandos y metales en aplicaciones biomédicas están presentes a bajas concentraciones. El valor de pM está definido como el logaritmo negativo de la concentración del ion metálico libre, $(-\log[M])$. Se observa en el equilibrio de arriba que si la concentración del ion hidronio aumenta, la concentración del ion metálico también aumentara (pM disminuye) [21].

Uno de los iones metálicos de mayor interés biomédico es el cobre (Cu^{2+}) debido a que es un mineral elemental en el cuerpo humano. Su papel primordial lo hace necesario para asimilar y utilizar el hierro, y que pueda distribuirse adecuadamente a través del organismo. Además, tiene una variedad de funciones importante entre las que se encuentran la regulación de reacciones enzimáticas. También se requiere para producir ATP, que es el tipo de energía que puede utilizar el cuerpo.

Algunas otras funciones importantes del cobre son [20]:

- ✦ Interviene en la formación de hemoglobina, glóbulos rojos y diversas enzimas.
- ✦ Transporte de O₂.
- ✦ Transferencia de electrones.
- ✦ Degradación de superóxido.
- ✦ Distintas funciones en el ciclo del nitrógeno.

Desde otro enfoque al igual que otros minerales, la presencia de elevadas cantidades de los iones metálicos en el organismo provoca ciertos desórdenes. El cobre en cantidades elevadas puede llegar a resultar muy tóxico y aunado a ciertos padecimientos que aunque son poco comunes, pueden llegar a ser muy riesgosos.

La enfermedad de Wilson (EW) o degeneración hepato-lenticular es consecuencia de una alteración congénita del metabolismo del cobre que comienza con una disminución de su excreción biliar y origina una acumulación progresiva de este metal en prácticamente todos los tejidos del organismo, especialmente en el hígado, el cerebro, la córnea y los riñones.

La EW está claramente causada por la toxicidad del cobre, este metal es un potente tóxico celular cuando está libre, es decir, en forma iónica, por lo que las células se defienden neutralizándolo mediante su unión a proteínas y otros ligandos intracelulares de metales pesados. Cuando el depósito del metal es excesivo, los mecanismos de defensa fracasan y se produce daño tisular. La evolución de este daño, sin tratamiento adecuado, es progresiva, irreversible y fatal [22].

El origen del cobre que se acumula en la EW es la dieta, el balance del cobre en el organismo se realiza a través de un equilibrio entre absorción y excreción. La eliminación urinaria del cobre en condiciones normales es insignificante. La EW no tratada provocará lesiones irreversibles en el hígado y/o el cerebro que ocasionarán la muerte de los pacientes. No obstante, dentro de las enfermedades genéticas raras la EW es tratable.

Clínicamente se manifiesta como una enfermedad hepática, una enfermedad neurológica o neuropsiquiátrica, o como una combinación de ambas. El diagnóstico temprano es fundamental, dado que la lesión que produce en los diferentes órganos es acumulativa [22, 23].

TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento es reducir la cantidad de cobre en los tejidos. Esto se hace mediante un procedimiento de quelación, en donde ciertos medicamentos se pueden fijar al cobre y ayudar a eliminarlo a través de los riñones o los intestinos [24]. El tratamiento debe hacerse de por vida.

Se pueden utilizar los siguientes medicamentos:

- ✦ La penicilamina se fija al cobre y lleva a un aumento en la eliminación de este elemento a través de la orina.
- ✦ La trientina se fija (quela) al cobre e incrementa su excreción a través de la orina.
- ✦ El acetato de zinc bloquea la absorción del cobre en el tracto intestinal.

También se pueden utilizar los suplementos de vitamina E.

Algunas veces, los medicamentos que quelan el cobre, especialmente la penicilamina, pueden afectar el funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso (función neurológica). Existen otros medicamentos y tratamientos bajo investigación que se fijan al cobre sin afectar la función neurológica.

Se han estudiado algunos complejos de cobre (Cu^{2+}) con ligandos que tienen actividad antiarrítmica, y se ha demostrado que algunas de las propiedades más importantes de estos ligandos han mejorado al unirse con el ion metálico. Por ejemplo, la actividad antineoplásica de ciertas drogas ha aumentado, y además se ha observado que la toxicidad disminuyó [25-27].

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVOS GENERALES

Determinar los valores de constantes de acidez del LQM303 *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol* mediante las técnicas de espectrofotometría ultravioleta visible y electroforesis capilar de zona. Estudiar a través del método de relaciones molares las interacciones entre cobre (II) y LQM303; determinar las constantes de complejación de las especies formadas de Cu-LQM. Asimismo, estudiar mediante cálculos teóricos y la teoría de funcionales de la densidad, el mecanismo de desprotonación del LQM303. Además usando la técnica de electroforesis capilar de zona, calcular las constantes de acidez del LQM314 *4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-1-ilmetil)benzocitrilo*.

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los valores de constantes de acidez del LQM303 mediante electroforesis capilar de zona
- Determinar los valores de constantes de acidez del LQM314 mediante electroforesis capilar de zona
- Determinar los valores de constantes de acidez del LQM303 mediante espectroscopia ultravioleta-visible.
- Construir los espectros UV-vis con ayuda de los programas de cómputo “SQUAD” y “MEDUSA”, y comparar con los espectros experimentales.
- Estudio de la formación de complejos Cu(II)-LQM303. Aplicar el método de relaciones molares para proponer una estequiometría de los complejos formados.

- Aplicar el análisis de componentes principales para determinar el número de especies que absorben diferente en el sistema Cu(II)-LQM303.
- Proponer un conjunto de equilibrios válido en SQUAD que describa el comportamiento químico de la formación de complejos.
- Determinación de las constantes de complejación Cu(II)-LQM303
- Construcción de los espectros UV-vis (Cu(II)-LQM303) a partir de las fracciones molares obtenidas con MEDUSA y, comparación con los espectros experimentales.
- Realizar el estudio de formación de complejos de Cu(II)-LQM303 en medio metanólico.
- Determinación de las constantes de complejación Cu(II)-LQM303 en metanol.
- Estudio teórico de la ruta de desprotonación del LQM303 mediante la teoría de funcionales de la densidad. Usando el funcional B3LYP y el conjunto de funciones de base 6-31+G(d).
- Estudio teórico de la ruta de desprotonación del LQM303 mediante la teoría de funcionales de la densidad, con M052X y el conjunto de funciones de base 6-31+G(d,p).
- Determinación del valor de $\log P$ para el LQM314 *4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzoniitrilo* mediante la técnica de extracción líquido-líquido.

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ

2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)

Se utilizó un equipo para electroforesis capilar de zona (CZE) de la marca *Beckman Coulter P/ACE MDQ de CZE* con detector de arreglo de diodos. A continuación se mencionan las condiciones experimentales de trabajo.

TECNICA: CZE (Electroforesis Capilar de Zona)

EQUIPO: “P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System” de Beckman Coulter

INYECCIÓN: hidrodinámica a 1.0 psi/10 s

VOLTAJE: 20 kV

TEMPERATURA: 25°C

CAPILAR: Sílice fundida de 50 μm de diámetro interno

Longitud total de 50.2 cm y

Longitud efectiva de 40 cm

INYECCION DE LA MUESTRA: En vial de 200 μl se colocaron 20 μl de acetona, 40 μl de la disolución de LQM y 140 μl de agua desionizada.

*Cada separación a cada pH se realizó por triplicado.

ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR

Antes de cada actividad experimental, al capilar de sílice se le realizó un acondicionamiento que consistió en:

- 1) lavar con H₂O desionizada durante 5 minutos a 30 psi y 25 °C
- 2) NaOH 0.1 M por 10 min a 30 psi y 25 °C
- 3) NaOH 0.1 M por 10 min a 30 psi y 40 °C
- 4) H₂O por 10 min a 30 psi y 25 °C
- 5) buffer por 10 min a 30 psi y 25 °C

REACTIVOS

Los compuestos LQM303 y LQM314 fueron proporcionados por el laboratorio de química medicinal (LQM) de la FES-Cuautitlán, el cual está dirigido por el Dr. Enrique Ángeles.

El buffer de trabajo en CZE se preparó con H_3PO_4 (85.2%, Baker), CH_3COOH (99.7%, Latiz) y HBO_3 (99.5%, Técnica Química). En la preparación de las soluciones alcalinas se uso NaOH (98%, Baker). Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada (18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) con un equipo Millipore Milli-Q.

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

En la parte experimental se utilizó una disolución buffer tipo Britton-Robinson a diferente pH, recordando que este buffer es una mezcla equimolar de ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4) y ácido acético (CH_3COOH). En un matraz aforado se colocó la cantidad necesaria de cada ácido para obtener una concentración de 0.05 M. El pH de esta solución es aproximadamente 1.9. El análisis se realizó sin imponer la fuerza iónica.

La segunda disolución fue Hidróxido de Sodio 0.5 M que será la base fuerte con la cual ajustaremos el pH deseado. La solución de hidróxido de sodio se valoró con Ftalato ácido de potasio (estándar primario), utilizando como indicador fenolftaleína al 1%.

Se preparó la solución stock del compuesto LQM303. Para esta solución se disolvieron 5 mg de la muestra (LQM303) en 500 μL de HCl 1.0 M y se aforó con agua desionizada en un matraz de 5 mL. Así, se tiene una solución $[\text{LQM303}] = 2.6 \times 10^{-4}$ M.

2.1.2 PARTE EXPERIMENTAL ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Para la determinación espectrofotométrica de las constantes de acidez del LQM303 *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol* se utilizó un equipo Perkin-Elmer, modelo *Lambda 950 UV-Vis*, con una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico.

1) $T = 25^{\circ}\text{C}$; $I = 0.05 \text{ M}$. En la parte experimental se realizó la valoración de una solución de LQM303 disuelto en HCl 0.1 M. La solución stock de LQM303 se preparó disolviendo 5 mg en 50 mL de HCl 0.1 M. Se utilizó como valorante una solución de NaOH 0.1 M. Se valoró una alícuota de 30 mL de la solución stock. Esta valoración se llevó a cabo en una celda termostatada con agitación constante. Para cada adición de NaOH se obtuvo el espectro UV-vis correspondiente y el valor de pH. Los espectros de absorción se obtuvieron en un intervalo de longitud de onda entre 220 y 360 nm.

2) $T = 37^{\circ}\text{C}$; $I = 0.15 \text{ M}$. La solución de trabajo del LQM303 se preparó disolviendo 10 mg en 100 mL de HCl 0.01 M. Esta solución tiene una concentración de $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Se usa NaOH 0.01 M como valorante. En ambas soluciones se impone la fuerza iónica agregando la cantidad necesaria de NaCl para tener una concentración total de Na^+ de 0.15 M. Esta valoración se llevó a cabo en una celda termostatada Pyrex con agitación constante. Se obtuvo el espectro UV-vis para cada adición de NaOH en el intervalo de longitud de onda entre 200 y 500 nm.

Los valores de pH se midieron con un potenciómetro PHM240 (± 0.001 de resolución) equipado con un electrodo de pH combinado Radiometer Analytical Ag/AgCl pHC3001-8. El pH de la solución se corrigió por eficiencia de la celda con la ecuación siguiente:

$$pH_{\text{corregido}} = pH_{\text{observado}} + \left[\frac{pH_{\text{calibracion}} - pH_{\text{observado}}}{pH_{\text{calibracion}}} \right] \cdot Ef \quad (1)$$

Ef es un parámetro empírico relacionado con la eficiencia potenciométrica de la celda que tienden a cero, mientras que la eficiencia de la celda tienden a 100% [28]. Wescott y Bates propusieron un método para el pH adecuado, que da resultados similares a la ecuación 3 [29, 30].

2.1.3 ESTABILIDAD DEL LQM303

En general, el compuesto LQM303 pretende ser catalogado en un futuro como fármaco, por lo cual necesita cumplir con ciertas características básicas. Una de estas características es la estabilidad, la cual se define como la capacidad de un producto farmacéutico para conservar sus propiedades físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación. A continuación se mencionan algunas características sobre estabilidad en medicamentos.

El término estabilidad aplicado a un medicamento se refiere a la capacidad de éste para mantener sus características originales. El objetivo fundamental de los estudios de estabilidad es conseguir por un lado un tiempo de vida útil grande, y por otro poseer un conocimiento estadísticamente válido de la fecha de vencimiento.

Por otra parte, en la alteración de un medicamento se pueden tener tres tipos de inestabilidad [31]:

- a) Inestabilidad física.- sucede cuando se alteran las características físicas de las formas farmacéuticas. Son ejemplos de este tipo de inestabilidad, el aumento de tiempo de desintegración de comprimidos, la pérdida de efervescencia de comprimidos efervescentes, el aumento de la temperatura de fusión de supositorios, la separación de dos fases en una emulsión, la modificación de color de unas grageas, entre otros.
- b) Inestabilidad biológica.- se presenta cuando se forman gérmenes microbianos (bacterias, hongos, levaduras) en el seno de un medicamento. La alteración del medicamento por esta vía puede conducir a un aumento de la toxicidad e intolerancia local.
- c) Inestabilidad química.- sucede cuando se produce la degradación de un principio activo a través de una reacción química, con la consiguiente disminución de su concentración en el medicamento y aparición de productos de descomposición. Las vías por las que transcurre la inestabilidad química son: hidrólisis, oxidación, fotólisis, isomerización, etc.

Como se mencionó anteriormente, existen varios aspectos que deben tomarse en cuenta para considerar a un compuesto como estable, en nuestro caso, la inestabilidad química será nuestro punto de interés ya que de esto dependerá que tan factible sea obtener las propiedades fisicoquímicas del LQM303.

El hecho de que el LQM303 sea estable químicamente en el tiempo nos da la posibilidad de tener resultados más confiables. Ya que la inestabilidad transcurrirá muy lentamente permitiendo el análisis, con la certeza que no está ocurriendo una degradación del compuesto. Lo anterior se concluye debido a que la señal espectrofotométrica que tiene el LQM303 no se modifica significativamente, ni la forma del espectro UV-vis, ni la concentración inicial en un intervalo de tiempo mayor a 138 h.

Tabla 2.1. Absorbancia del LQM303 a través del tiempo.
 Las soluciones de trabajo están en medio ácido de HClO₄ 0.1 M.

| No. | A (286nm) | tiempo (min) | tiempo (h) | % Error Rel. |
|-----|-----------|--------------|------------|--------------|
| 1 | 0.7447 | 0 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | 0.7477 | 10 | 0.17 | 0.40 |
| 3 | 0.7473 | 20 | 0.33 | 0.35 |
| 4 | 0.7479 | 30 | 0.50 | 0.43 |
| 5 | 0.7513 | 40 | 0.67 | 0.88 |
| 6 | 0.7523 | 50 | 0.83 | 1.02 |
| 7 | 0.7513 | 60 | 1.00 | 0.89 |
| 8 | 0.7459 | 70 | 1.17 | 0.16 |
| 9 | 0.7475 | 80 | 1.33 | 0.37 |
| 10 | 0.7524 | 142 | 2.37 | 1.03 |
| 11 | 0.7525 | 201 | 3.35 | 1.04 |
| 12 | 0.7614 | 561 | 9.35 | 2.25 |
| 13 | 0.7661 | 2001 | 33.35 | 2.87 |
| 14 | 0.7727 | 2613 | 43.55 | 3.76 |
| 15 | 0.7788 | 2631 | 43.85 | 4.59 |
| 16 | 0.7749 | 8316 | 138.60 | 4.06 |

En la *tabla 2.1* se muestra el porcentaje de error relativo sobre los valores de absorbancia medidos. Con estos valores se puede ver que el máximo error cometido, en un tiempo de 138 h, es menor al 5%. Lo que asegura un amplio intervalo de tiempo después de preparadas las soluciones de trabajo del LQM303. En las *figuras 2.1* y *2.2* se presentan los valores de absorbancia para una solución de LQM303 en medio ácido, la cual se monitoreó a través de tiempo, sin notar un descenso significativo de la absorbancia. La *figura 2.1* corresponde a un intervalo de tiempo hasta 180 minutos. En la *figura 2.2* se tienen valores de absorbancia tomados para la solución de LQM303 en un intervalo de 0 a 138 horas.

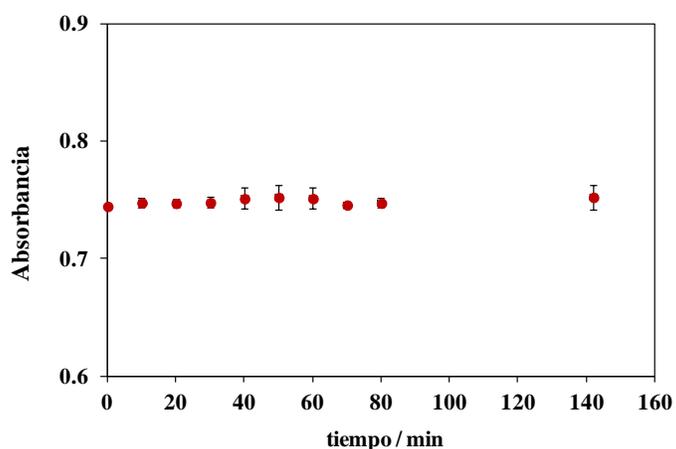


Figura 2.1. Absorbancia en función del tiempo (minutos) del LQM303 en HClO_4 0.1 M.

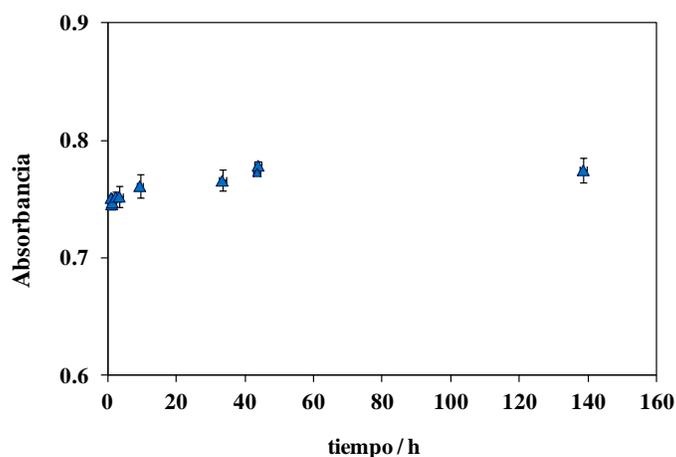
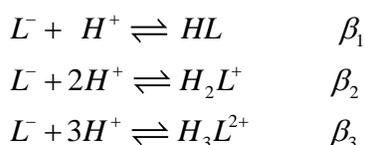


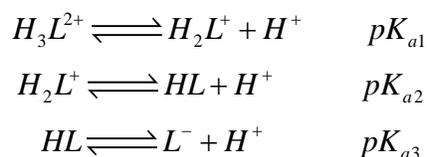
Figura 2.2. Absorbancia en función del tiempo (horas) del LQM303 en HClO_4 0.1 M.

2.2 MODELO QUÍMICO PARA EL CÁLCULO DE pKa

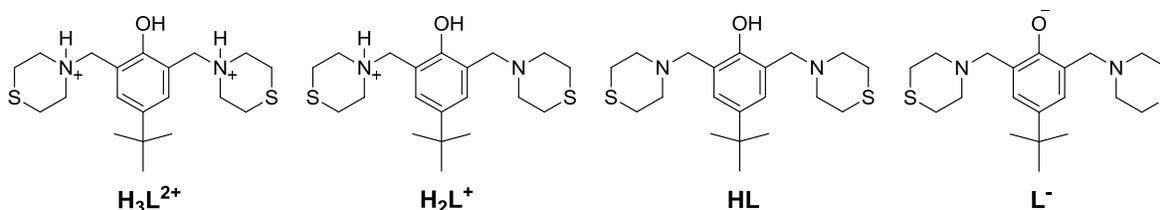
Hay algunas propiedades fisicoquímicas o respuestas a una perturbación que, en condiciones controladas, tienen un comportamiento lineal con la concentración de las especies que los producen. Si las especies están relacionadas a través de un equilibrio químico rápido o de un cambio cinético, la respuesta general puede ser entendida como la media ponderada de la contribución de todas las especies presentes, con un peso igual a la fracción molar de las especies. Por ejemplo, si tenemos un sistema triprótico relacionado con los equilibrios de formación:



Los cuales corresponden a los equilibrios sucesivos de disociación ácida



en donde se definen las especies de LQM como:



Sabemos que la ecuación de la fracción molar de la especie L depende de la concentración de pH, entonces tenemos:

$$f_L = \frac{[L]}{[L] + [LH] + [LH_2]} \quad (2)$$

A partir de la ecuación (2) encontramos la fracción molar de cada especie del LQM, la cual se representa en las siguientes ecuaciones.

$$f_0 = f_L \equiv \frac{[L^-]}{[L']} = \left(\frac{1}{1 + \beta_1 [H^+] + \beta_2 [H^+]^2 + \beta_3 [H^+]^3} \right) \quad (3)$$

En donde $[L']$ representa la suma de las concentraciones de las especies presentes en el sistema.

$$\begin{aligned} f_1 = f_{HL} &\equiv \frac{[HL]}{[L']} = f_0 \beta_1 [H^+] \\ f_2 = f_{H_2L^+} &\equiv \frac{[H_2L^+]}{[L']} = f_0 \beta_2 [H^+]^2 \\ f_3 = f_{H_3L^{2+}} &\equiv \frac{[H_3L^{2+}]}{[L']} = f_0 \beta_3 [H^+]^3 \end{aligned} \quad (4)$$

Así, la fracción de la especie dada por las ecuaciones 3 y 4 representan el peso (o contribución) en la media ponderada de alguna propiedad. Para este caso, se espera tener cuatro contribuciones correspondientes a cada una de las especies presentes.

Inicialmente en una hoja de cálculo de Excel, se construye un modelo teórico que describe el comportamiento de la movilidad electroforética en función del pH, tomando en cuenta la contribución de cada especie del LQM a la movilidad efectiva [32] tenemos la siguiente ecuación que define la movilidad electroforética efectiva del LQM303:

$$u_{L'} = u_{L^-} f_{L^-} + u_{HL} f_{HL} + u_{H_2L^+} f_{H_2L^+} + u_{H_3L^{2+}} f_{H_3L^{2+}} \quad (5)$$

En la ecuación 6 se presenta la forma general de expresar la ecuación (5) tomando en cuenta que la movilidad electroforética de una especie neutra es cero:

$$u_L = \frac{u_L + u_{H_2L^+} \left[10^{(pK_{a2} + pK_{a3} - 2pH)} \right] + u_{H_3L^{2+}} \left[10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)} \right]}{1 + 10^{(pK_{a3} - pH)} + 10^{(pK_{a2} + pK_{a3} - 2pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)}} \quad (6)$$

Finalmente con la ecuación 6 construimos el modelo de movilidad electroforética en función del pH. En la *figura 2.3* se observa el comportamiento de la movilidad electroforética de un ácido triprótico. En este caso se utilizaron valores de pK_a para el compuesto LQM351, estos valores están reportados en la tabla 3 del artículo de *Islas-Martínez y col* [28].

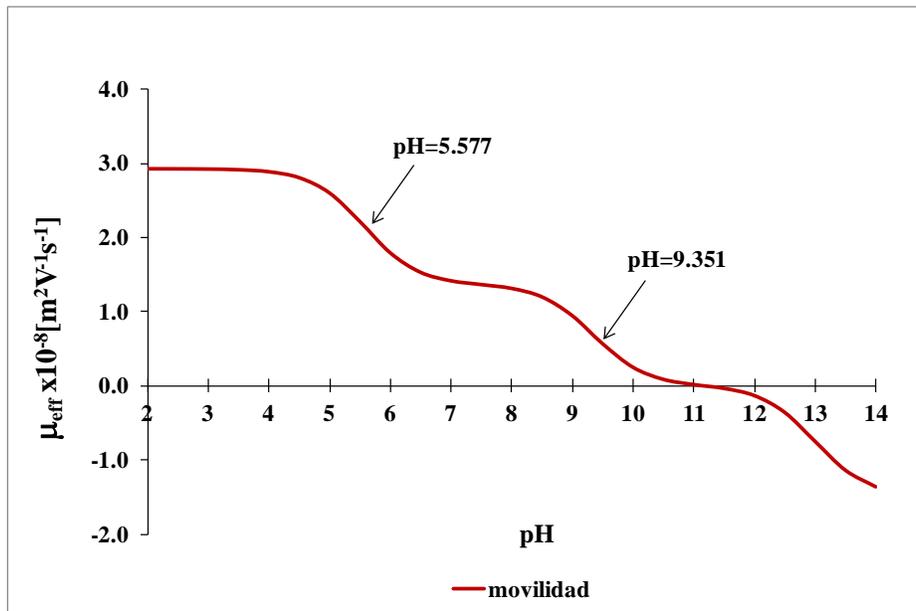


Figura 2.3. Curva teórica de movilidad como función de pH. En el modelo se utilizaron los valores de $pK_{a1}=5.577$, $pK_{a2}=9.351$ y $pK_{a3}>12$; los cuales son mencionados en el artículo de *Islas-Martínez*.

2.3 MODELO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Para esta determinación se propone un modelo teórico basado en la ley de Beer-Lambert y la ley de aditividad que son el fundamento de nuestro análisis. En este caso se toma en cuenta la contribución de cada especie presente de LQM303. Así, la absorbancia del sistema, a una longitud de onda (A^λ) y longitud de paso óptico dados (l):

$$A^{(\lambda)} = A_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} + A_{H_2L^+}^{(\lambda)} + A_{HL}^{(\lambda)} + A_{L^-}^{(\lambda)}$$

$$A^{(\lambda)} = \varepsilon_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} l [H_3L^{2+}] + \varepsilon_{H_2L^+}^{(\lambda)} l [H_2L^+] + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} l [HL] + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)} l [L^-]$$

sustituyendo la concentración de las ecuaciones (4), tenemos:

$$A^{(\lambda)} = \varepsilon_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} f_3 [L'] + \varepsilon_{H_2L^+}^{(\lambda)} f_2 [L'] + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} f_1 [L'] + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)} f_0 [L']$$

$$A^{(\lambda)} = \left(\varepsilon_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} f_3 + \varepsilon_{H_2L^+}^{(\lambda)} f_2 + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} f_1 + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)} f_0 \right) l \cdot [L'] \quad (7)$$

Así, de manera análoga a la sección anterior, la ecuación 7 demuestra que la absorbancia o el coeficiente de absorptividad molar de L' puede ser escrita como la media ponderada de las fracciones molares de todas las especies del sistema. En base a lo anterior se grafica la absorbancia medida a cierta longitud de onda $A^{(\lambda)}$ en función del pH. Para esto se construyó una hoja de cálculo utilizando las ecuaciones 3, 4 y 7. En esta hoja de cálculo se pueden modificar los valores de pK_a , así como los coeficientes de absorptividad molar de cada especie presente en el sistema y la concentración inicial del compuesto, *figura 2.4*.

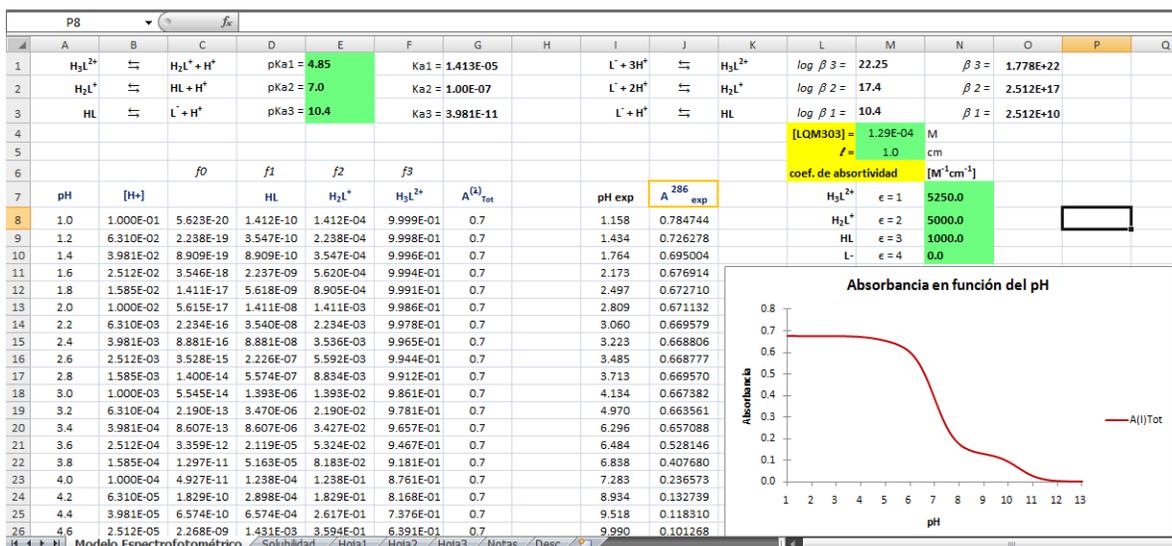


Figura 2.4. Hoja de cálculo de Excel para el modelo espectrofotométrico de un sistema triprotico.

2.4 DETERMINACIÓN DE pK_a POR CZE

A continuación se presenta el cálculo de los valores de pK_a del LQM303, *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol*, por electroforesis capilar de zona (CZE). También se presentan los resultados para la determinación de las constantes de acidez del LQM314, *4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzotrilo*.

2.4.1 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM303 (T = 25 °C; I = 0.05 M)

En la *tabla 2.2* se presenta la serie de soluciones de trabajo preparadas con el buffer Britton-Robinson.

Tabla 2.2. Valores de pH medido experimentalmente para las soluciones buffer utilizadas.

| Solución | pH_{exp} | Solución | pH_{exp} |
|----------|--------------|----------|--------------|
| 1 | 3.520 | 7 | 5.107 |
| 2 | 3.907 | 8 | 5.390 |
| 3 | 4.072 | 9 | 5.621 |
| 4 | 4.343 | 10 | 6.040 |
| 5 | 4.582 | 11 | 6.502 |
| 6 | 4.870 | 12 | 7.013 |

Se obtienen los electroferogramas *figuras 2.5 y 2.6*, y se determina el tiempo de migración a cada pH. En las figuras se observan dos señales, una perteneciente al LQM y la otra señal del marcador de flujo electroosmótico (acetona). El primer pico que aparece en un menor tiempo de migración corresponde a la especie catiónica del LQM303. El segundo pico corresponde al marcador de flujo. A medida que aumenta el pH, la movilidad electroosmótica también aumenta, debido a esto, los tiempos de migración son menores si nos desplazamos hacia valores de pH básicos. Es importante recordar que no se trabajó con valores de pH mayores a 7 debido a la formación de un precipitado.

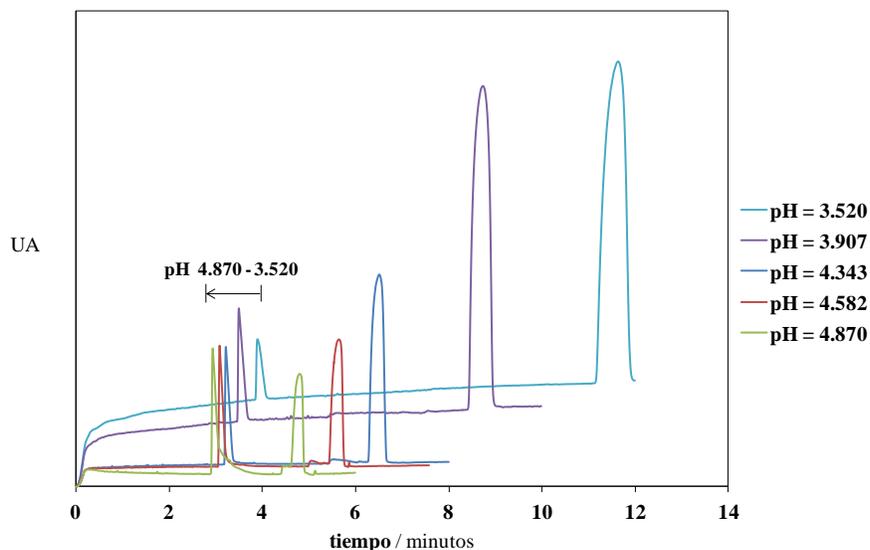


Figura 2.5. Electroferograma del LQM303 de la primera repetición del estudio por triplicado.

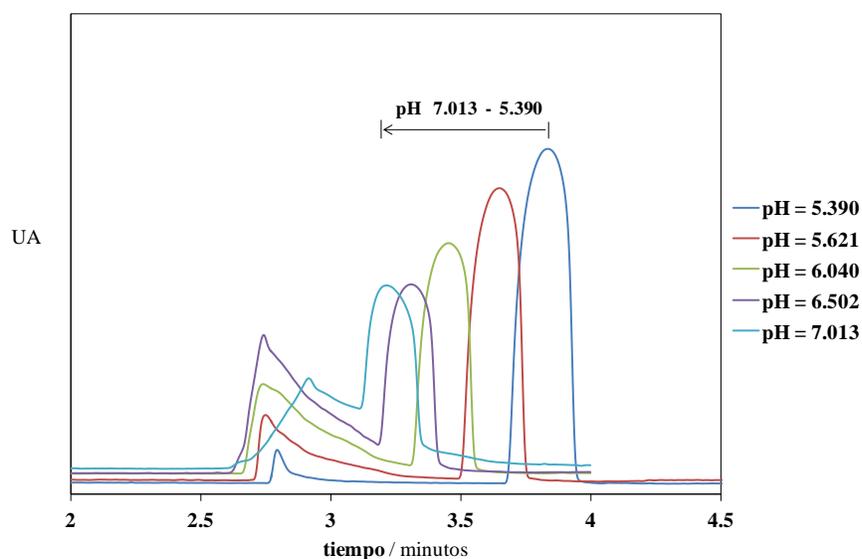


Figura 2.6. Electroferograma del LQM303 para la primera repetición del estudio por triplicado.

En la *tabla 2.3* se presentan los tiempos de migración de las especies de LQM; la *tabla 2.4* contiene los tiempos de migración del marcador de flujo (acetona). Estos tiempos corresponden al punto de absorbancia máxima a una longitud de onda de 264nm, recordando que se realizó un estudio por triplicado para comprobar la repetibilidad de los resultados. Como se observa en las *tablas 2.3* y *2.4*, dicha repetibilidad es baja a valores de pH ácidos ya que el flujo electroosmótico en estos puntos es bajo debido a la baja ionización de los grupos silanol que recubre la superficie del capilar (ver Apéndice B).

Tabla 2.3. Tiempo de migración (en minutos) del LQM303 a diferente pH.

| Soln. | pH | $t_m 1$ | $t_m 2$ | $t_m 3$ |
|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1 | 3.520 | 3.554 | 3.767 | 3.892 |
| 2 | 3.907 | 3.492 | 3.521 | 3.538 |
| 3 | 4.072 | 3.408 | 3.392 | 3.396 |
| 4 | 4.343 | 3.213 | 3.192 | 3.175 |
| 5 | 4.582 | 3.079 | 3.046 | 3.021 |
| 6 | 4.870 | 2.933 | 2.896 | 2.888 |
| 7 | 5.107 | 2.892 | 2.854 | 2.838 |
| 8 | 5.390 | 2.792 | 2.771 | 2.758 |
| 9 | 5.621 | 2.746 | 2.725 | 2.725 |
| 10 | 6.040 | 2.738 | 2.717 | 2.704 |
| 11 | 6.502 | 2.742 | 2.704 | 2.692 |
| 12 | 7.013 | 2.917 | 2.904 | 2.892 |

Tabla 2.4. Tiempo de migración (en minutos) del marcador de flujo electroosmótico (acetona).

| Soln. | pH | $t_{eo 1}$ | $t_{eo 2}$ | $t_{eo 3}$ |
|-------|-------|------------|------------|------------|
| 1 | 3.520 | 8.854 | 10.509 | 11.638 |
| 2 | 3.907 | 8.742 | 9.063 | 9.188 |
| 3 | 4.072 | 7.958 | 7.917 | 7.921 |
| 4 | 4.343 | 6.508 | 6.354 | 6.379 |
| 5 | 4.582 | 5.642 | 5.529 | 5.467 |
| 6 | 4.870 | 4.804 | 4.713 | 4.696 |
| 7 | 5.107 | 4.358 | 4.292 | 4.263 |
| 8 | 5.390 | 3.833 | 3.808 | 3.796 |
| 9 | 5.621 | 3.646 | 3.617 | 3.608 |
| 10 | 6.040 | 3.454 | 3.425 | 3.400 |
| 11 | 6.502 | 3.308 | 3.279 | 3.279 |
| 12 | 7.013 | 3.217 | 3.213 | 3.208 |

En seguida se calculan las movilidades, aparente (u_{ap}) y electroosmótica (u_{eo}), para cada tiempo de migración, y se obtiene el promedio de los tres valores de movilidad a cada pH. Estas movilidades se calculan sustituyendo los tiempos de migración en las siguientes ecuaciones.

$$\text{movilidad aparente: } u_{ap} = \frac{L_d \cdot L_t}{V \cdot t_m} \quad (8)$$

$$\text{movilidad electroosmótica: } u_{eo} = \frac{L_d \cdot L_t}{V \cdot t_{eo}}$$

L_d : longitud efectiva del capilar (del “inlet” al detector) [m]

L_t : longitud total del capilar [m]

t_m : tiempo de migración [s]

t_{eo} : tiempo de migración del flujo electroosmótico [s]

V : voltaje aplicado en la separación [V]

Tabla 2.5. Movilidad aparente para el análisis por triplicado. Las dos columna a la derecha corresponden al valor promedio de la movilidad aparente y su desviación estándar.

| Solución | $1u_{ap}$ | $2u_{ap}$ | $3u_{ap}$ | u_{ap} (promedio) | Desviación Est. |
|----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|-----------------|
| 1 | 4.708E-08 | 4.442E-08 | 4.300E-08 | 4.483E-08 | 2.072E-09 |
| 2 | 4.792E-08 | 4.753E-08 | 4.730E-08 | 4.758E-08 | 3.144E-10 |
| 3 | 4.909E-08 | 4.934E-08 | 4.928E-08 | 4.924E-08 | 1.255E-10 |
| 4 | 5.209E-08 | 5.243E-08 | 5.270E-08 | 5.241E-08 | 3.082E-10 |
| 5 | 5.434E-08 | 5.494E-08 | 5.539E-08 | 5.489E-08 | 5.262E-10 |
| 6 | 5.704E-08 | 5.778E-08 | 5.795E-08 | 5.759E-08 | 4.819E-10 |
| 7 | 5.787E-08 | 5.863E-08 | 5.897E-08 | 5.849E-08 | 5.652E-10 |
| 8 | 5.994E-08 | 6.039E-08 | 6.066E-08 | 6.033E-08 | 3.658E-10 |
| 9 | 6.094E-08 | 6.141E-08 | 6.141E-08 | 6.125E-08 | 2.690E-10 |
| 10 | 6.113E-08 | 6.159E-08 | 6.188E-08 | 6.153E-08 | 3.805E-10 |
| 11 | 6.103E-08 | 6.188E-08 | 6.217E-08 | 6.169E-08 | 5.894E-10 |
| 12 | 5.737E-08 | 5.762E-08 | 5.787E-08 | 5.762E-08 | 2.480E-10 |

Tabla 2.6. Movilidad electroosmótica para el análisis por triplicado. Las dos columnas a la derecha corresponden al valor promedio de la movilidad electroosmótica y su desviación estándar.

| Solución | $1u_{eo}$ | $2u_{eo}$ | $3u_{eo}$ | u_{eo} (promedio) | Desviación Est. |
|----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|-----------------|
| 1 | 1.890E-08 | 1.592E-08 | 1.438E-08 | 1.640E-08 | 2.297E-09 |
| 2 | 1.914E-08 | 1.846E-08 | 1.821E-08 | 1.861E-08 | 4.805E-10 |
| 3 | 2.103E-08 | 2.114E-08 | 2.113E-08 | 2.110E-08 | 6.094E-11 |
| 4 | 2.571E-08 | 2.633E-08 | 2.623E-08 | 2.609E-08 | 3.344E-10 |
| 5 | 2.966E-08 | 3.026E-08 | 3.061E-08 | 3.018E-08 | 4.805E-10 |
| 6 | 3.483E-08 | 3.551E-08 | 3.563E-08 | 3.532E-08 | 4.322E-10 |
| 7 | 3.839E-08 | 3.899E-08 | 3.926E-08 | 3.888E-08 | 4.420E-10 |
| 8 | 4.365E-08 | 4.394E-08 | 4.408E-08 | 4.389E-08 | 2.195E-10 |
| 9 | 4.590E-08 | 4.627E-08 | 4.637E-08 | 4.618E-08 | 2.503E-10 |
| 10 | 4.844E-08 | 4.886E-08 | 4.921E-08 | 4.884E-08 | 3.862E-10 |
| 11 | 5.058E-08 | 5.103E-08 | 5.103E-08 | 5.088E-08 | 2.597E-10 |
| 12 | 5.202E-08 | 5.209E-08 | 5.215E-08 | 5.209E-08 | 6.756E-11 |

Los valores promedio de movilidad aparente y movilidad electroosmótica nos servirán para calcular la movilidad efectiva del LQM303 (tabla 2.7) mediante la siguiente ecuación.

$$\text{movilidad efectiva: } u_{eff} = u_{ap} - u_{eo} \quad (9)$$

Tabla 2.7. Valores finales de movilidad efectiva para el LQM303 a T=25°C.

| Solución | pH | u_{eff} | Desviación Estándar |
|----------|-------|------------------|---------------------|
| 1 | 3.520 | 2.843E-08 | 4.369E-09 |
| 2 | 3.907 | 2.898E-08 | 7.949E-10 |
| 3 | 4.072 | 2.814E-08 | 1.865E-10 |
| 4 | 4.343 | 2.631E-08 | 6.425E-10 |
| 5 | 4.582 | 2.471E-08 | 1.007E-09 |
| 6 | 4.870 | 2.227E-08 | 9.141E-10 |
| 7 | 5.107 | 1.961E-08 | 1.007E-09 |
| 8 | 5.390 | 1.644E-08 | 5.852E-10 |
| 9 | 5.621 | 1.507E-08 | 5.193E-10 |
| 10 | 6.040 | 1.269E-08 | 7.666E-10 |
| 11 | 6.502 | 1.081E-08 | 8.491E-10 |
| 12 | 7.013 | 5.531E-09 | 3.156E-10 |

Se realiza una comparación de los resultados experimentales con el modelo presentado en la sección 2.2 con el objetivo de comprobar la validez del modelo. En este modelo, construido en una hoja de cálculo de Excel, se iteran los valores de pK_a con el objetivo de hacer coincidir el comportamiento de la curva teórica con los datos experimentales. De esta forma, mediante un ajuste gráfico podemos obtener las constantes de acidez del compuesto LQM303. Los valores resultantes de este ajuste se presentan en la *tabla 2.8*.

Tabla 2.8. Resultados del ajuste propuesto (ec.5) con la hoja de cálculo de Excel.

| | pK_{ai} | $u_{effi}/10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ |
|---|-----------|--|
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 4.85 | |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 7.10 | |
| No determinable por CZE | | |
| H_3L^{2+} | | 3.10 |
| H_2L^+ | | 1.21 |
| HL | | 0.00 |

La curva de movilidad electroforética en función del pH descrita por la ecuación 5 (sección 2.2) y los datos experimentales se presentan en la *figura 2.7*.

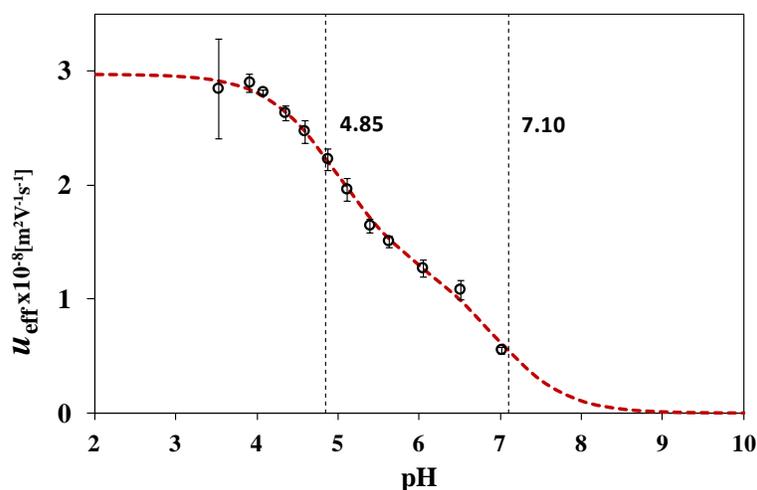


Figura 2.7. Curva de movilidad del LQM303, la línea punteada muestra el comportamiento del modelo descrito por la ecuación 5. Los puntos pertenecen a la movilidad efectiva del LQM calculada experimentalmente.

Con los valores propuestos en la *tabla 2.8* para el pK_{a1} , pK_{a2} y, con la definición de fracciones molares se construye el diagrama de distribución que se muestra en la *figura 2.8*.

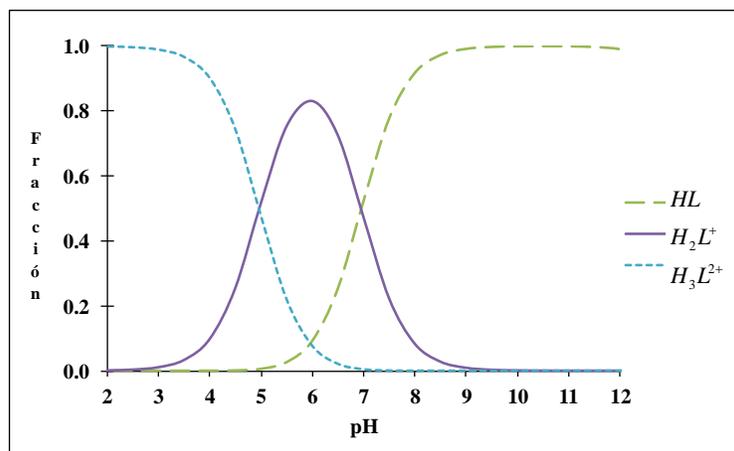


Figura 2.8 Diagrama de distribución para un ácido triprótico con: $pK_{a1} = 4.85$, $pK_{a2} = 7.10$ y $pK_{a3} \gg 12$.

En los párrafos anteriores se describió es una forma sencilla de estimar los valores de pK_a a través de un ajuste visual en una hoja de cálculo. Ahora para una determinación con una mayor exactitud de los valores de pK_a se realizó el refinamiento de datos experimentales con el programa de cómputo SQUAD [33]. En la *tabla 2.9*, se reportan los valores de las constantes de acidez y su respectiva incertidumbre obtenidos de este ajuste.

Tabla 2.9. Valores de pK_a y movilidad efectiva (u_{eff}) refinados con SQUAD, del LQM303 a $T=25^\circ\text{C}$ y $I=0.05\text{M}$. σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión (que tiene unidades de movilidad electroforética) y U toma en cuenta la suma de cuadrados (que tiene unidades de movilidad electroforética al cuadrado).

| LQM303 $\sigma_{reg} = 0.056$; $U = 0.057$ | | |
|---|--|---|
| | $pK_{ai} \pm \sigma$ | $u_{effi} / 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm \sigma$ |
| H_3L^{2+} | 4.966 ± 0.019 | 2.974 ± 0.028 |
| H_2L^+ | 6.958 ± 0.074 | 1.283 ± 0.032 |
| HL | No determinable por CZE | 0.0 |

La curva de movilidad en función del pH se muestra en la *figura 2.9*, así como los valores finales de las constantes de acidez determinadas con SQUAD. En la parte superior de la figura encontramos las especies predominantes del LQM303.

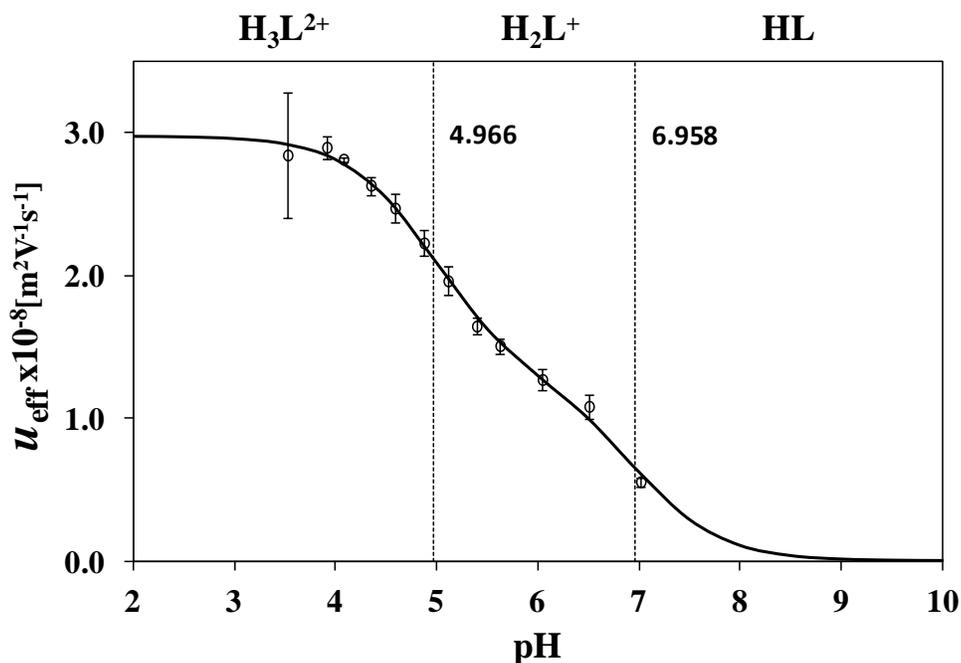


Figura 2.9. Curva de movilidad efectiva del LQM303 a $T=25^\circ\text{C}$ y $I=0.05\text{M}$, la línea continua muestra el comportamiento del modelo teórico de movilidad usando los valores de pK_a determinados con SQUAD. Los puntos pertenecen a la movilidad efectiva experimental del LQM.

En principio, es importante mencionar que al trabajar en electroforesis capilar con el compuesto LQM303, no fue posible hacer el análisis a pH mayor a 7, ya que se forma un precipitado y no se puede obtener ninguna señal. Para tratar de solucionar esto, se inyectó la muestra por el lado más corto del capilar para lograr obtener una señal de la especie aniónica, sin embargo, solo podemos observar una sola señal que pertenece al marcador de flujo (acetona). Posteriormente se utilizará otra técnica experimental distinta para comprobar los resultados obtenidos mediante electroforesis capilar de zona.

2.4.2 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM303 (T = 37 °C; I = 0.05 M)

Se obtuvieron los electroferogramas de un grupo de soluciones de LQM a diferente pH. Cada solución se analizó por triplicado y se obtuvieron los tiempos de migración del marcador de flujo (t_{eo}) y del LQM (t_m). La movilidad electroosmótica (u_{eo}) y aparente (u_{ap}) se obtuvieron mediante las ecuaciones 8 y 9 mencionadas en la sección anterior.

$$u_{ap} = \frac{V_{neta}}{E} = \frac{l \cdot L}{V \cdot t_m} \quad ; \quad u_{eo} = \frac{V_{neutra}}{E} = \frac{l \cdot L}{V \cdot t_{eo}} \quad ; \quad u_{eff} = u_{ap} - u_{eo} = u_{LQM}$$

El conjunto final de valores de movilidad efectiva del LQM303 se muestra en la *tabla 2.10*. Cada valor de movilidad efectiva corresponde al promedio de las tres repeticiones realizadas de cada punto experimental.

Tabla 2.10. Valores promedio de movilidad efectiva para el LQM303 a T=37 °C y su desviación estándar.

| Solución | pH | u_{eff} | Desviación Estándar |
|----------|-------|-----------|---------------------|
| 1 | 3.803 | 3.011E-08 | 3.390E-09 |
| 2 | 4.045 | 2.935E-08 | 9.822E-11 |
| 3 | 4.240 | 2.824E-08 | 5.113E-10 |
| 4 | 4.688 | 2.425E-08 | 1.595E-09 |
| 5 | 4.956 | 2.170E-08 | 1.477E-09 |
| 6 | 5.248 | 1.954E-08 | 1.266E-09 |
| 7 | 5.498 | 1.758E-08 | 5.029E-10 |
| 8 | 6.137 | 1.448E-08 | 6.100E-10 |
| 9 | 6.844 | 8.567E-09 | 6.088E-10 |
| 10 | 6.934 | 7.968E-09 | 4.713E-10 |
| 11 | 7.139 | 5.446E-09 | 4.959E-10 |

Los valores de movilidad efectiva que dan origen a los promedios presentados en la *tabla 2.10* son los datos usados en el refinamiento realizado con el programa computacional SQUAD. Los resultados finales de constantes de acidez para este ajuste se presentan en la siguiente *tabla 2.11*.

Tabla 2.11. Valores de pK_a y movilidad efectiva (u_{eff}) refinados con SQUAD, del LQM303 a $T=37^\circ\text{C}$ y $I=0.05\text{M}$. σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión (que tiene unidades de movilidad electroforética) y U toma en cuenta la suma de cuadrados (que tiene unidades de movilidad electroforética al cuadrado).

| LQM303 $\sigma_{reg} = 0.027 \times 10^{-8}$; $U = 0.019 \times 10^{-16}$ | | |
|--|-------------------------|---|
| | $pK_{ai} \pm \sigma$ | $u_{effi} / 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm \sigma$ |
| H_3L^{2+} | 4.712 ± 0.045 | 3.206 ± 0.032 |
| H_2L^+ | 6.883 ± 0.017 | 1.621 ± 0.027 |
| HL | No determinable por CZE | - |

En la *figura 2.10* se presenta la curva de movilidad electroforética como función del pH. De manera gráfica podemos observar dos puntos de inflexión sobre la curva, los cuales se pueden interpretar como los valores de pK_a correspondientes a las dos primeras desprotonaciones. En donde el valor de 4.712 pertenece a la desprotonación de la especie H_3L^{2+} del LQM303. El pK_a de 6.833 corresponde a la desprotonación de la especie H_2L^+ . Para el tercer valor de pK_a perteneciente a la especie aniónica no fue posible determinar debido a la formación de un precipitado; esto impidió el cálculo de valores experimentales de movilidad y en consecuencia no se logró realizar el ajuste en ese intervalo de pH.

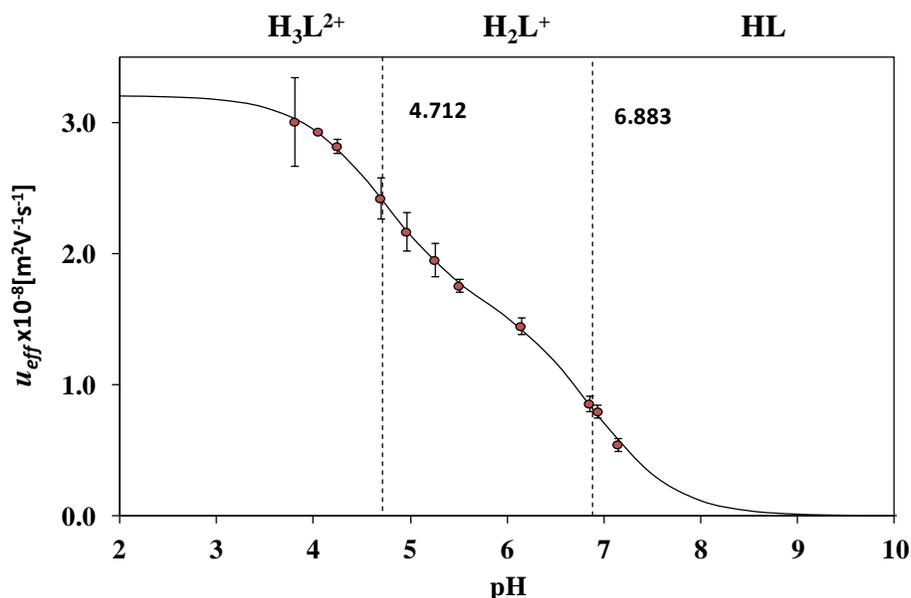


Figura 2.10. Curva de movilidad efectiva en función del valor de pH del LQM303 obtenida a 37°C y fuerza iónica 0.05M . Los marcadores representan los resultados experimentales, la línea continua pertenece al ajuste realizado con el programa SQUAD. En la parte superior de la gráfica se observa el diagrama de zonas de predominio de las especies del LQM303 [34, 35].

2.4.3 CONSTANTES DE ACIDEZ LQM314 (T = 37 °C; I = 0.05 M)

Para el cálculo de los valores de pK_a del LQM314 se procedió usando la misma metodología, se obtuvieron los electroferogramas de una serie de soluciones de LQM314 a diferente pH. Cada solución se analizó por triplicado y se determinaron los tiempos de migración del marcador de flujo (t_{eo}) y del LQM314.

Los valores calculados de movilidad efectiva para el LQM314 se presentan en la *tabla 2.12 a) y b)*. Cada valor de movilidad efectiva corresponde al promedio de las tres repeticiones realizadas de cada punto experimental.

Tabla 2.12 a). Valores finales de movilidad efectiva para el LQM314 a T = 37 °C y su desviación estándar, a cada valor de pH estudiado.

| Solución | pH | u_{eff} | DesvEst |
|----------|-------|-----------|-----------|
| 1 | 2.308 | 3.865E-08 | 7.154E-10 |
| 2 | 2.715 | 3.434E-08 | 6.907E-10 |
| 3 | 3.040 | 3.221E-08 | 5.431E-10 |
| 4 | 3.410 | 2.972E-08 | 4.538E-10 |
| 5 | 3.824 | 2.752E-08 | 7.784E-10 |
| 6 | 4.217 | 2.650E-08 | 1.954E-09 |
| 7 | 4.517 | 2.574E-08 | 1.943E-09 |
| 8 | 4.836 | 2.522E-08 | 2.465E-09 |
| 9 | 5.168 | 2.406E-08 | 1.160E-09 |
| 10 | 5.528 | 2.269E-08 | 3.328E-10 |
| 11 | 5.923 | 2.075E-08 | 1.543E-09 |
| 12 | 6.252 | 1.741E-08 | 1.212E-09 |
| 13 | 6.573 | 1.490E-08 | 6.671E-10 |
| 14 | 6.923 | 8.656E-09 | 9.854E-10 |
| 15 | 7.316 | 3.905E-09 | 8.185E-10 |
| 16 | 8.045 | 0 | 5.599E-10 |

Tabla 2.12 b). Valores finales de movilidad efectiva para el LQM314 a T = 37°C y su desviación estándar, a cada valor de pH estudiado.

| Solución | pH | u_{eff} | DesvEst |
|----------|--------|------------|-----------|
| 17 | 8.334 | -2.127E-09 | 4.072E-10 |
| 18 | 8.735 | -5.412E-09 | 6.473E-10 |
| 19 | 9.037 | -9.785E-09 | 5.139E-10 |
| 20 | 9.390 | -1.330E-08 | 7.301E-11 |
| 21 | 9.763 | -1.587E-08 | 9.625E-11 |
| 22 | 10.063 | -1.711E-08 | 1.312E-10 |
| 23 | 10.557 | -1.843E-08 | 1.761E-10 |
| 24 | 11.003 | -1.821E-08 | 1.516E-10 |

En la *tabla 2.13* se reportan los resultados de las constantes de acidez del LQM314 obtenidas con el refinamiento de datos en SQUAD. Estos valores son consistentes con los reportados por *Aguilar-Hernández* [36] en su determinación mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 2.13 Valores de pK_a y movilidad efectiva (u_{eff}) refinados con SQUAD, para el LQM314 a T=37°C. σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión (que tiene unidades de movilidad electroforética) y U toma en cuenta la suma de cuadrados (que tiene unidades de movilidad electroforética al cuadrado).

| LQM314 $\sigma_{reg} = 0.061 \times 10^{-8}$; $U = 0.221 \times 10^{-16}$ | | |
|--|----------------------|---|
| | $pK_{ai} \pm \sigma$ | $u_{effi} / 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1} \pm \sigma$ |
| H_3L^{2+} | 2.960 ± 0.070 | 4.099 ± 0.092 |
| H_2L^+ | 6.658 ± 0.035 | 2.517 ± 0.038 |
| HL | 9.050 ± 0.023 | -1.884 ± 0.050 |

En la *figura 2.11* se tiene la curva de movilidad electroforética. Se observan tres valores de pK_a pertenecientes a cada una de las tres desprotonaciones del LQM314. A diferencia del compuesto LQM303, para el LQM314 se logró determinar valores de movilidad para cada una de las especies presentes, incluyendo la especie aniónica, ya que durante el estudio en el intervalo de pH entre 2.0 y 11.0 no se formó un precipitado que afectará nuestro análisis.

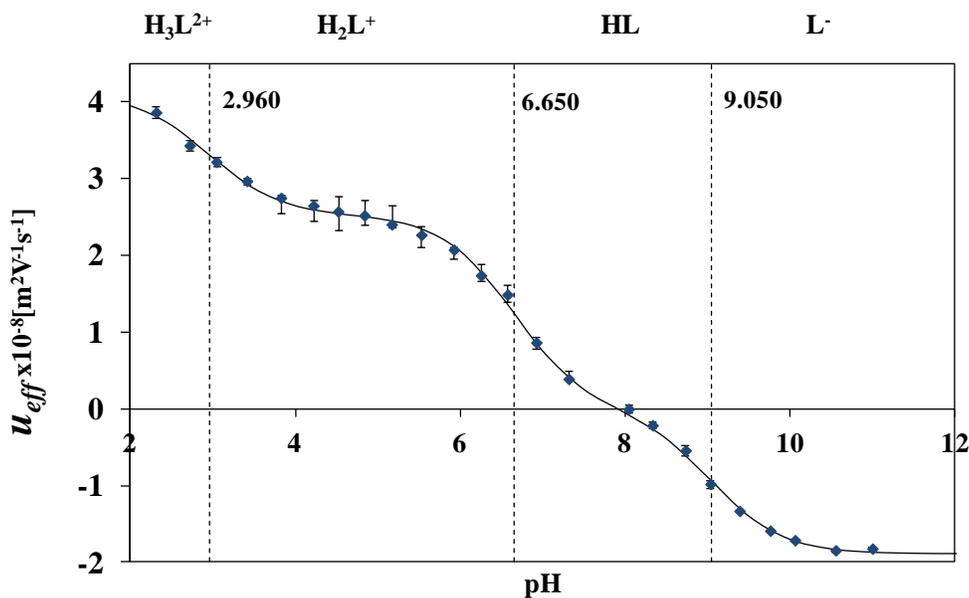


Figura 2.11. Curva de movilidad efectiva del LQM314 en función de pH obtenida a 37°C y fuerza iónica 0.05M (aproximada). Los marcadores representan los resultados experimentales, la línea continua pertenece al ajuste realizado con el programa SQUAD. En la parte superior de la gráfica se observa el diagrama de zonas de predominio de las especies de LQM314 [34, 35].

2.5 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CONSTANTES DE ACIDEZ

2.5.1 DETERMINACIÓN DE pK_a a $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

El conjunto de espectros UV-Vis para la titulación de LQM se presenta en la *figura 2.12*. El intervalo de pH en el cual se trabajó fue de 1.220 a 6.767. Existe la presencia de dos bandas de absorción en estos espectros, la primera de ellas se observa a una longitud de onda de 286 nm, aquí se presenta un efecto hipocrómico y batocrómico. La segunda aparece en 310 nm con un efecto hipercrómico, en esta longitud de onda se llevó a cabo el análisis de los datos.

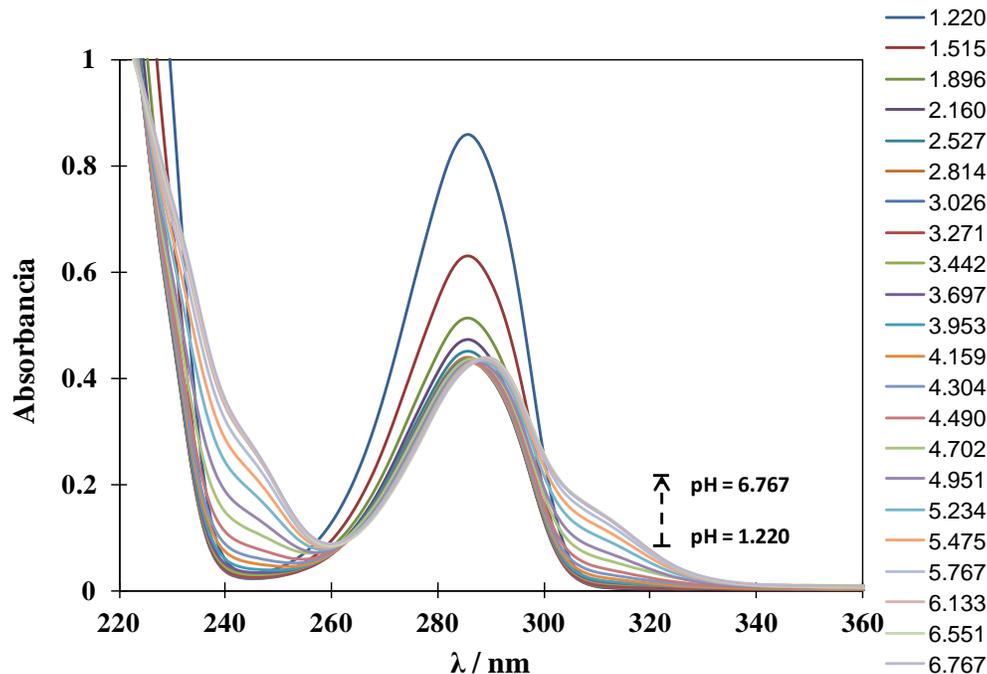


Figura 2.12. Espectros del LQM303 2.64×10^{-4} M en un intervalo de pH entre 1.220 y 6.767.

Finalmente, con el programa de cómputo SQUAD [33] se refinan los datos experimentales de los espectros de absorción. Este refinamiento se realizó con los datos en el intervalo de pH entre 1.220 y 6.767, en el cual se utilizó un modelo de dos equilibrios; y se corrigieron los valores de concentración por efecto de dilución. Los valores finales de pK_a se muestran en la *tabla 2.14*.

Tabla 2.14. Valores finales de pK_a refinados con SQUAD para el LQM303 a 25°C (σ_{reg} : representa la desviación estándar de la regresión; U: toma en cuenta la suma de cuadrados).

| $\sigma_{reg} = 0.002; U = 0.007$ | | |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| | $pK_{a1} \pm \sigma$ | $pK_{a2} \pm \sigma$ |
| LQM303 | 5.010 ± 0.369 | 7.444 ± 0.261 |

La figura 2.13 muestra el comportamiento de la absorbancia (a 310 nm) como función del pH para el compuesto LQM303. En esta gráfica se observa el comportamiento descrito por la ecuación 6 del modelo teórico (sección 2.3). En este modelo construido en Excel se sustituyen los valores de pK_{a1} , pK_{a2} y los coeficientes de absorptividad a 310 nm encontrados con el refinamiento de SQUAD.

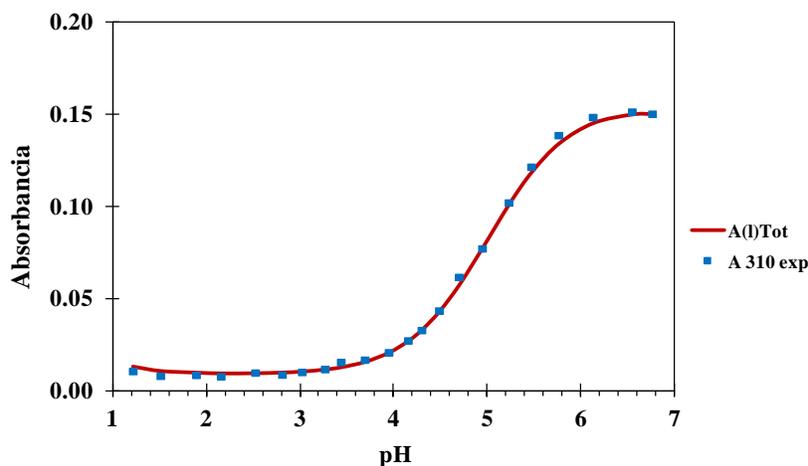


Figura 2.13. Curva de absorbancia en función del pH. Intervalo de $1.220 < pH < 6.767$. Los marcadores son los puntos experimentales. La línea continua corresponde modelo teórico (ecuación 7, sección 2.3).

En la curva antes mencionada podemos ver que el comportamiento de la absorbancia en función del pH, descrito por la ecuación 6 de la sección 2.3, se ajusta de buena forma con los datos experimentales. Esto nos lleva a concluir que el modelo propuesto describe de manera correcta al sistema. A continuación se construyen los espectros teóricos para poder realizar una comparación con el conjunto de espectros experimentales y así determinar si los valores de constantes de acidez son correctos.

La construcción de los espectros ajustados se realiza con ayuda del programa MEDUSA [37], con el cual podremos realizar el diagrama de distribución de las especies de LQM303 y obtener las fracciones molares de cada especie presente en el sistema. Con los datos de fracciones molares y concentración corregidos por efecto de dilución se construyen los espectros calculados de acuerdo a la ley de Beer-Lambert y la ley de aditividad. La *figura 2.14* muestra la comparación de los espectros antes mencionados.

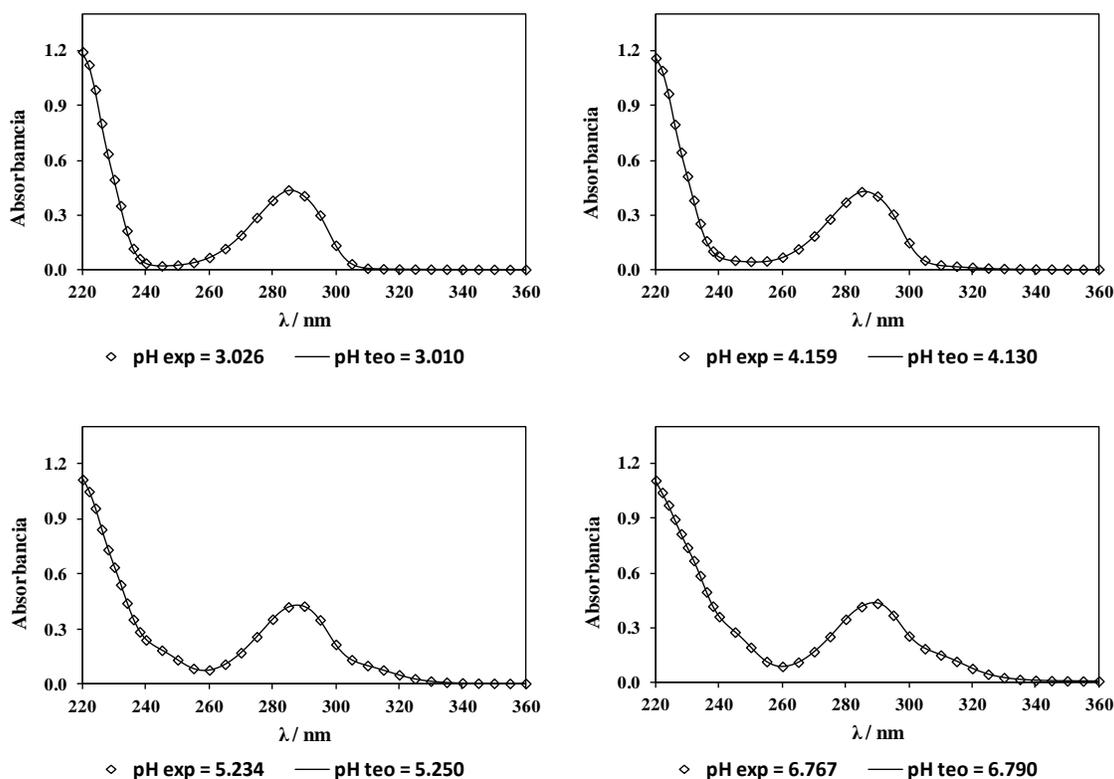


Figura 2.14. Comparación de espectros del LQM303 a diferente pH. Los *marcadores* pertenecen a puntos del espectro experimental. La *línea continua* corresponde al espectro teórico construido con MEDUSA y los valores de pK_a refinados con SQUAD.

En esta comparación de espectros ajustado y experimental solo se muestran cuatro valores de pH, estos espectros de absorción se presentan como representativos del conjunto total. Sin embargo, al realizar la comparación de cada espectro de absorción se observa que en todos se tiene un buen ajuste como los observados en la *figura 2.14*.

2.5.2 DETERMINACIÓN DE pK_a a $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$ y $I = 0.15\text{ M}$

Se realizó la determinación de las constantes de acidez del LQM303, en condiciones pseudofisiológicas de temperatura y fuerza iónica. En la *figura 2.15 a) y b)* se muestran los conjuntos de espectros UV-vis correspondientes a la titulación ácido-base del LQM303 que se realizó por triplicado. Se observa que existe un máximo de absorción en una longitud de onda aproximada de 286 nm, al aumentar el pH ocurre un efecto batocrómico. De la misma manera que en el estudio por Electroforesis capilar, a valores cercanos a $pH = 7.0$, se forma un precipitado que impide una correcta determinación de los espectros correspondientes.

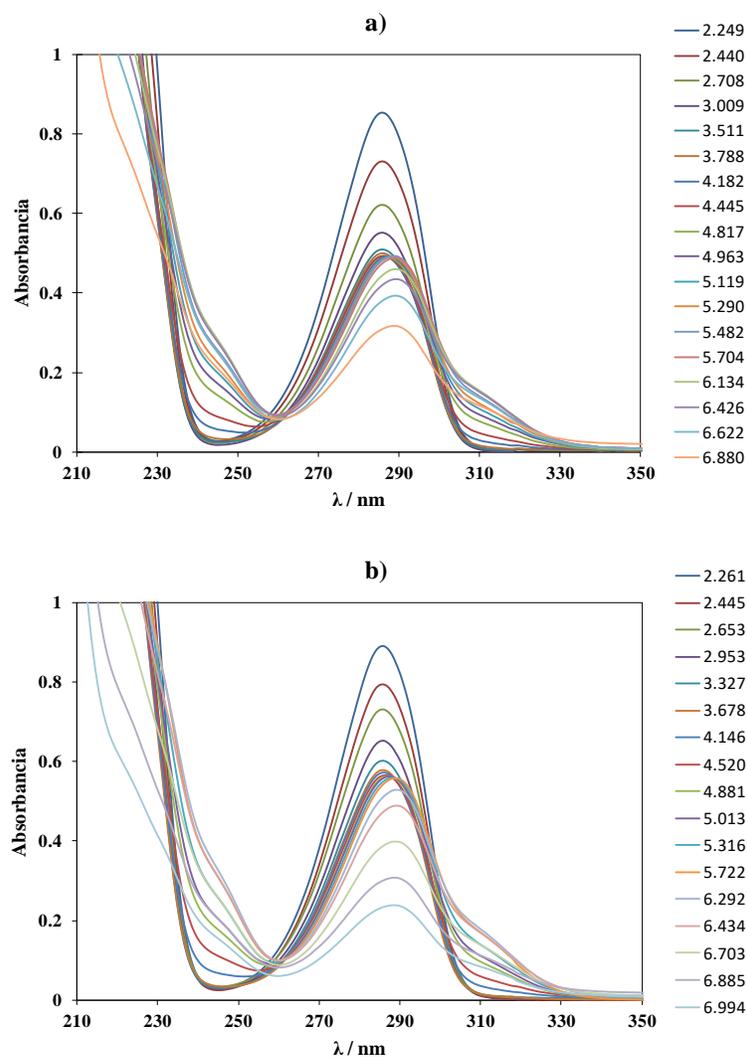


Figura 2.15. Conjunto de espectros UV-Vis del LQM303 en intervalos de pH menores a 7.0.

a) valoración 1, b) valoración 2.

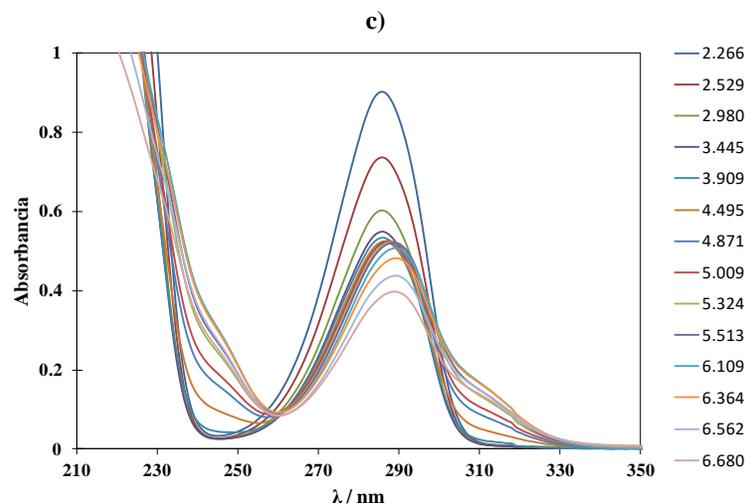


Figura 2.15.(continuación) Conjunto de espectros UV-vis del LQM303. c) valoración 3.

En seguida se realizó el ajuste de cada grupo de datos experimentales proponiendo un modelo de dos equilibrios. Los valores de concentración usados en el refinamiento de SQUAD fueron corregidos tomando en cuenta la dilución. A continuación se presentan los resultados para las constantes globales y sus desviaciones estándar.

Tabla 2.15. Valores de $\log \beta$ para el ajuste con SQUAD (σ_{reg} : desviación estándar de la regresión).

| | $\log \beta_1$ | $\pm \sigma$ | $\log \beta_2$ | $\pm \sigma$ | σ_{reg} |
|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| Valoración 1 | 7.126 | 0.012 | 12.012 | 0.011 | 0.003 |
| Valoración 2 | 7.070 | 0.006 | 12.000 | 0.006 | 0.007 |
| Valoración 3 | 7.137 | 0.010 | 12.080 | 0.009 | 0.006 |

Y finalmente por definición de constantes globales y constantes de disociación ácida, se calculan los valores de pK_a los cuales son reportados como el promedio de las tres repeticiones.

Tabla 2.16. Valores promedio de pK_a obtenidos bajo condiciones pseudofisiológicas (T=37°C and I=0.15M). σ_{reg} : representa la desviación estándar de la regresión.

U: es la suma de cuadrados.

| $\sigma_{reg} = 0.006; U = 0.025$ | | |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| | $pK_{a1} \pm \sigma$ | $pK_{a2} \pm \sigma$ |
| LQM303 | 4.920 ± 0.013 | 7.111 ± 0.009 |

Como se comentó en secciones anteriores, al trabajar a pH por arriba de 7.0 ocurría una precipitación del LQM303, por lo cual, no fue posible la determinación del pK_{a3} debido a la falta de puntos experimentales en el intervalo de pH básico. Así, el refinamiento se realizó con un conjunto de dos equilibrios. Sin embargo, es evidente que no considerar el tercer equilibrio químico correspondiente a la última desprotonación provocará un error en el valor de pK_{a2} y en los coeficientes de absortividad obtenidos del refinamiento. Es por esto que en la *figura 2.16* se tienen coeficientes de absortividad muy bajos para la especie HL y en el caso del pK_{a2} se puede intuir que el error cometido será pequeño ya que se estima que el tercer pK_a es mayor a 12.

En una regresión todos los parámetros calculados están correlacionados, en este caso el valor K_{a2} está altamente correlacionado con los coeficientes de absortividad de las especies H_2L^+ y HL, así como el valor de K_s asociado con las especies eléctricamente neutras (HL).

Al precipitar cierta cantidad de especies HL, la concentración de equilibrio será menor que el valor calculado suponiendo que ninguna cantidad de HL precipita; este supuesto afectará el valor K_{a2} . Entonces, K_{a2} podría ser menor (mayor pK_{a2}) que el valor calculado. Sin embargo, en este caso el valor de pK_{a2} calculado para los datos espectroscópicos es muy similar a lo obtenido por CZE. Así, se propone que este valor es correcto y se ha preferido mantener el efecto de una posible precipitación de cierta cantidad de HL en los valores de absortividad molar de la especie HL.

Para tratar de evitar el problema de precipitación, se probaron diferentes concentraciones de trabajo. Para los resultados presentados en este trabajo de tesis se utilizó una concentración de LQM303 aproximada de 2.6×10^{-4} M, y como se observa en la *figura 2.15* los espectros de absorción con pH cercano a 7.0 tienen una absorbancia en 286 nm de alrededor de 0.2, en base a esto se puede argumentar que si bajamos la concentraciones de trabajo entonces tendremos valores de absorbancia muy pequeños, lo que afectará el refinamiento provocando una desviación estándar muy grande.

En la *figura 2.16* se presentan los coeficientes de absorptividad obtenidos del refinamiento con SQUAD.

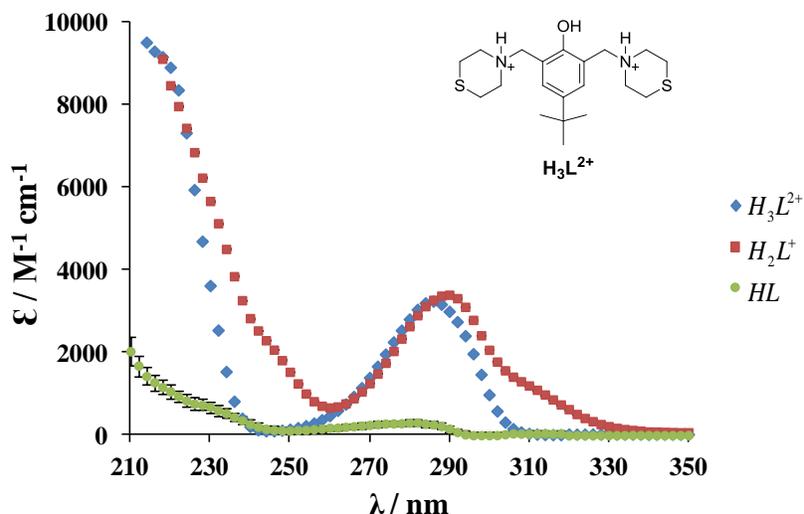


Figura 2.16. Coeficientes de absorptividad del LQM303 obtenidos del refinamiento con SQUAD para los datos de la valoración No.1.

Con el programa MEDUSA se elabora el diagrama de distribución del LQM utilizando los valores de $\log \beta$ obtenidos del refinamiento (*tabla 2.15*), y considerando un modelo de dos equilibrios. Este diagrama se muestra en la *figura 2.17*.

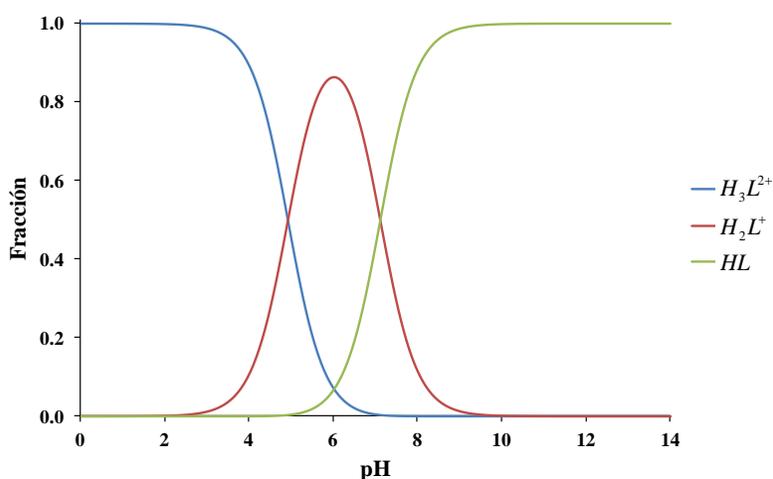


Figura 2.17. Diagrama de distribución del LQM303 construido con MEDUSA y los valores de $\log \beta$ obtenidos del refinamiento con SQUAD para los datos de la valoración No.1.

Con las fracciones molares de las especies de LQM las cuales se obtienen del diagrama de distribución, los coeficientes de absortividad y la concentración de trabajo del LQM, podemos construir los espectros UV calculados mediante la ley de Beer-Lambert y la ley de aditividad, como se mencionó en la sección anterior. A continuación se toma el conjunto de espectros experimentales correspondiente a la *Valoración 1* para comparar con los espectros ajustados, *figura 2.18*.

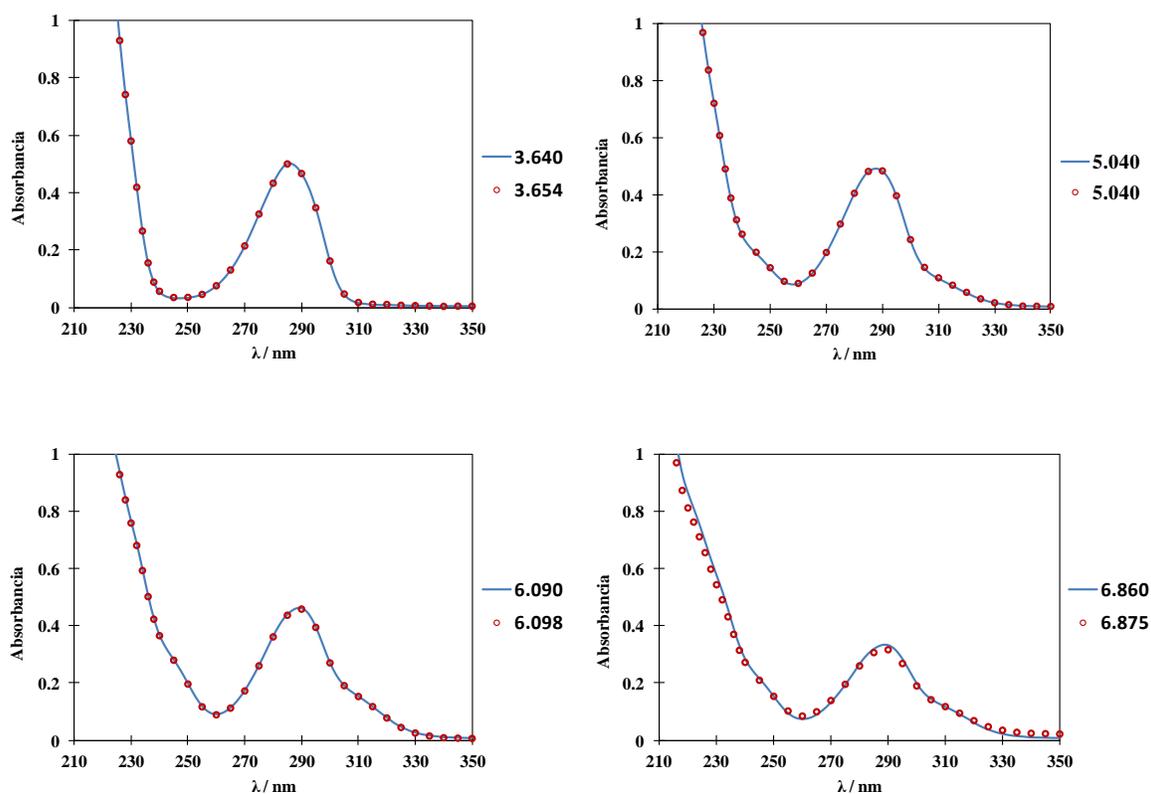


Figura 2.18. Comparación de los espectros de absorción del LQM303 a diferente pH. Los marcadores pertenecen a puntos del espectro experimental. La línea continua corresponde al espectro ajustado con los valores de pK_a refinados con SQUAD.

Analizando los espectros mostrados en la *figura 2.18* podemos argumentar que los resultados obtenidos para las constantes de acidez del LQM303, junto con el modelo propuesto de dos equilibrios, muestran un ajuste satisfactorio con los espectros de absorción experimentales. Esto nos da la posibilidad de comprobar que los resultados presentados reproducen correctamente el comportamiento químico del LQM303 en un amplio intervalo de pH.

2.6 CONCLUSIONES

La determinación de las constantes de acidez del LQM303 se llevó a cabo con las técnicas experimentales de electroforesis capilar de zona y espectrofotometría UV-vis. En ambos casos se lograron determinar dos valores de pK_a pertenecientes a las dos primeras desprotonaciones de la molécula del LQM303. La desprotonación de la especie H_3L^{2+} (que representa la especie diprotonada del LQM303) tiene el valor de pK_{a1} mostrado en la *tabla 2.17*. El pK_{a2} corresponde a la disociación ácida de la especie H_2L^+ . En el caso del LQM314 se logró obtener el tercer valor de pK_a ya que la solubilidad es mayor y no se forma precipitado en la concentración de trabajo. En la *tabla 2.17* y *2.18* se presenta un resumen de los valores determinados mediante estas técnicas.

Tabla 2.17. Valores de pK_a obtenidos por CZE: I) $T=298.15$ K y $I=0.05$ M, II) $T=310.15$ K y $I=0.15$ M.

| Equilibrio | $pK_{ai} \pm \sigma$ | movilidad efectiva ionica ^(a) $u_{effi} (\times 10^8) / m^2 V^{-1} s^{-1} \pm \sigma$ | conductividad equivalente ^(b) $\lambda_{H_j L^z} / cm^2 S^{-1} equiv^{-1} \pm \sigma$ |
|--|----------------------|---|---|
| I) LQM303 $\sigma_{reg} = 0.056 \times 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}$; $U = 0.057 \times 10^{-16} m^4 V^{-2} s^{-2} \textcircled{c}$ | | | |
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 4.966 ± 0.019 | | |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 6.958 ± 0.074 | | |
| $HL \rightleftharpoons L^- + H^+$ | - | | |
| H_3L^{2+} | | 2.974 ± 0.028 | 15.47 ± 0.15 |
| H_2L^+ | | 1.283 ± 0.032 | 15.64 ± 0.26 |
| II) LQM303 $\sigma_{reg} = 0.027 \times 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}$; $U = 0.019 \times 10^{-16} m^4 V^{-2} s^{-2} \textcircled{c}$ | | | |
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 4.712 ± 0.045 | | |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 6.883 ± 0.017 | | |
| $HL \rightleftharpoons L^- + H^+$ | - | | |
| H_3L^{2+} | | 3.206 ± 0.032 | 15.47 ± 0.15 |
| H_2L^+ | | 1.621 ± 0.027 | 15.64 ± 0.26 |

^(a) Movilidad efectiva ionica de todas las especies involucradas estimadas en el refinamiento.

^(b) Conductividad equivalente de los iones estimada con la ecuación: $|z|\lambda_{H_j L^z} = F u_{H_j L^z}$, donde F es la constante de Faraday, z es la carga de la especie.

^(c) σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión (que tiene unidades de movilidad electroforética) y U suma de cuadrados para los residuales de la movilidad efectiva (unidades de movilidad electroforética al cuadrado).

Tabla 2.18. Valores de pK_a obtenidos por espectrofotometría UV y fuerza iónica: III) $I=0.05$ M, IV) $I=0.15$ M.

| LQM303 | III) $T = 25^\circ C$ ($\sigma_{reg} = 0.002$) | IV) $T = 37^\circ C$ ($\sigma_{reg} = 0.006$) |
|---|--|---|
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 5.010 ± 0.369 | 4.920 ± 0.013 |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 7.444 ± 0.261 | 7.111 ± 0.009 |
| $HL \rightleftharpoons L^- + H^+$ | - | - |

CAPÍTULO 3

CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN Cu(II)-LQM

3.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La espectrofotometría constituye uno de los medios más poderosos para clarificar la estructura de iones complejos en solución y para determinar sus constantes de formación. El alcance de esta técnica se basa en la posibilidad de obtener medidas de absorción sin alterar los equilibrios en estudio. Dos de los procedimientos más utilizados para estudiar complejos son: el método de las relaciones molares y el método de las variaciones continuas (o *método de Job*).

3.1.1 MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES

El método de relaciones molares, el cual se utilizó en el desarrollo de este trabajo, consiste en preparar una serie de disoluciones manteniendo constante la concentración de uno de los reactivos, mientras se varía la del otro. Se grafica la absorbancia como función de la relación molar de los reactivos. Si la constante de formación del complejo es cuantitativa, se obtendrán dos rectas de diferentes pendientes, cuya intersección se produce en el valor de la relación estequiométrica del complejo ML_n , que se forma de acuerdo al equilibrio:

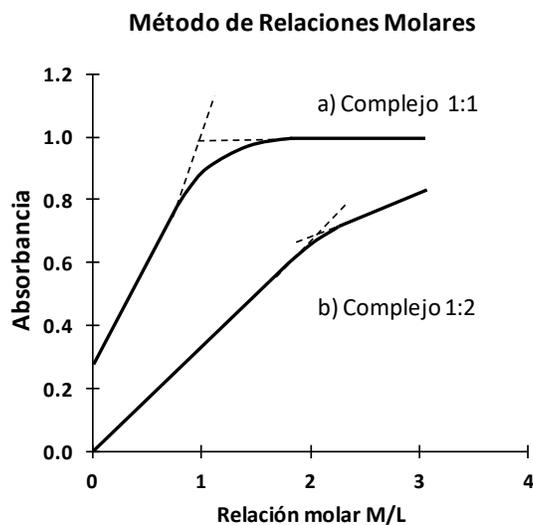


Figura 3.1. Grafico típico del método de la relación molar para complejos a) 1:1 y b) 1:2. El complejo con estequiometría 1:2 es el más estable, según lo indica la menor curvatura cerca de la relación estequiométrica.

En la *figura 3.1* se representan curvas típicas de este método. En la *–curva a–* el catión (o ligante según sea el caso) sin acomplejar que participa en la formación del complejo de estequiometría 1:1 absorbe, por lo que el punto inicial tiene una absorbancia mayor que cero. En la *–curva b–* es importante hacer notar que el ligando del complejo 1:2 absorbe a la longitud de onda de trabajo; por lo tanto, pasando el punto de equivalencia, la pendiente es mayor que cero [38]. Si la reacción de formación del complejo no es cuantitativa, la representación de la relación molar aparece como una línea de curvatura continua, esto es, sin partes rectas que permitan la extrapolación para determinar la relación estequiométrica de la combinación, como se observa en la *–curva b–* de la *figura 3.1*.

3.1.2 PARTE EXPERIMENTAL

Se determinó la relación (metal-ligante) del complejo formado, a través del método de relaciones molares. Este análisis se llevó a cabo en una celda termostatada a 25°C, empleando los siguientes reactivos de grado analítico y agua desionizada: 1) cloruro de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2) ácido perclórico (HClO_4) y 3) Hidróxido de sodio (NaOH). Además se usó el compuesto LQM303.

Los valores de pH se midieron con un potenciómetro sensION PH31 HACH (± 0001 de resolución) equipado con un electrodo de pH combinado HACH Ag/AgCl. El pH de la solución se corrigió por eficiencia de la celda con la *ecuación 1 de la sección 2.1.2*. Para los valores experimentales de absorbancia se corrigieron por efecto de dilución mediante la ecuación:

$$A_{corr}^{\lambda} = A_{exp}^{\lambda} \cdot \left[\frac{V_{inicial} + V_{agregado}}{V_{inicial}} \right] \quad (10)$$

A_{corr}^{λ} : representa el valor de absorbancia corregida a la longitud de onda de estudio.

A_{exp}^{λ} : representa el valor experimental de absorbancia a la longitud de onda de estudio.

$V_{inicial}$: es el volumen inicial hasta antes de la primer adición de ligante (en su caso considerando el volumen de aforo y el volumen de NaOH agregado para ajustar el pH).

$V_{agregado}$: volumen acumulado en cada adición de ligante.

Se determinaron las concentraciones de trabajo de las soluciones de cobre y LQM, esto para conocer el intervalo en el cual absorben las especies presentes en el sistema. Se obtuvieron los espectros UV-vis a diferentes concentraciones de Cobre y de LQM303.

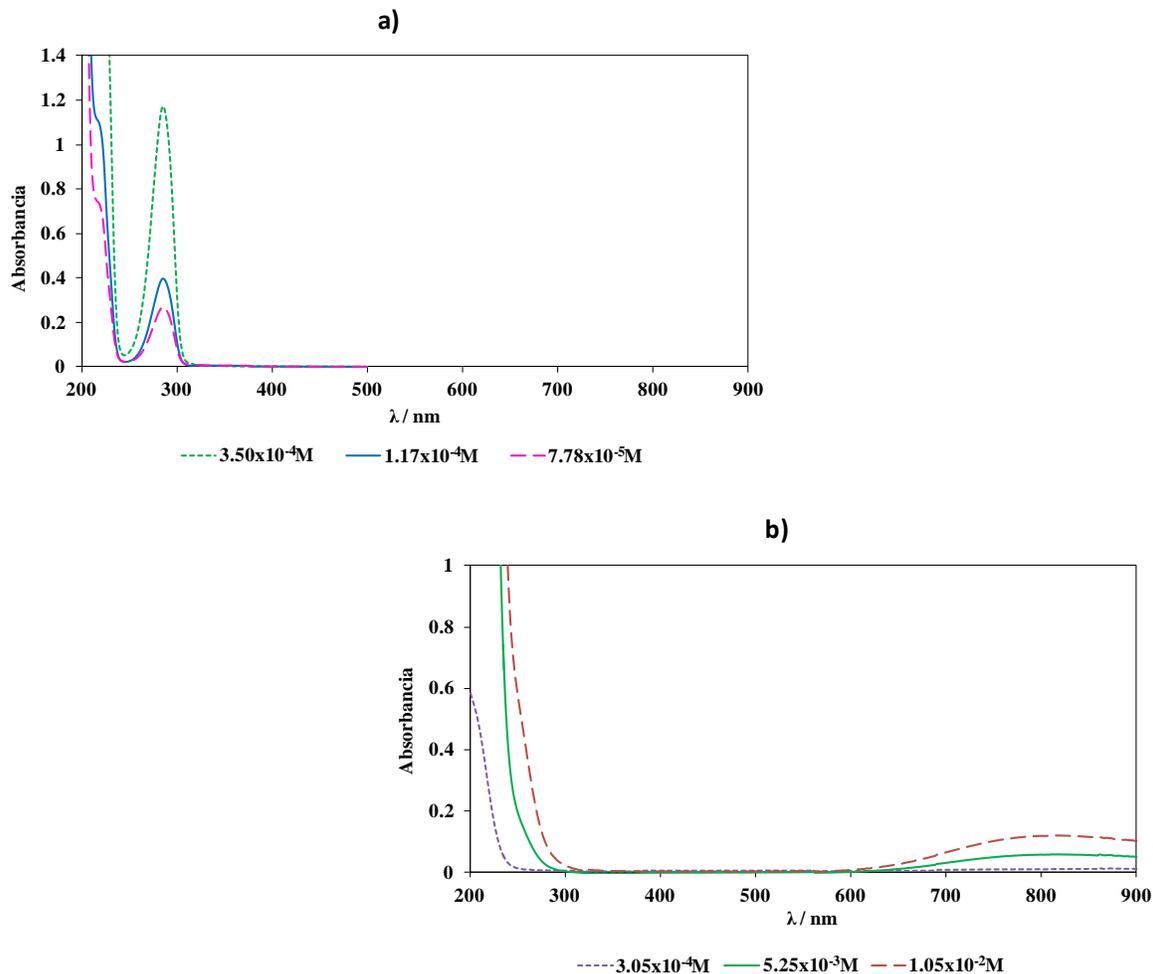


Figura 3.2. Espectro UV-Vis a diferente concentración. *a)* solución de LQM303 en HClO₄ 0.01 M. *b)* solución de cloruro de cobre (CuCl₂*2H₂O) en HClO₄ 0.01 M.

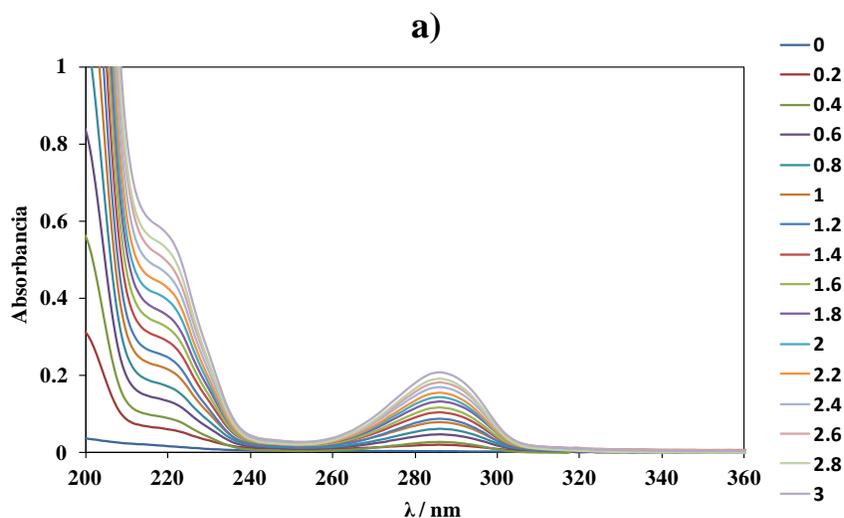
En la *figura 3.2* se muestran espectros UV del LQM303, estos espectros de absorción se obtuvieron en un intervalo de longitud de onda de 200-500 nm. Se observa una banda de absorción del LQM303 aproximadamente en 286 nm. Para la solución de cloruro de cobre se puede notar que a valores de concentración del orden de $10^{-4}M$ no existe señal en longitudes de onda mayor a 300 nm, por lo tanto el intervalo de estudio fue fijado de 200-400 nm, esto para atribuir cualquier cambio en los espectros UV a la formación de especies entre cobre y LQM.

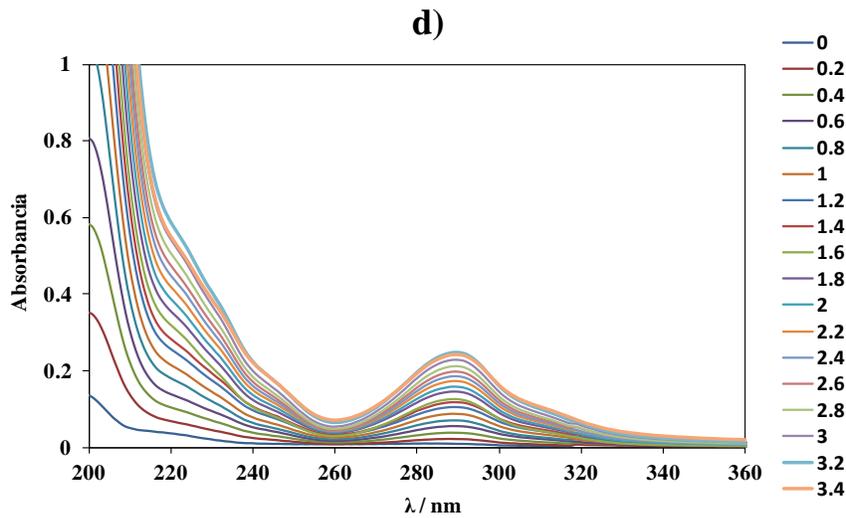
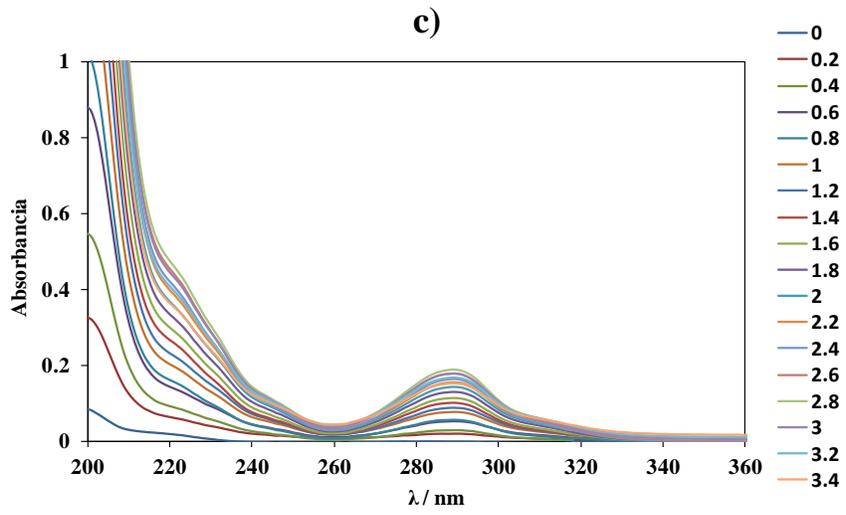
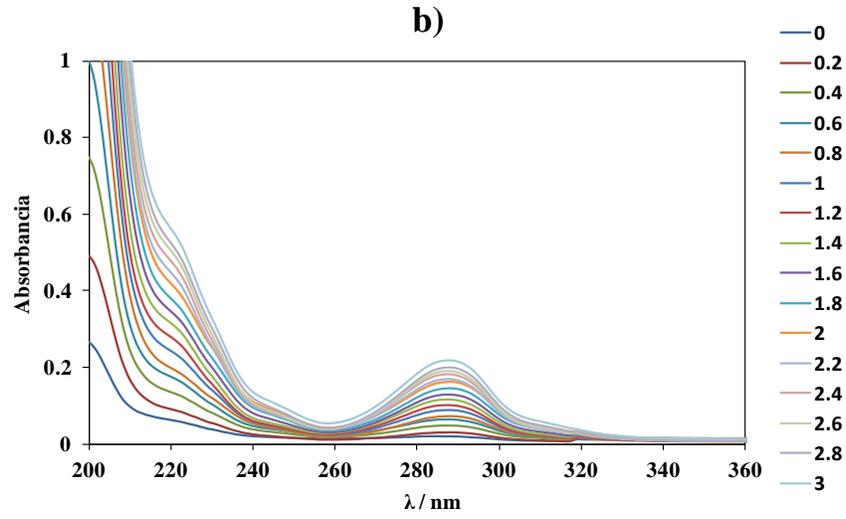
3.2 RELACIÓN MOLAR *Cu-LQM*

En el capítulo 1 se habló acerca de la importancia de los complejos de cobre con ligandos de interés biológico. A partir de esta sección se tratará lo referente a la interacción de Cu^{2+} y el LQM303. Como resultado final se presentará una propuesta de formación de complejos y sus posibles estructuras. A continuación se describe el método usado para la determinación de la relación molar de los complejos de Cu-LQM303.

3.2.1 Adición LQM a Cu^{2+}

Se hicieron adiciones de LQM a una alícuota inicial de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a diferente pH. La solución inicial de trabajo se preparó colocando 1.0 mL de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de concentración 5.25×10^{-4} M, se agrega 20 mL de HClO_4 0.1 M, se ajusta el pH y finalmente se afora a 25 mL. La concentración final de cobre posterior al aforo es 2.10×10^{-5} M. En la *figura 3.3* podemos observar los distintos grupos de espectros UV-vis de Relación Molar a diferente pH.





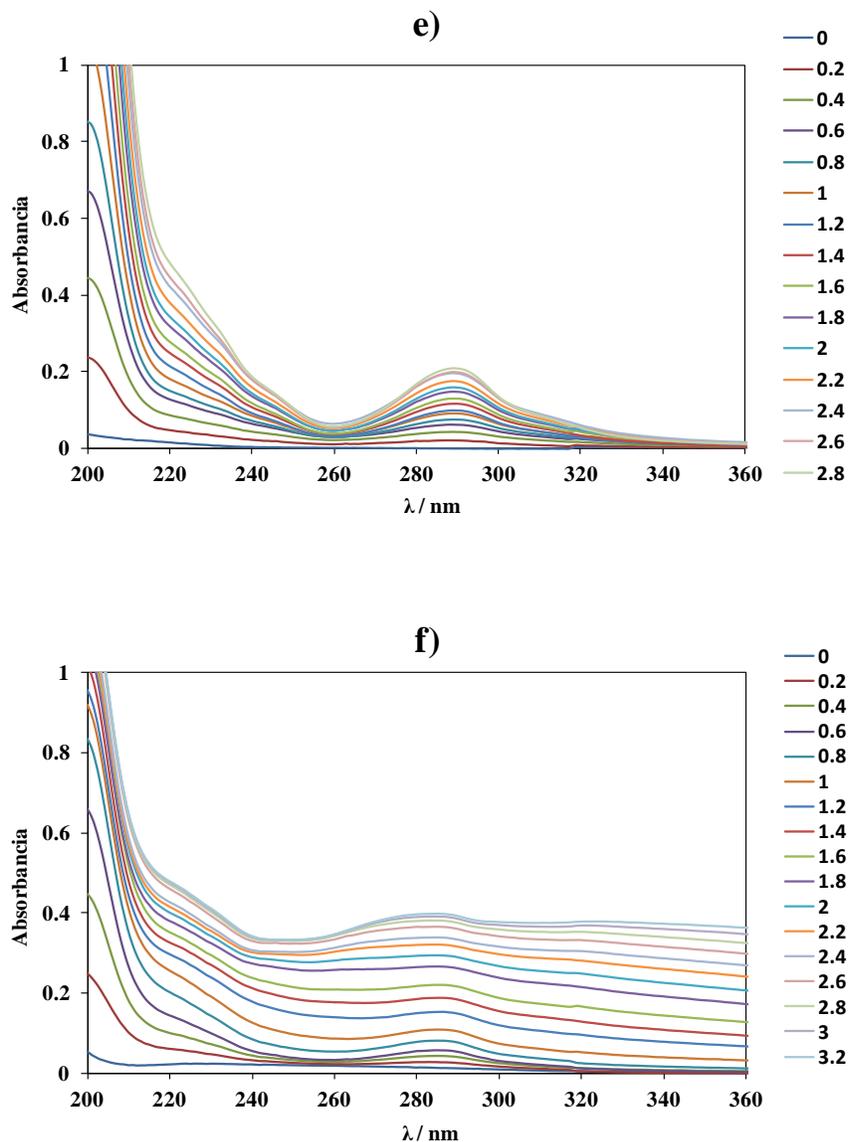


Figura 3.3. Serie de espectros UV-vis de las adiciones de LQM a Cu(II) constante; variación de la relación molar a pH fijo. *a)* pH=4.264, *b)* pH=5.116, *c)* pH=5.839, *d)* pH=6.200, *e)* pH=6.949 y *f)* pH=8.745.

En la *figura 3.3 a)* se observa una banda bien definida en 286 nm, y en el intervalo de 210 a 240 nm se observa un hombro el cual crece a medida que aumenta la relación molar. En las figuras *b)*, *c)*, *d)* y *e)*, la banda que aparece en 286 nm se ensancha a medida que el pH aumenta. De la misma manera, al aumentar el pH, la forma del espectro entre 210 y 240 nm se modifica. En el conjunto de espectros de absorción a pH = 8.745 (*figura 3.3 f)* observamos el desplazamiento de la línea base provocado por la formación de un precipitado.

Una vez obtenidos los conjuntos de espectros a diferente pH se construye la gráfica para el método de Relaciones Molares, seleccionando una longitud de onda en la cual se observe un cambio en la forma del espectro (*figuras 3.4, 3.5 y 3.6*).

La siguiente gráfica se construyó a partir del conjunto de espectros de absorción de la *figura 3.3 b*), en donde se eligió una longitud de onda de 224 nm. Y como se observa en la figura, hay un cruce de las rectas en la relación molar 1:2.

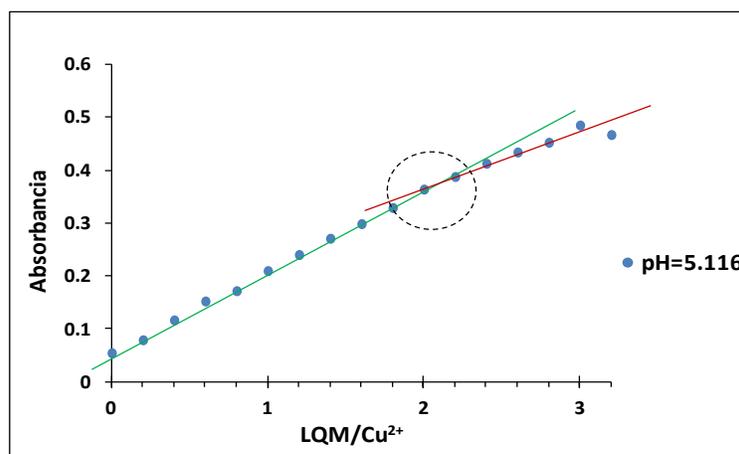


Figura 3.4. Gráfica de Relaciones Molares para adiciones de LQM303 a una concentración de Cu^{2+} fija; pH = 5.116 y longitud de onda de 224nm.

La *figura 3.5* es la gráfica de relaciones molares a pH 4.264 en la cual se observa un cambio de pendiente en la relación $1\text{Cu}-1\text{LQM}$.

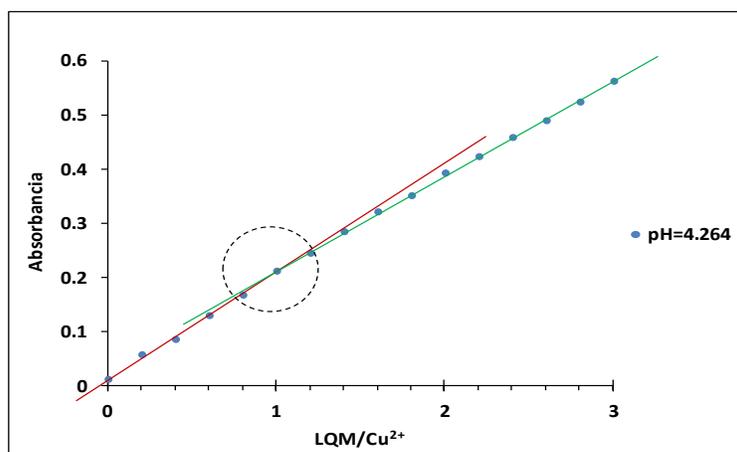


Figura 3.5. Gráfica de Relaciones Molares para adiciones de LQM303 a una concentración de Cu^{2+} fija; pH = 4.264 y longitud de onda de 220nm.

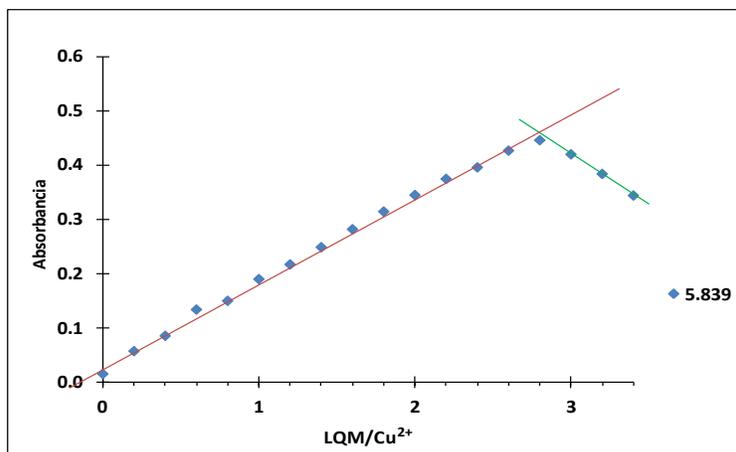
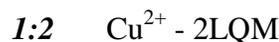
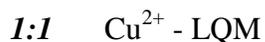


Figura 3.6. Gráfica de Relaciones Molares para adiciones de LQM303 a una concentración de Cu^{2+} fija; pH = 5.839 y longitud de onda de 224nm.

En base a las gráficas anteriores y de acuerdo al método de relaciones molares proponemos dos posibles relaciones molares para la formación del complejo Cu – LQM. Los cruces de las rectas mostradas en cada figura nos dan la probable estequiometría de cada especie formada.



Es importante tener en cuenta la relación molar 1:3 mostrada en la *figura 3.6* al momento de proponer el conjunto final de equilibrios, ya que probablemente sea necesaria para obtener un mejor ajuste.

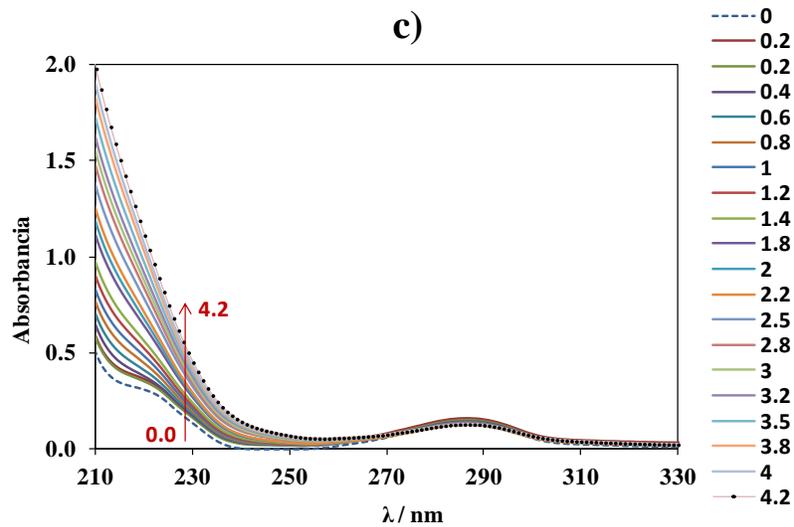
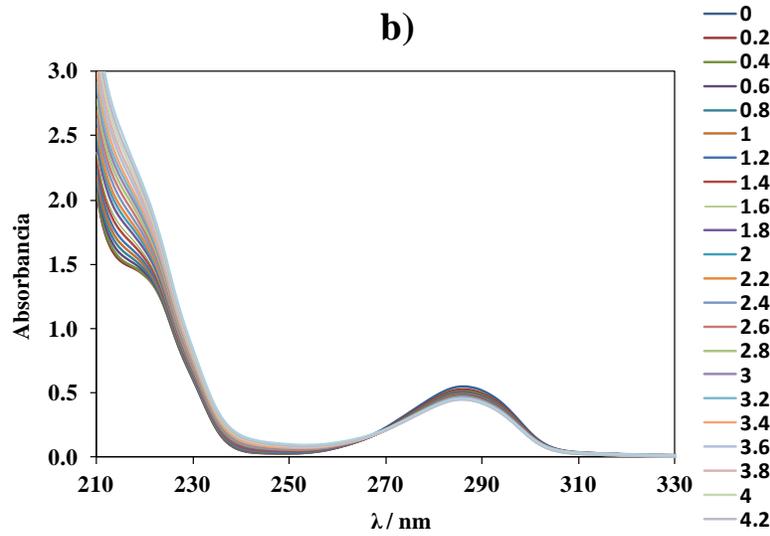
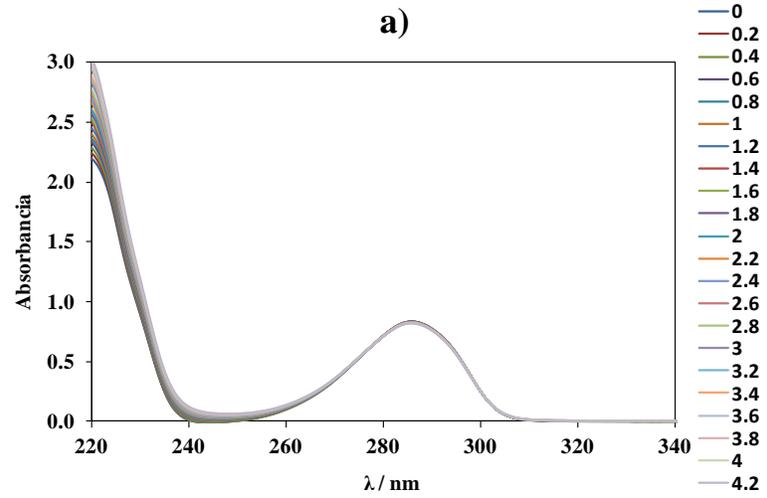
3.2.2 Adición Cu^{2+} a LQM

En una celda termostataada se coloca:

- 8.0 mL de HClO_4 0.1 M
- 1.0 mL de LQM 2.63×10^{-3} M
- Ajuste de pH con NaOH y se aforo a 10 mL.

Se realizaron adiciones de 20 μL de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.63×10^{-2} M.

Se obtuvieron cinco conjuntos de espectros de relaciones molares a diferentes valores de pH (*figura 3.7*). El pH en cada serie corresponde al promedio de los valores que se tenían en cada adición, ya que para cada volumen agregado de cobre el valor de pH cambió sin tener una modificación significativa (menor a una unidad al final de todas las adiciones).



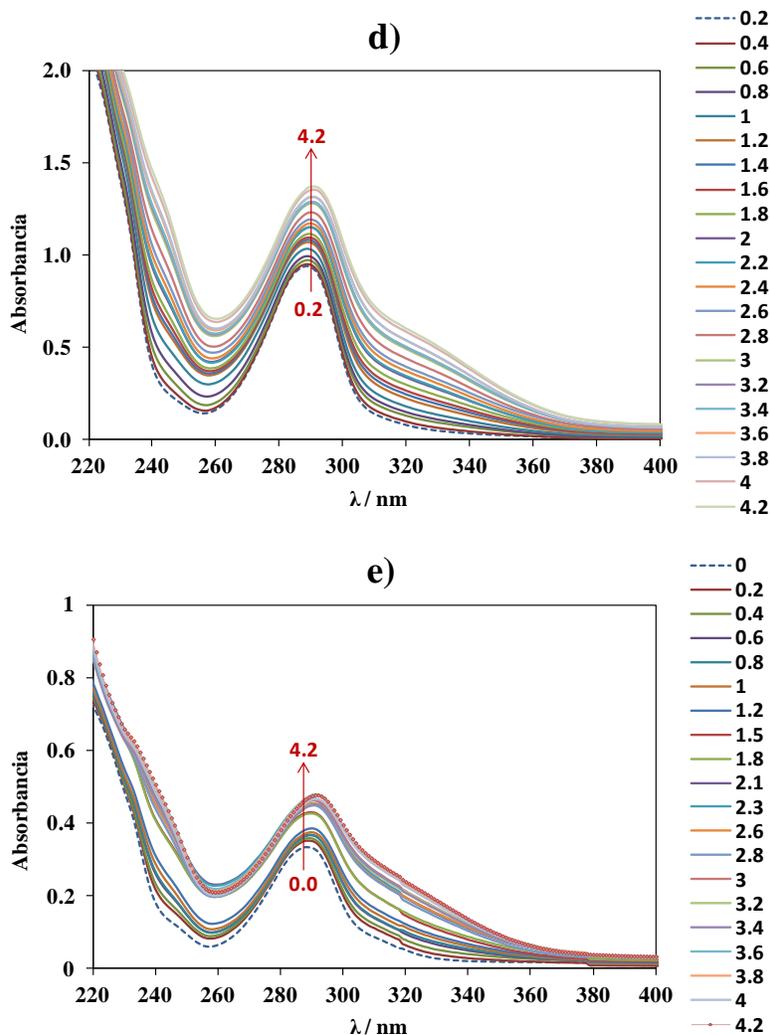


Figura 3.7. Serie de espectros UV-vis, variación de la relación molar a pH fijo. a) pH=3.389, b) pH=4.220, c) pH=4.977, d) pH=5.422, y e) pH=5.962.

A partir de los grupos de espectros a diferente pH se construye la gráfica para el método de Relaciones Molares, seleccionando una longitud de onda en la cual se observe una modificación en la forma del espectro lo que es indicio de la formación de una especie química.

En la construcción de ésta gráfica se trabajó con los valores de Absorbancia corregidos por dilución, esto se obtiene con el valor experimental de absorbancia multiplicado por el factor de dilución (ecuación 10, sección 3.1.2).

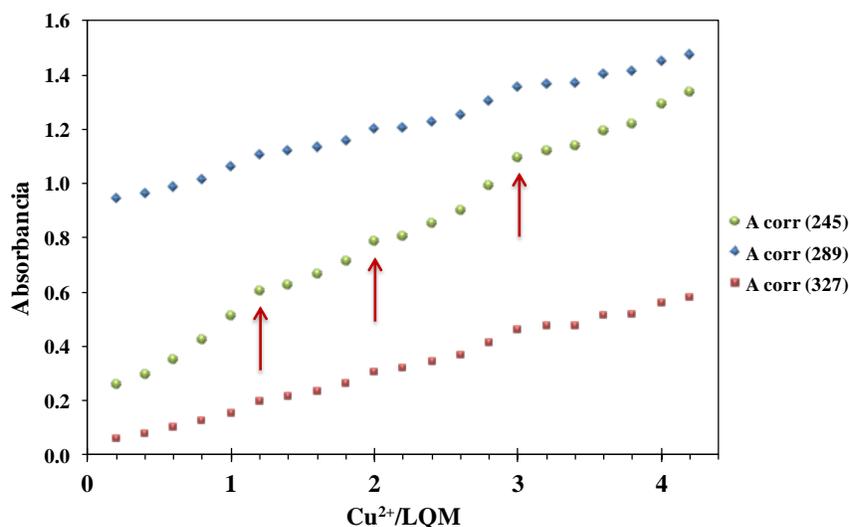
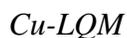


Figura 3.8. Gráfica de Relaciones Molares para adiciones de Cu^{2+} a una concentración fija de LQM; pH = 5.442 y tres longitudes de onda, 245, 289 y 327nm.

Se construye la gráfica de Relaciones Molares a diferentes longitudes de onda, con el objetivo de determinar las posibles estequiometrias de los complejos formados. En la *figura 3.8* se marcan tres posibles estequiometrias correspondiente a la serie de pH = 5.422, las estequiometrias pertenecen a la relaciones molares $1\text{Cu}-1\text{LQM}$, $2\text{Cu}-1\text{LQM}$ y $3\text{Cu}-1\text{LQM}$. En este estudio realizado y en base a la *figura 3.8* podemos observar los cambios de pendiente a las tres relaciones molares antes mencionadas. Sin embargo, el cambio de pendiente es muy pequeño, esto nos lleva a la conclusión de que la probable reacción de formación de complejos entre cobre y LQM es poco cuantitativa. Se plantea así el análisis de las siguientes relaciones molares como una posibilidad en los complejos formados.



Posteriormente se realizará el análisis de estas dos relaciones a diferente valor de pH, esto con el objetivo de analizar la formación del (o los) complejo (s) de Cu-LQM y así poder determinar el intervalo de pH en el que se forman. Además, el estudio de las diferentes relaciones molares será de utilidad para poder obtener las constantes de complejación de las especies formadas.

3.3 RELACIÓN MOLAR Cu/LQM CONSTANTE

En resumen y de acuerdo a lo presentado en la sección 3.2, se continúa el estudio de interacción cobre-LQM analizando las siguientes relaciones molares.

- ✦ 1:1 Cu^{2+} - LQM
- ✦ 1:2 Cu^{2+} - 2LQM
- ✦ 2:1 $2Cu^{2+}$ -LQM

En cada una de éstas estequiometrías se examinará el comportamiento en diferentes valores de pH. Esto se describirá en las siguientes secciones en donde se presentan los resultados del estudio de la relación molar constante en función de pH.

3.3.1 ANÁLISIS DE “RELACIÓN MOLAR 1:1”

Para el primer estudio se fijaron las concentraciones iniciales que corresponden a una relación 1:1 de Cu^{2+} y LQM. Se realizó un análisis variando el pH mediante la adición de NaOH. Para cada cambio de pH se obtuvo el espectro UV-Vis correspondiente.

Se parte de una mezcla equimolar de Cu y LQM. Esta disolución se preparó a partir de soluciones de $CuCl_2$ y LQM, aforadas a 10 mL con una mezcla de $HClO_4$ 0.1 M y metanol 50% v/v. El ácido perclórico tenía como finalidad imponer un pH ácido y con esto lograr el estudio en un intervalo amplio de pH. El metanol se utilizó para aumentar la solubilidad del LQM.

En la *figura 3.9 a) y b)* se presenta el conjunto de espectros de absorción obtenidos. Se puede observar, a una longitud de onda aproximada de 310 nm, un aumento en la absorbancia a medida que aumenta el pH. La banda característica del LQM que aparece a 286 nm tiene un efecto hipercrómico al aumentar el pH de la solución.

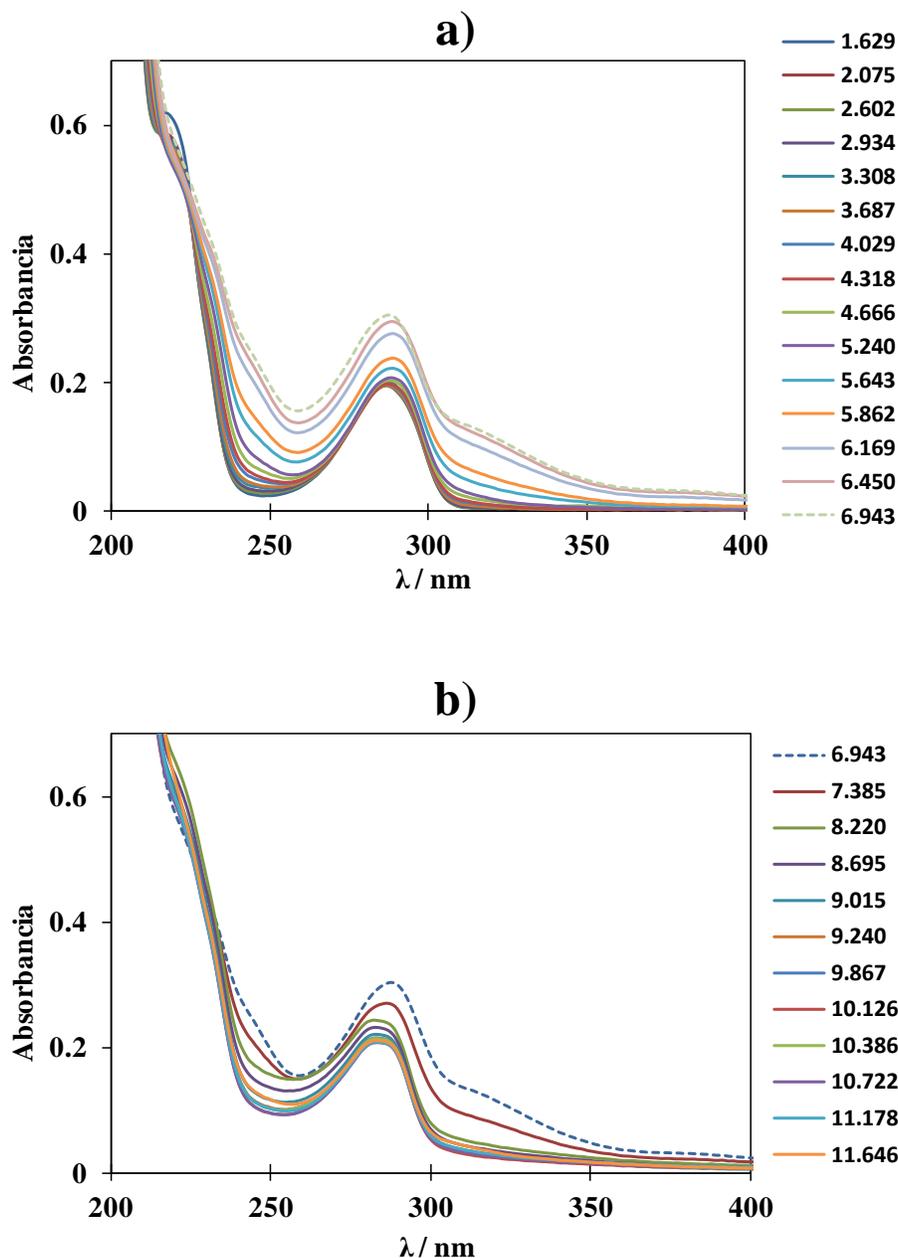


Figura 3.9. Espectros UV-Vis de Relación Molar 1Cu-1LQM en función de pH.
a) $1.629 \leq \text{pH} \leq 6.943$ y b) $6.943 \leq \text{pH} \leq 11.646$.

Enseguida se muestra la gráfica de absorbancia en función de pH para la serie de espectros UV-vis de la *figura 3.9*. Se probaron 6 longitudes de onda distintas que van de 216 nm hasta 320 nm, y se presentan dos valores de longitud en las cuales se observa con mayor claridad el cambio en la forma del espectro (*figura 3.10*).

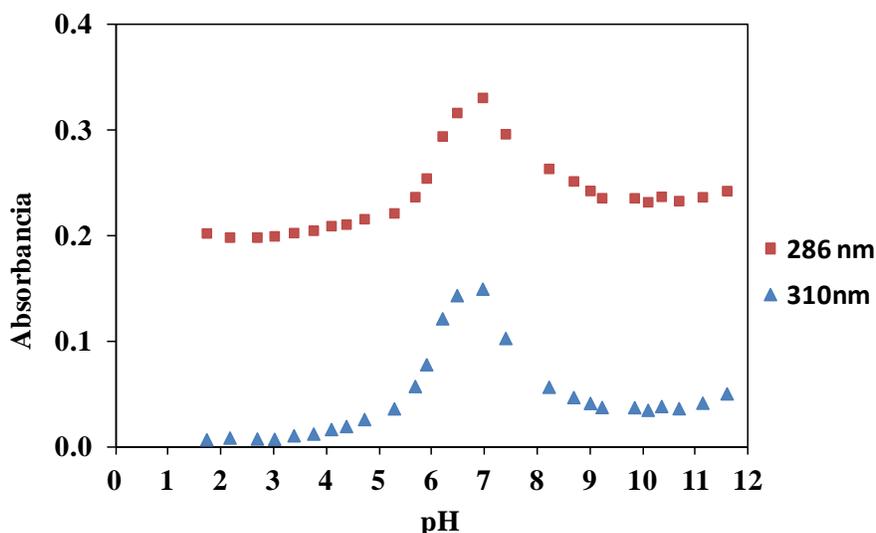


Figura 3.10. Relación molar 1Cu-1LQM. Absorbancia en función de pH a una longitud de onda de 286 y 310 nm. Los valores de Absorbancia y pH se corrigieron por efecto de dilución mediante, ec. 10 sección 3.1.2 y ec. 1 sección 2.1.2, respectivamente.

De acuerdo a lo observado en la *figura 3.10* podemos formular como hipótesis, que en el intervalo de pH entre 6 y 7 se tiene la presencia de una nueva especie o un equilibrio químico distinto a los ya existentes. Para explicar lo anterior de manera clara, se realizará una comparación gráfica de los espectros correspondientes a las especies involucradas. Así en la *figura 3.11* se comparan los espectros de Cu-LQM (mezcla) y LQM (solo). Ambos experimentos se realizaron utilizando HClO₄ 0.1 M en metanol, solución al 50% v/v.

Los espectros UV de Cu-LQM (línea continua) corresponden a la relación molar 1:1 presentados en esta sección. Los espectros de LQM (línea punteada) pertenecen a una valoración de LQM en función de pH realizada exclusivamente para esta comparación. Ambos experimentos tienen la misma concentración de LQM 5.25×10^{-5} M.

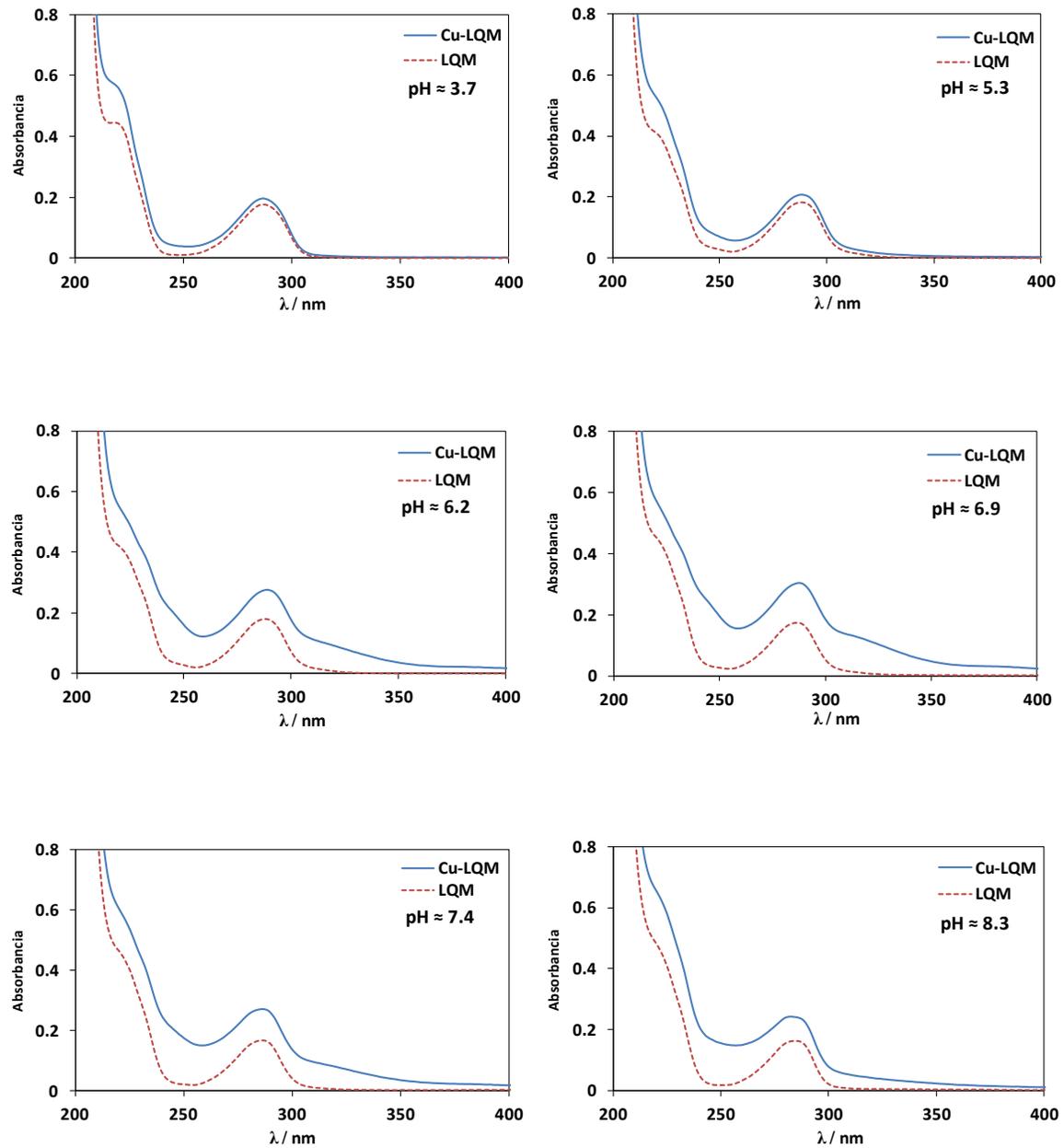


Figura 3.11. Comparación de espectros UV-Vis a diferente valor de pH, correspondientes a las soluciones de LQM (línea punteada) y Cu-LQM (línea continua).

En la *figura 3.11* observamos una serie de espectros en los cuales se presenta una comparación entre la forma del espectro de LQM y el espectro de la mezcla Cu-LQM. Con ayuda de esta comparación podemos ver que la forma de los espectros se modifica conforme aumenta el pH, inicialmente a pH ácidos la banda que se observa entre 280 y 300 nm comienza a crecer provocando que la absorbancia máxima (en esta longitud de onda) aumente conforme aumenta el pH. Al llegar a un pH aproximado de 6.9 la absorbancia empieza a disminuir.

3.3.2 ANÁLISIS DE “RELACIÓN MOLAR 2-1”

A continuación se presentan los resultados para el estudio en el cual se fijaron las concentraciones iniciales que corresponden a una relación 2:1 de Cu^{2+} y LQM. Se realiza un análisis para esta relación molar variando el pH mediante la adición de NaOH. Al igual que en la sección anterior se obtiene el conjunto de espectros correspondientes a este análisis, *figura 3.12 a) y b)*.

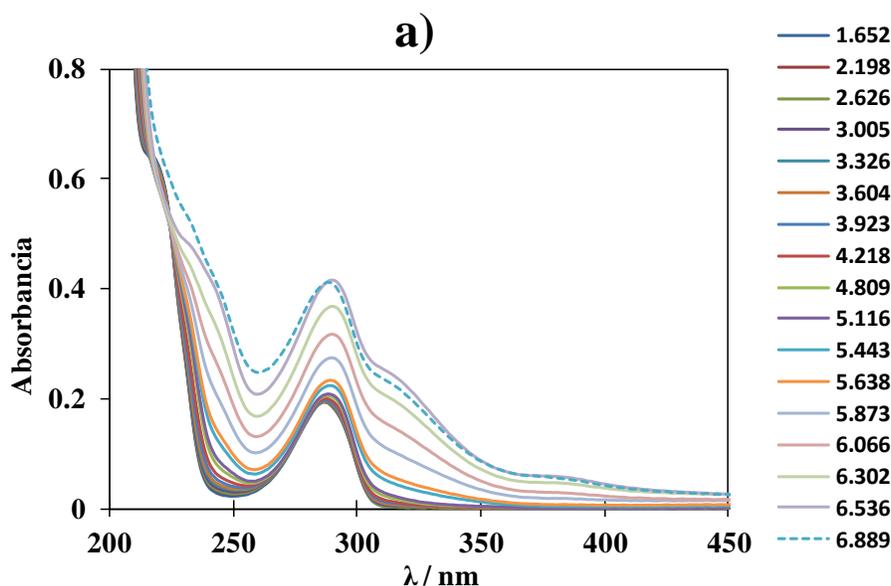


Figura 3.12 a). Espectros UV-Vis de Relación Molar 2Cu-1LQM en función de pH.
 $1.652 \leq \text{pH} \leq 6.889$.

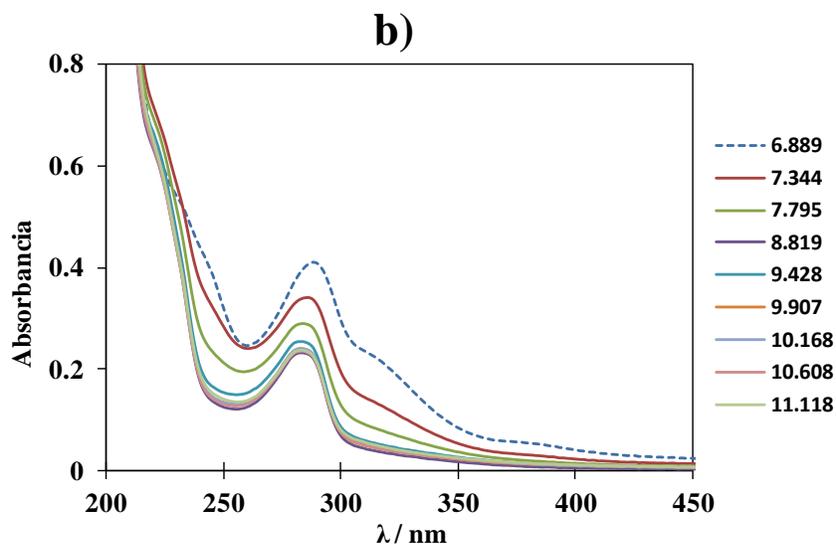


Figura 3.12 b). Espectros UV-Vis de Relación Molar 2Cu-1LQM en función de pH.
6.889 ≤ pH ≤ 11.118.

La gráfica de absorbancia en función de pH para el conjunto de espectros UV-vis se presenta en la *figura 3.13*, la cual pertenece a una relación 2:1. Se graficaron algunas longitudes de onda en las cuales se observa un cambio en el espectro, y al igual que en la sección anterior se presentan dos longitudes de onda representativas, 286 nm que es la longitud de onda característica en la cual absorbe el LQM303, y 310 nm que es la longitud estudiada en la relación molar 1:1.

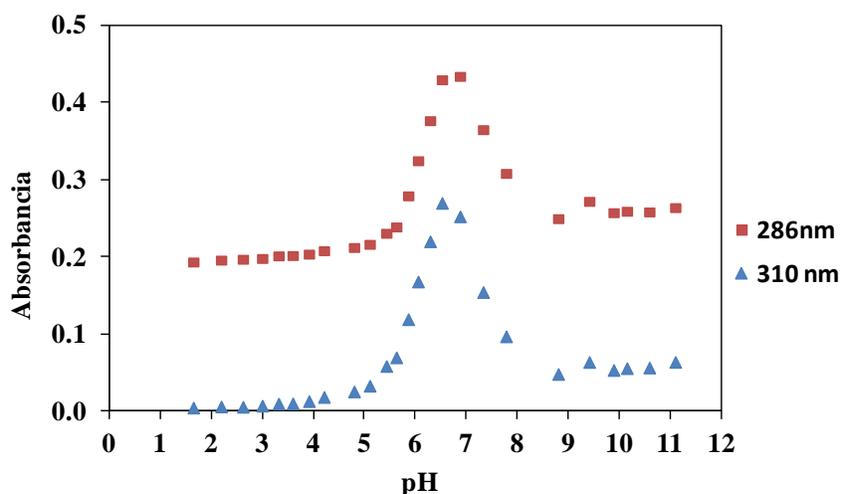


Figura 3.13. Relación molar 2Cu-1LQM. Absorbancia en función de pH a una longitud de onda de 286 y 310 nm. Los valores de Absorbancia y pH se corrigieron por efecto de dilución mediante, ec. 10 sección 3.1.2 y ec. 1 sección 2.1.2, respectivamente.

En la *figura 3.13* podemos observar un comportamiento similar a los resultados obtenidos en el estudio de la relación 1:1. En un intervalo de pH entre 5 y 6 se tienen los mayores cambios en absorbancia, después de pH 7 el valor de absorbancia disminuye hasta llegar a pH 9 en donde se mantiene sin grandes cambios.

Al igual que en la sección anterior se muestra una comparación de espectros de LQM en presencia de cobre y sin cobre, para poder determinar de manera clara la región en la cual se modifica la forma del espectro.

COMPARACION DE ESPECTROS DE "LQM" CON Y SIN COBRE

En este caso la comparación corresponde a la relación molar 2Cu-LQM y LQM (solo). Ambos experimentos se realizaron utilizando HClO₄ 0.1 M en metanol, solución al 50% v/v. Los espectros de Cu-LQM (*línea continua*) pertenecen al conjunto mostrado en la *figura 3.12* de relación molar 2-1, los espectros UV de LQM (*línea punteada*) se toman de la valoración de LQM en función de pH realizada en las mismas condiciones experimentales. En ambas series se tiene la misma concentración de LQM 5.25×10^{-5} M.

La *figura 3.14* presenta la comparación del espectro de LQM y de la mezcla Cu-LQM. En este caso, de manera similar al estudio de la relación molar 1:1, a valores de pH ácidos no se observa una modificación grande en la zona de la banda de absorción característica del LQM. La diferencia más notoria la podemos observar en aproximadamente 310 nm, en donde se distingue la formación de una banda a pH = 6.9.

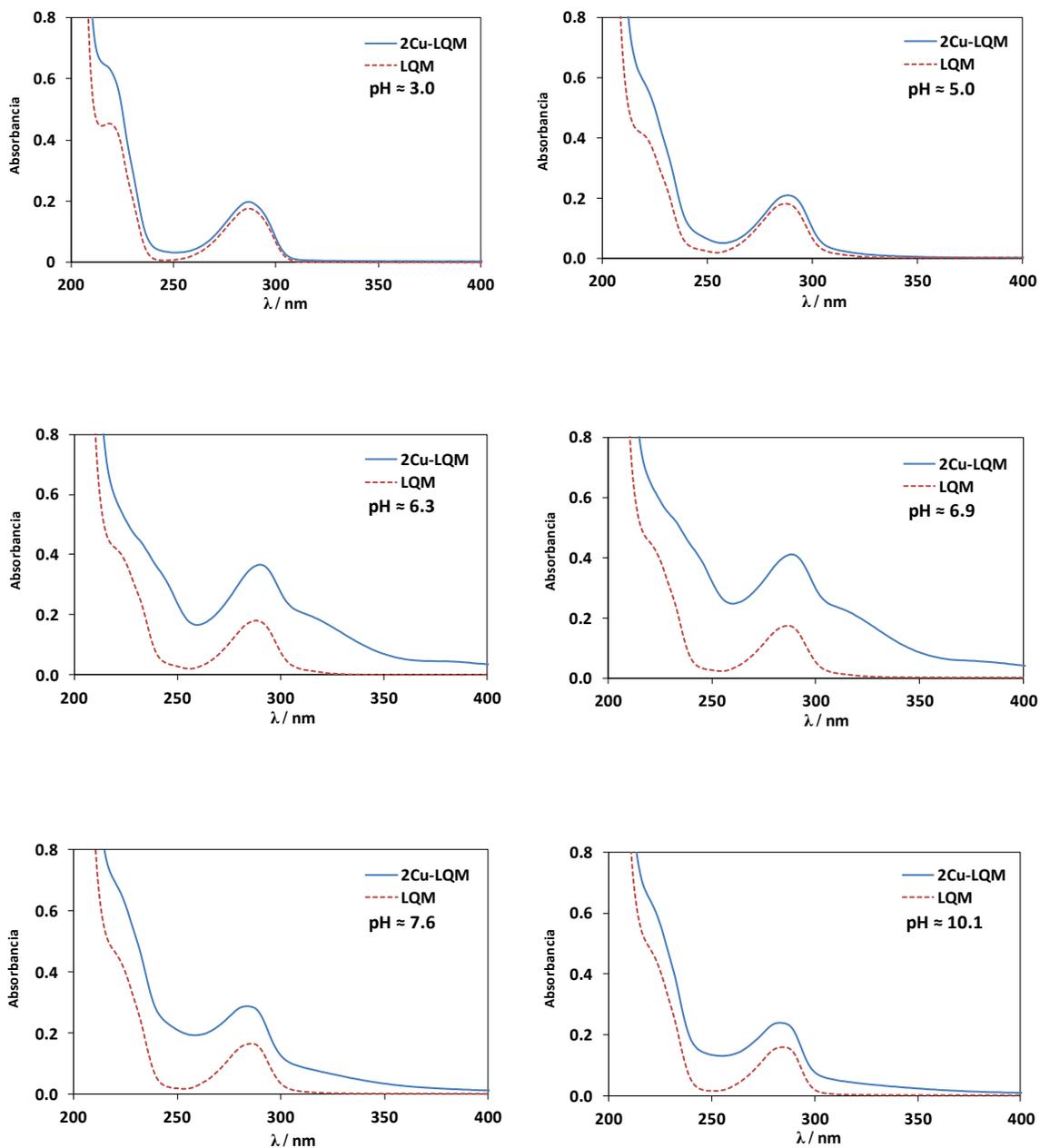


Figura 3.14. Comparación de espectros UV-Vis a diferente valor de pH, correspondientes a las soluciones de LQM (línea punteada) y 2Cu-1LQM (línea continua).

3.3.3 ANÁLISIS DE “RELACION MOLAR 1-2”

Se presentan los resultados correspondientes al estudio de la relación 1:2 de Cu^{2+} y LQM. De la misma forma que en los dos apartados anteriores, se realiza el análisis del comportamiento en función del pH. La *figura 3.15* corresponde al conjunto de espectros UV obtenidos para este estudio.

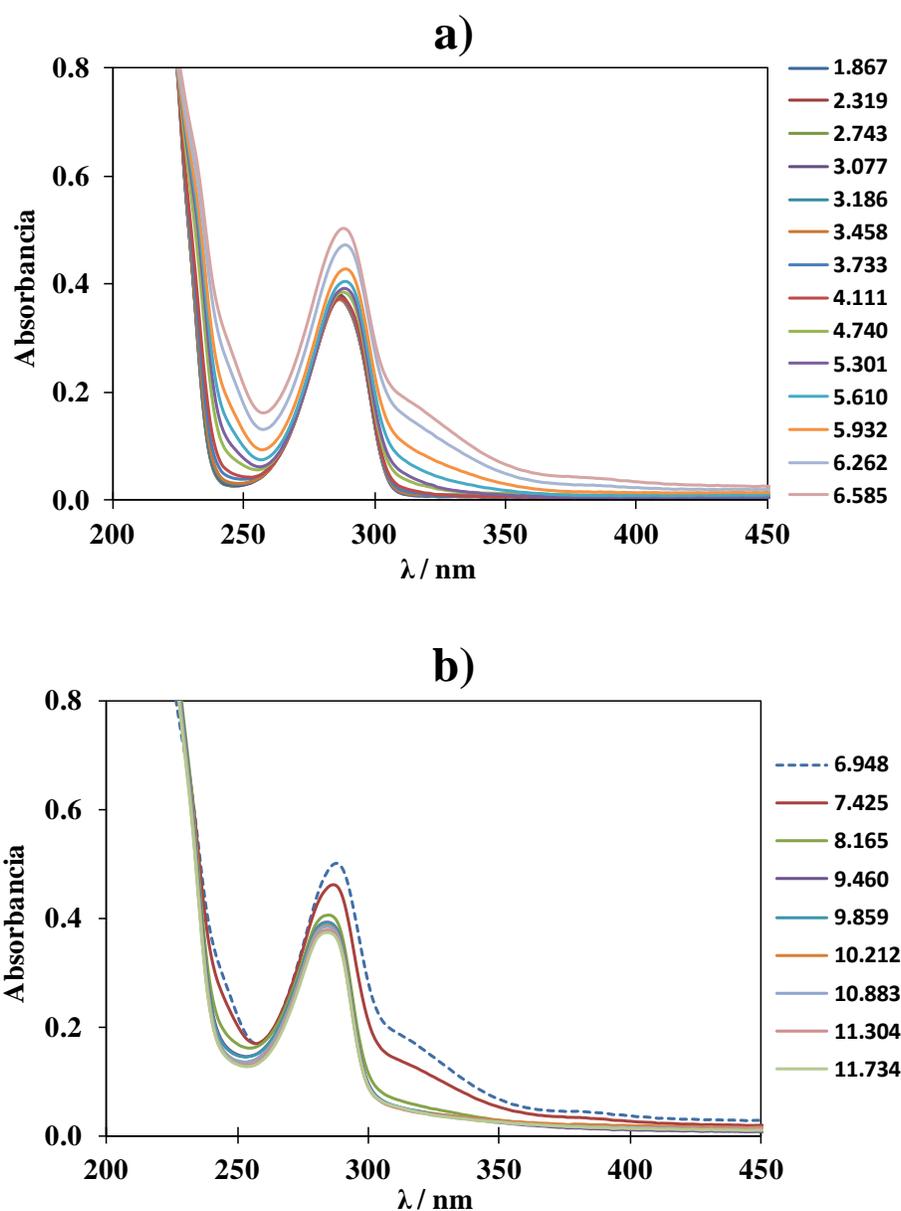


Figura 3.15. Espectros UV-Vis de Relación Molar 1Cu-2LQM en función de pH. El intervalo de pH es: a) $1.867 \leq \text{pH} \leq 6.585$ y b) $6.948 \leq \text{pH} \leq 11.734$.

Se construye la gráfica de Absorbancia en función de pH y se presentan datos a dos longitudes de onda analizadas en las secciones anteriores.

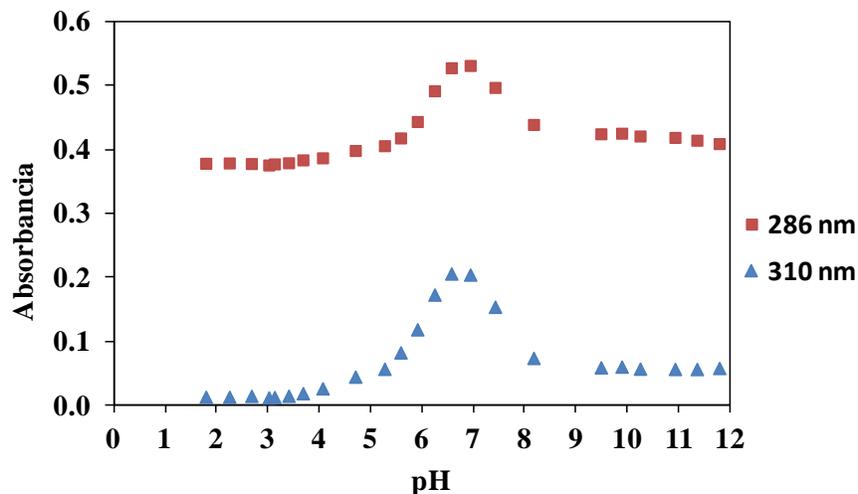


Figura 3.16. Relación molar 1Cu-2LQM. Absorbancia en función de pH a una longitud de onda de 286 y 310 nm. Los valores de Absorbancia y pH se corrigieron por efecto de dilución mediante, ec. 10 sección 3.1.2 y ec. 1 sección 2.1.2, respectivamente.

Como se puede observar en la *figura 3.16*, la absorbancia tiene un incremento máximo entre pH 6 y 7, esto coincide con los resultados obtenidos anteriormente. En las dos secciones anteriores se presentó una comparación de espectros UV para mostrar la formación de una banda entre 300 y 350 nm. En este caso los espectros de Cobre-LQM (relación 1-2), tienen una concentración de cobre igual a 5.25×10^{-5} M y para el LQM se tiene 1.05×10^{-4} M.

Ahora se presentan los espectros de Cu-LQM y LQM (*figura 3.17*), recordando que la concentración de LQM en la mezcla es el doble. Cabe señalar que al tener una concentración mayor en los espectros correspondientes a Cu-LQM únicamente modificará la banda de absorción presente en 286 nm. El objetivo de esta comparación únicamente es mostrar la banda que aparece entre 300 y 350 nm, descrita en las secciones previas.

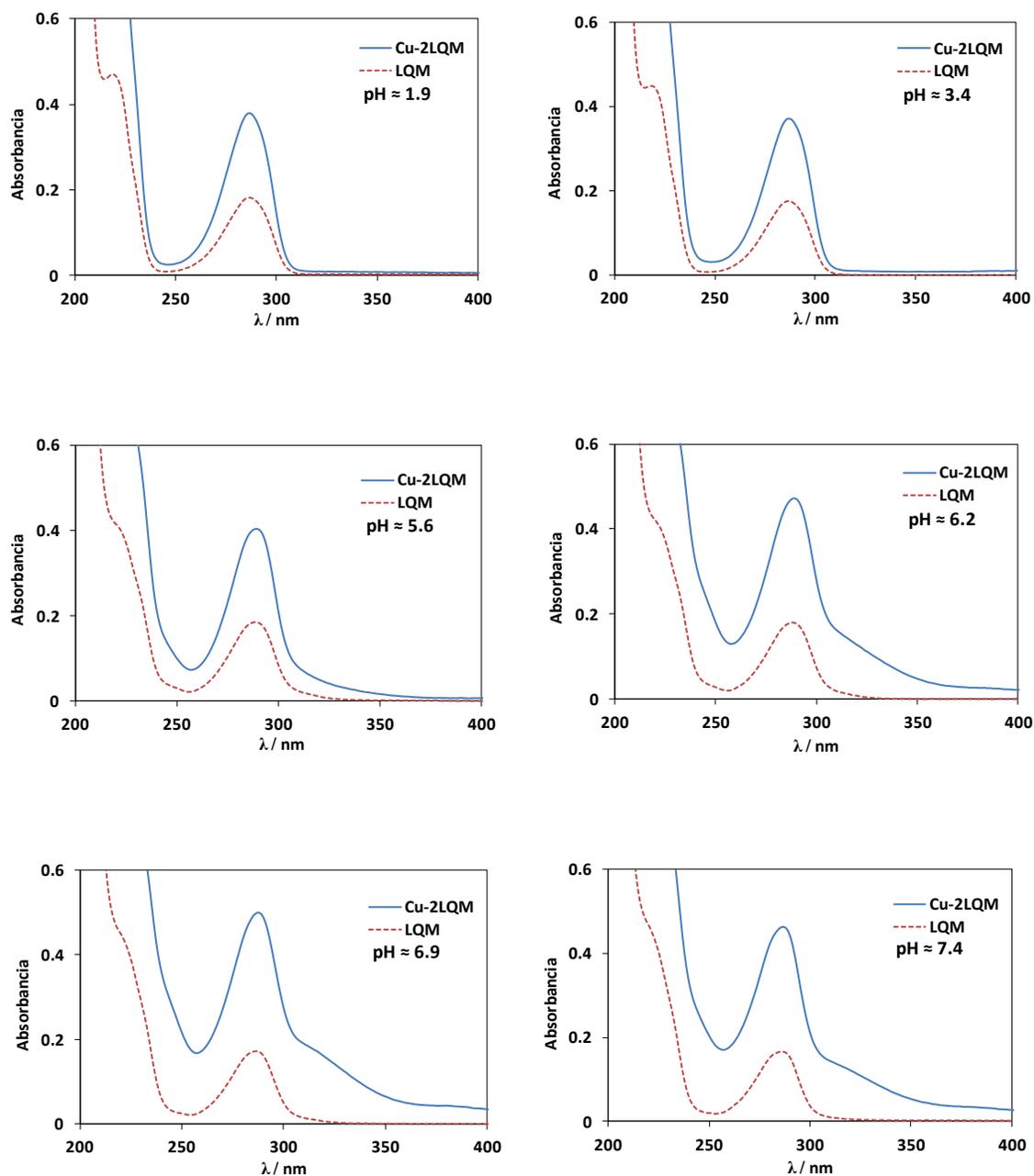


Figura 3.17. Comparación de espectros UV-Vis a diferente pH de Cu-LQM (línea continua) y LQM (línea punteada).

Al igual que en las relaciones molares 1:1 y 2:1 de Cu-LQM, la forma del espectro se modifica al aumentar el pH y también aparece una nueva banda después de 300 nm

Como conclusión de estos tres análisis realizados para las diferentes relaciones molares se puede argumentar en base a la comparación de espectros, que existe una posible formación de una especie de cobre y LQM, la cual se lleva a cabo en el intervalo de pH entre 6 y 7. Esto se puede inferir debido a la aparición de una banda de absorbancia entre 300 y 350 nm. Esta banda se forma debido a la adición de cobre al sistema de LQM. Para las tres relaciones molares analizadas, la formación de la nueva banda de absorción es más evidente en la relación 2Cu-LQM, lo cual podría indicar el predominio de esta relación molar en las nuevas especies formadas de Cu-LQM.

3.4 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES “DATAN”

Se utilizó el programa DATAN [39] para analizar los datos de las tres relaciones molares discutidas en la sección 3.3, esto con el objetivo de saber cuántas especies estarán presentes en el sistema de acuerdo al análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) [40]. Estas especies presentes en el sistema incluyen tanto a las especie de LQM como las nuevas especies formadas de Cu-LQM.

Un resultado que obtenemos con DATAN a través del análisis de componentes principales son las gráficas de ruido, que nos sirven para determinar el número de factores presentes en el sistema. A partir del primer componente que muestre ruido se considera que los demás factores no contribuyen a la descripción del sistema [41, 42].

Por lo tanto, como se observa en la *figura 3.18*, se tiene para la relación 2Cu-1LQM de 4 a 5 factores ya que en el sexto componente PC6 ya presenta ruido. En el caso de 1Cu-1LQM según la gráfica de ruido se puede considerar hasta 6 factores y, finalmente para la relación 1Cu-2LQM se pueden considerar 5 factores que reconstruyen la información de la matriz original.

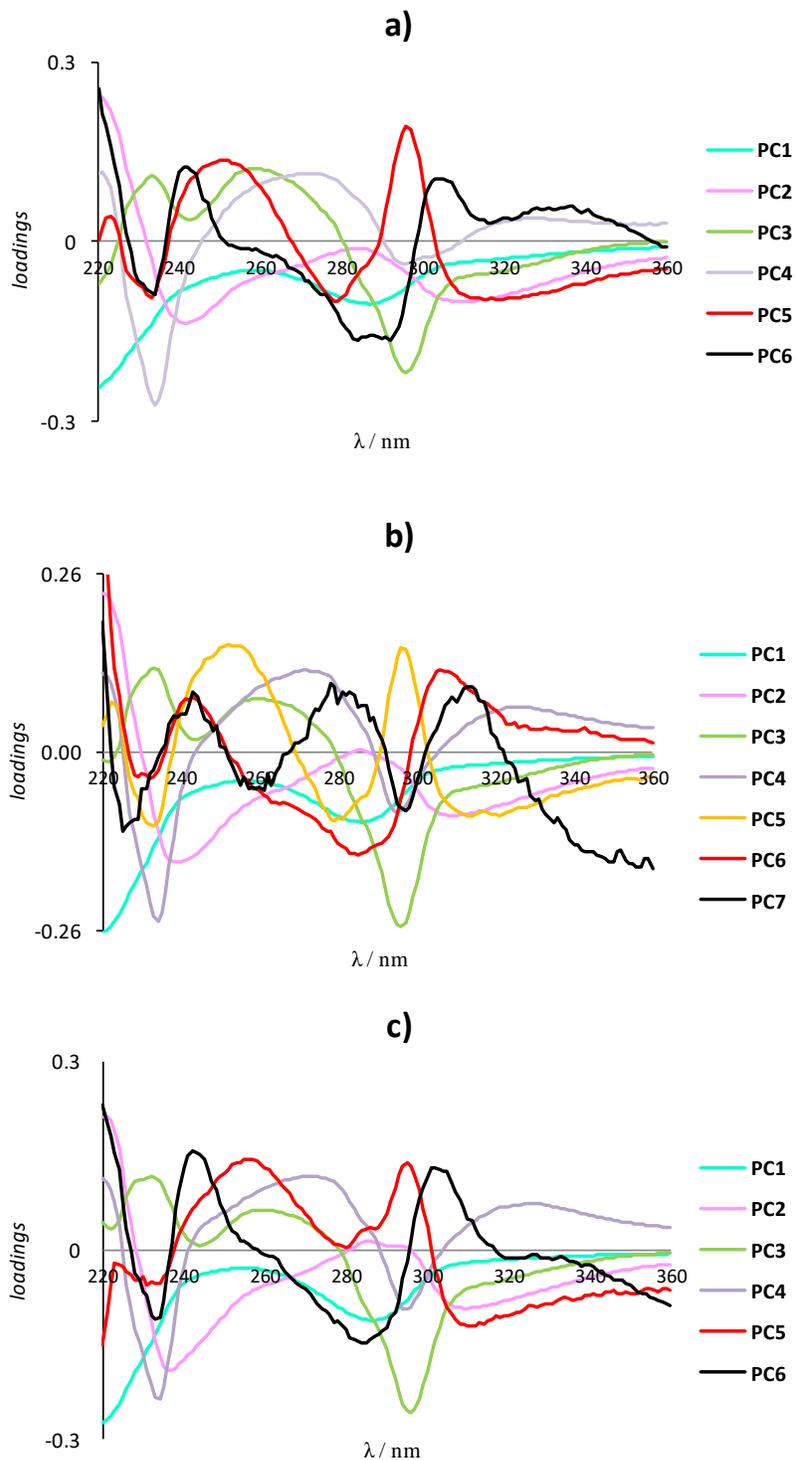


Figura 3.18. Análisis de componentes principales de los datos de relación molar fija, a) 2Cu-LQM, b) Cu-LQM y c) Cu-2LQM para los *loadings* que se representan como el ruido de la señal correspondiente a los factores necesarios para construir el 100% de la información de la matriz original [41].

Según el porcentaje de varianza acumulada (*tabla 3.1*) redondeada a la milésima, con ayuda de las gráficas de ruido de las *figuras 3.18*, se tienen 5 factores máximo para las relaciones 2Cu-1LQM y 1Cu-2LQM . Para la relación $1:1$ se tiene hasta 6 factores; por lo tanto para realizar el análisis de todos los datos experimentales se decidió tomar 5 componentes principales para las 3 relaciones molares estudiadas.

Tabla 3.1. Porcentaje de varianza acumulada para las tres relaciones molares fijas en función del pH (secciones 3.1.1, 3.3.2 y 3.3.3).

| 2Cu-1LQM | Cu-LQM | 1Cu-2LQM |
|-------------------|-----------------|-------------------|
| 94.635 | 97.238 | 97.323 |
| 99.283 | 99.358 | 99.208 |
| 99.880 | 99.915 | 99.901 |
| 99.984 | 99.990 | 99.997 |
| 99.998 | 99.997 | 99.999 |
| 100.000 | 99.999 | 100.000 |
| 100.000 | 100.000 | 100.000 |

Si nos basamos en estos resultados para proponer un conjunto de equilibrios que describan el sistema Cu-LQM tendremos máximo cinco especies presentes que absorben diferente. Dentro de estas cinco especies se cuentan las dos especies catiónicas de LQM (H_3L^{2+} y H_2L^+) que predominan a pH menor a 7 y el resto pertenecen a complejos de cobre, considerando complejos de cobre a las especies de Cu-LQM y el (los) hidroxocomplejo (s) de cobre presente.

De la misma forma se analizaron con PCA los resultados de las secciones 3.2.1 y 3.2.2 que a continuación se presentan. Para los datos correspondientes a las adiciones de LQM a cobre se tiene dos factores que reconstruyen el 100% de la información original como se muestra en la *figura 3.19*.

De acuerdo al análisis de componentes principales y las gráficas de ruido (*figura 3.19*) para los datos del estudio de adiciones de cobre a LQM, se tienen hasta 4 factores presentes en el sistema.

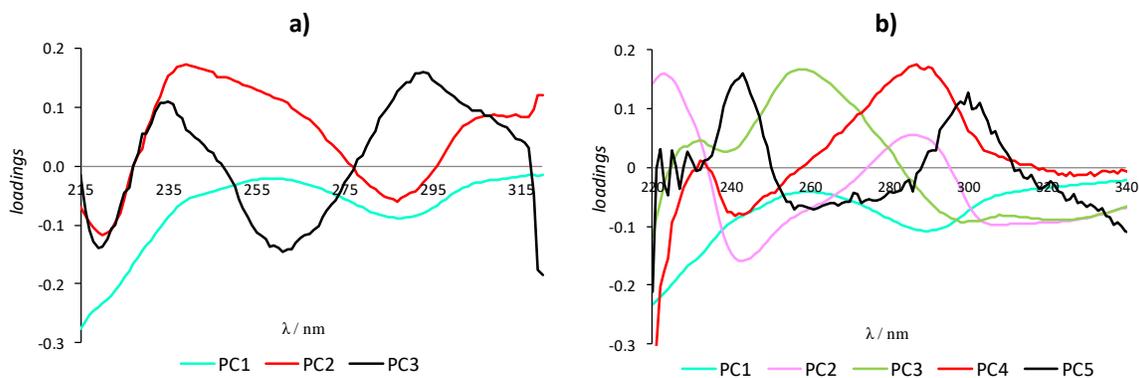


Figura 3.19. Resultados obtenidos con DATAN para los *loadings* que se representan como el ruido de la señal correspondiente a los factores necesarios para construir el 100% de la información de la matriz original[41]. a) adiciones de LQM a Cu^{2+} ; pH = 5.116, b) adiciones de Cu^{2+} a LQM; pH = 5.422.

La *tabla 3.2* contiene los porcentajes de varianza acumulada obtenidos con DATAN para el conjunto de datos perteneciente a las adiciones de LQM a cobre (de concentración fija) en los cuales se tienen hasta dos factores presentes en el sistema si redondeamos a la centésima de acuerdo al ruido observado en la gráfica de *loadings*. Para el análisis de componentes principales de las adiciones de cobre a LQM (de concentración fija) se tienen 3 factores de acuerdo a los valores de porcentaje de varianza mostrada en la *tabla 3.2* y redondeados a la milésima acorde al ruido observado en la *figura 3.19*.

Tabla 3.2. Porcentaje de varianza acumulada para las tres relaciones molares fijas en función del pH presentadas en las secciones 3.1.1, 3.3.2 y 3.3.3.

| Adiciones de LQM a Cu^{2+} (pH=5.116) | Adiciones de Cu^{2+} a LQM (pH=5.422) |
|--|--|
| 99.95 | 98.958 |
| 99.99 | 99.995 |
| 100.00 | 99.999 |
| 100.00 | 100.000 |

En conclusión, y de acuerdo al análisis de componentes principales realizado para los diferentes conjuntos de datos presentados en la sección 3.4, se realizarán los ajustes con SQUAD proponiendo un conjunto de equilibrios que involucra cinco especies que absorben diferente en el sistema.

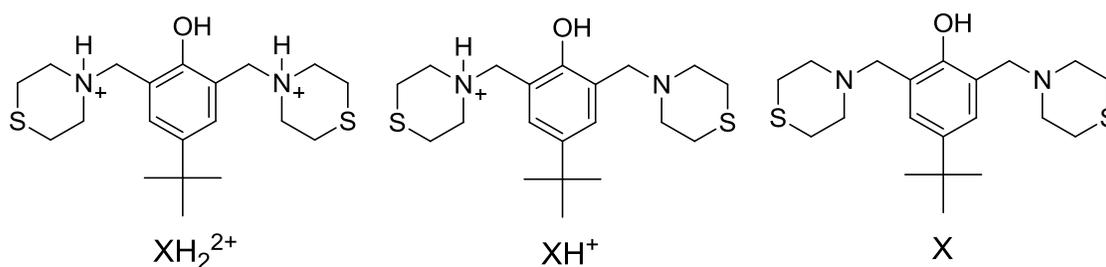
3.5 CÁLCULO DE CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN

Cu-LQM (medio acuoso)

A continuación se presenta el cálculo de los valores de constantes de complejación entre cobre y LQM. Se utilizaron los datos experimentales de los conjuntos de espectros de absorción presentados en la sección 3.3 para las tres relaciones molares estudiadas (1:1, 2:1, 1:2, de cobre y LQM respectivamente).

Con ayuda del programa SQUAD se realizó el ajuste de los datos experimentales completos, es decir, el grupo de datos está formado por las tres relaciones molares. De acuerdo a lo encontrado con el software DATAN a través del análisis de componentes principales (sección 3.4) se encontró un sistema con cinco especies de LQM y *Cu-LQM*, que absorben radiación electromagnética de manera distinta. Teniendo en cuenta lo anterior se probaron modelos con 3, 4 y 6 componentes para comprobar si el ajuste era bueno o no. En todos los ajustes probados se fijaron las dos especies catiónicas de LQM y un hidroxocomplejo de cobre (CuOH).

A continuación se definen las especies usadas en los ajustes con SQUAD, para de formación de complejos.



En la *tabla 3.3* se presentan algunas propuestas probadas en los ajustes, que van de 3 hasta 6 especies de *Cu-LQM*. Aquí además de realizar la comparación de espectros (ajustados vs experimentales) se toman en cuenta el valor de la desviación estándar de la regresión, en base a esto se decide cual será el mejor modelo que se ajusta a los datos experimentales.

Tabla 3.3. Conjuntos de especies Cu-LQM propuestas para los ajustes realizados con SQUAD. σ_{reg} es la desviación estándar de la regresión y U representa la suma de cuadrados.

| <i>Especie</i> | <i>log β</i> | <i>σ_{reg}</i> | <i>U</i> |
|--|-------------------------------|----------------------------------|----------|
| Cu X H | 14.229 | 2.539x10 ⁻² | 2.121 |
| Cu ₂ X ₂ | 19.192 | | |
| Cu ₂ X ₂ H | 25.589 | | |
| | | | |
| Cu X H | 13.916 | 1.777x10 ⁻² | 1.000 |
| Cu (OH) ₂ X ₂ | 1.911 | | |
| Cu ₂ X ₂ | 20.344 | | |
| Cu ₂ X ₂ H | 26.788 | | |
| | | | |
| Cu X H | 12.880 | 1.289x10 ⁻² | 0.536 |
| Cu ₂ (OH) ₂ X ₂ | 3.149 | | |
| Cu X ₃ | 19.090 | | |
| Cu ₂ X ₂ | 17.654 | | |
| | | | |
| Cu X H | 13.119 | 1.272x10 ⁻² | 0.123 |
| Cu ₂ (OH) ₂ X ₂ | 3.636 | | |
| Cu X ₃ | 19.322 | | |
| Cu ₂ X ₂ | 17.813 | | |
| Cu ₄ OH X ₂ | 20.888 | | |
| | | | |
| Cu X H | 13.208 | 1.121x10 ⁻² | 0.398 |
| Cu ₂ (OH) ₂ X ₂ | 3.965 | | |
| Cu X ₃ | 20.258 | | |
| Cu ₂ X ₂ | 18.331 | | |
| Cu ₂ X ₄ | 30.844 | | |
| | | | |
| Cu X H | 13.695 | 1.224x10 ⁻² | 0.474 |
| Cu ₂ (OH) ₂ X ₂ | 5.507 | | |
| Cu X ₃ | 22.276 | | |
| Cu ₂ X ₂ | 19.882 | | |
| Cu ₂ X ₂ H | 26.228 | | |
| Cu ₄ OH X ₂ | 22.511 | | |

Finalmente se concluyó que el conjunto de especies que mejor ajusta a los datos experimentales es un modelo con cinco especies de *Cu-LQM*. Dos de estas especies coinciden con los resultados presentados por Martínez-Mendoza [43] para su estudio de Cobre y LQM314. En la *tabla 3.4* se presenta el conjunto final de especies usada en el ajuste con SQUAD.

Tabla 3.4. Conjunto de especies propuesto para la formación de complejos *Cu-LQM*; valores de constantes de complejación. La desviación estándar de la regresión (σ_{reg}) es 1.247×10^{-2} y U vale 0.492.

| Especie | $\log \beta \pm \sigma$ | |
|--|-------------------------|--------|
| XH ₂ | 12.031 | Fβ; Fε |
| XH | 7.111 | Fβ; Fε |
| Cu X H | 13.292 ± 0.029 | Vβ; Vε |
| Cu ₂ (OH) ₂ X ₂ | 4.077 ± 0.067 | Vβ; Vε |
| Cu X ₃ | 20.216 ± 0.102 | Vβ; Vε |
| Cu ₂ X ₂ | 18.439 ± 0.067 | Vβ; Vε |
| Cu ₂ X ₂ H | 24.122 ± 0.124 | Vβ; Vε |
| CuOH ⁺ | -8.000 [*] | Fβ; Fε |
| Cu(OH) ₂ | -16.240 [†] | Fβ; Fε |

* valor tomado de Ringbom [44]

† valor tomado de la base de datos de Hidra (MEDUSA)

Fβ valor de $\log \beta$ fijo para el ajuste con SQUAD

Fε coeficientes de absorptividad fijos para el ajuste con

SQUAD

Vβ valor de $\log \beta$ variable y calculado en el ajuste con SQUAD

Vε coeficientes de absorptividad variables y determinados en

el ajuste con SQUAD

En este ajuste final para la determinación de las constantes de complejación de *Cu-LQM* se usaron dos hidroxocomplejos de cobre, CuOH y Cu(OH)₂, y dos especies de LQM. En el caso de los hidroxocomplejos de cobre, aunque no absorben en el intervalo de longitud de onda de trabajo, si dan estabilidad y ayudan a obtener un mejor resultado en el ajuste. Para los valores de constantes de acidez y coeficientes de absorptividad de las especies de LQM se usaron los valores determinados en la *tabla 2.16* (sección 2.5.2).

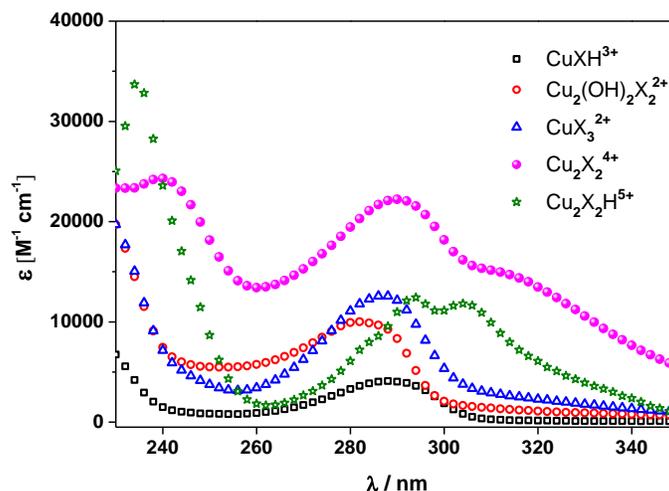


Figura 3.20. Coeficientes de absorptividad determinados con SQUAD para el conjunto de la *tabla 3.4*.

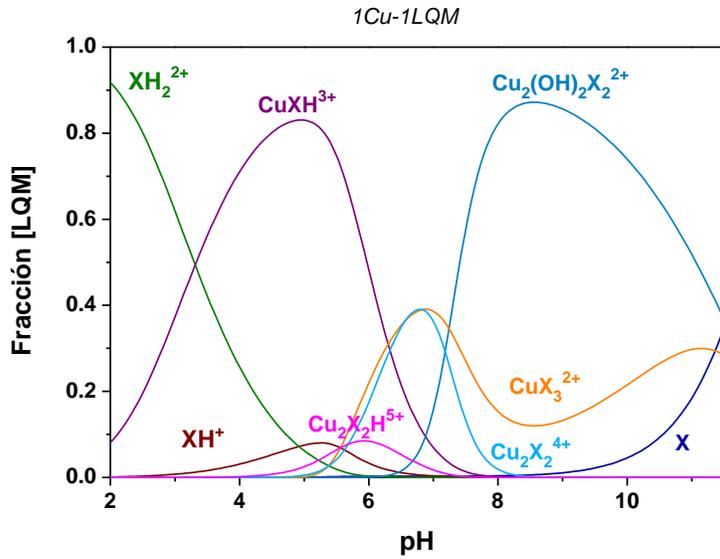


Figura 3.21. Relación molar 1:1
 $[Cu^{2+}]_{TOTAL}=5.25 \times 10^{-5}$ y
 $[LQM]_{TOTAL}=5.25 \times 10^{-5}$.

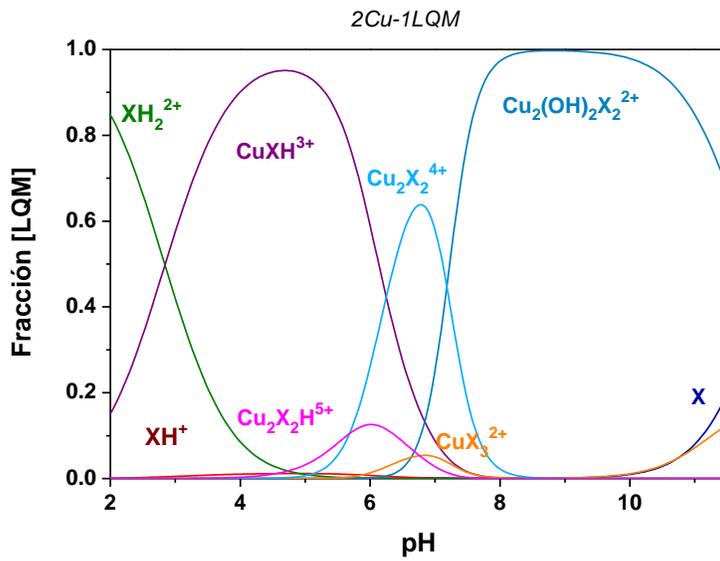


Figura 3.22. Relación molar 2:1
 $[Cu^{2+}]_{TOTAL}=1.05 \times 10^{-4}$ y
 $[LQM]_{TOTAL}=5.25 \times 10^{-5}$.

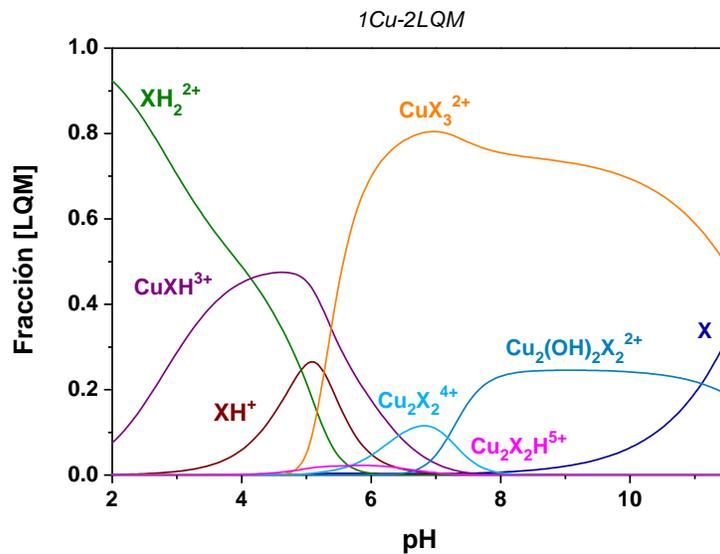


Figura 3.23. Relación molar 1:2
 $[Cu^{2+}]_{TOTAL}=5.25 \times 10^{-5}$ y
 $[LQM]_{TOTAL}=1.05 \times 10^{-4}$.

Con los valores de $\log \beta$ de la *tabla 3.4* y con el programa MEDUSA se construyeron los diagramas de distribución (*figuras 3.21, 3.22 y 3.23*) para cada una de las relaciones molares estudiadas, 1:1, 2:1 y 1:2. Cada uno de estos tres diagramas presentados, se construyeron con la respectiva concentración de trabajo dependiendo de la relación molar estudiada. Por último como paso adicional en la comprobación del modelo químico propuesto, se construyen los espectros de absorción utilizando los valores de $\log \beta$, los coeficientes de absorptividad determinados con SQUAD y las fracciones molares de los diagramas de distribución. Estos espectros ajustados son comparados con su correspondiente espectro experimental con el objetivo de concluir si el modelo propuesto describe de buena manera el comportamiento químico de nuestro sistema. *Figuras 3.24 a 3.26*.

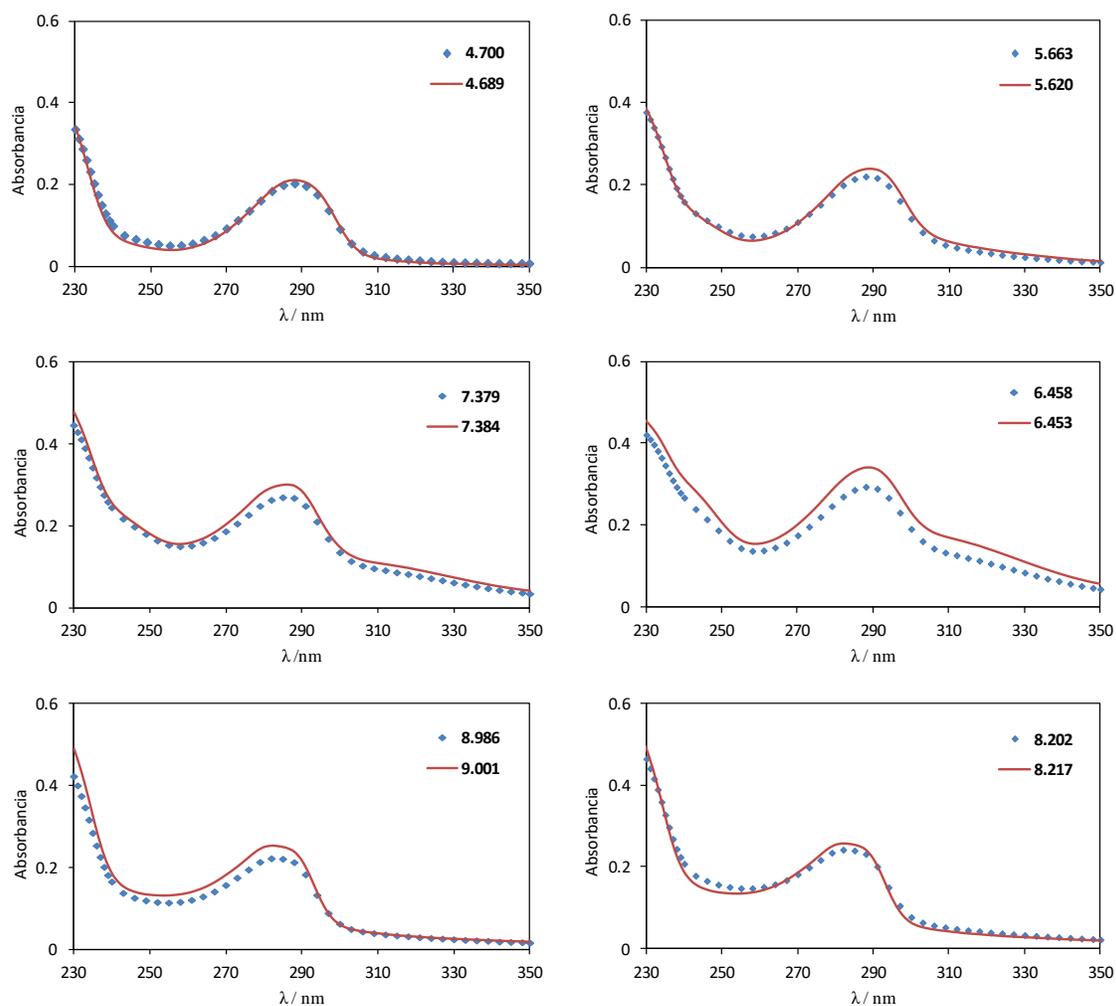


Figura 3.24. Comparación de espectros ajustados (línea continua) y espectro experimental (marcadores) a diferente pH, correspondiente a la relación molar 1Cu-1LQM.

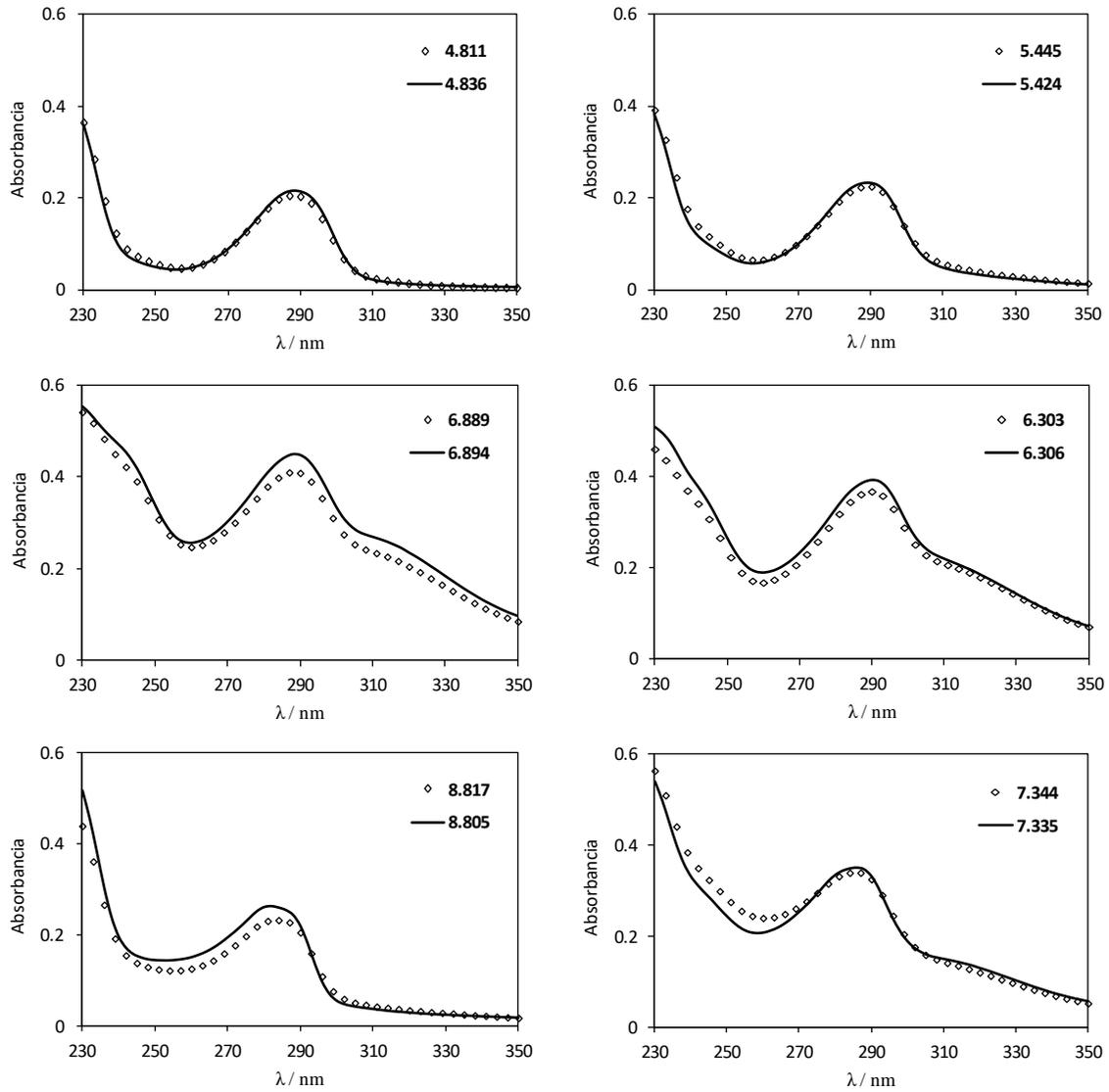


Figura 3.25. Comparación de espectros ajustados (línea continua) y espectro experimental (marcadores) a diferente pH, correspondiente a la relación molar $2Cu-1LQM$.

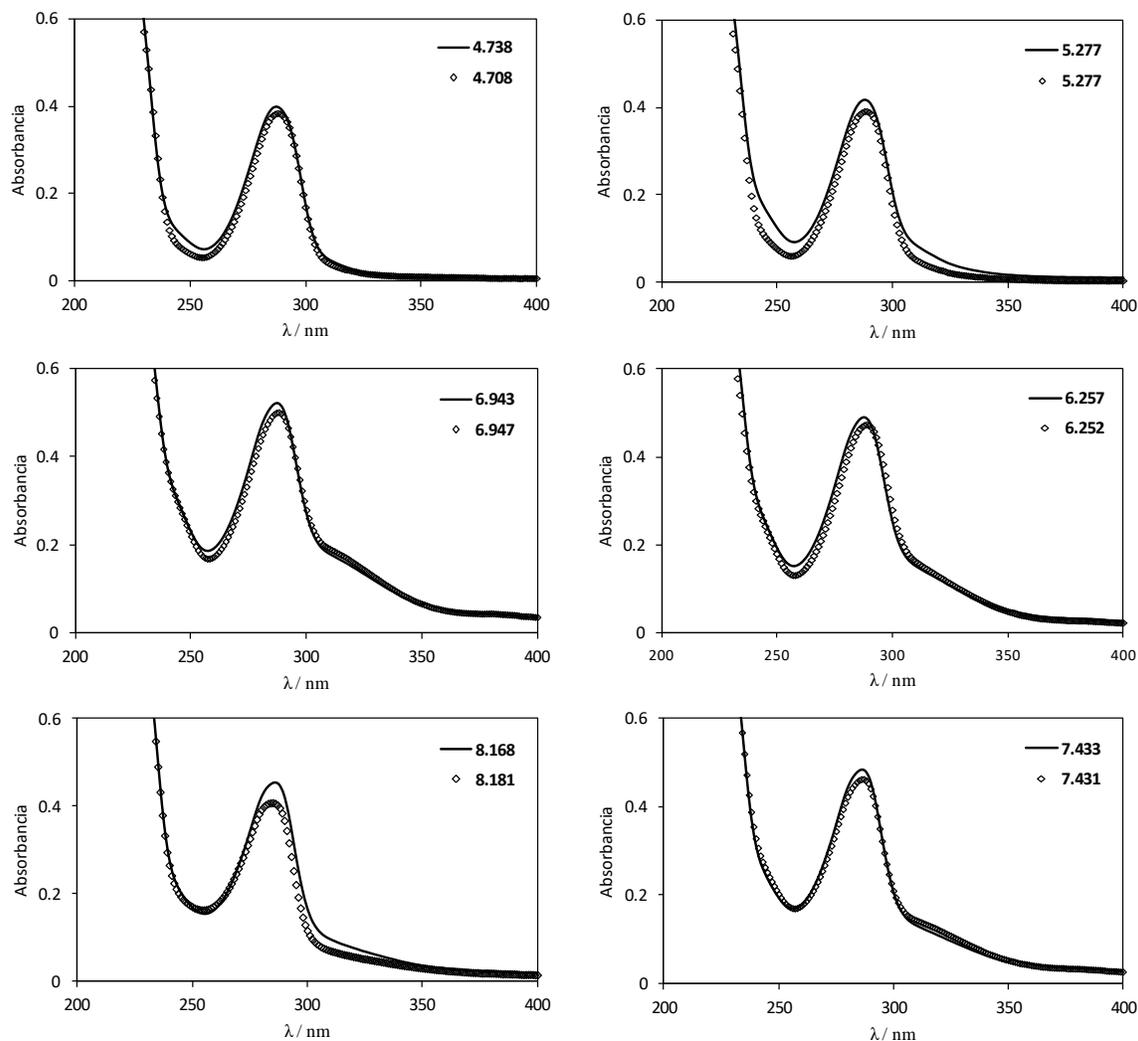
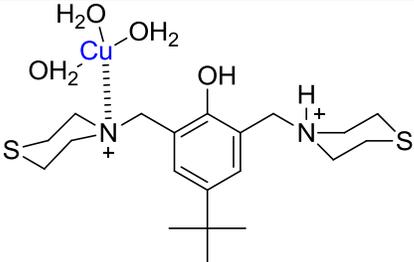
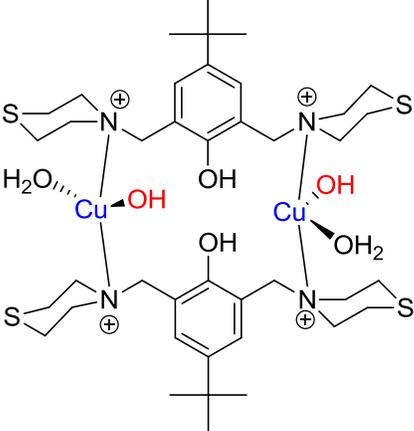
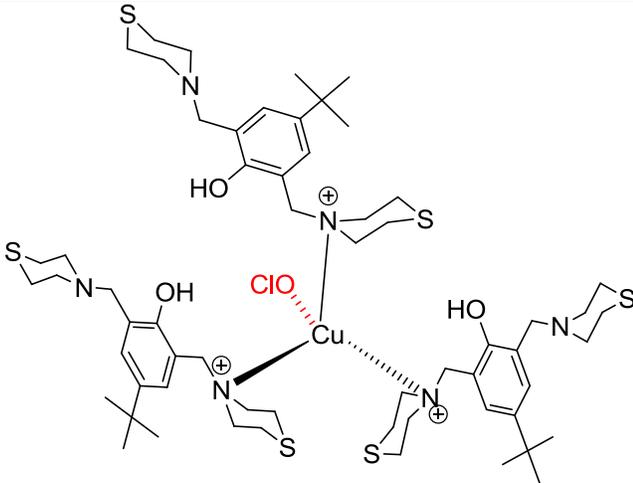


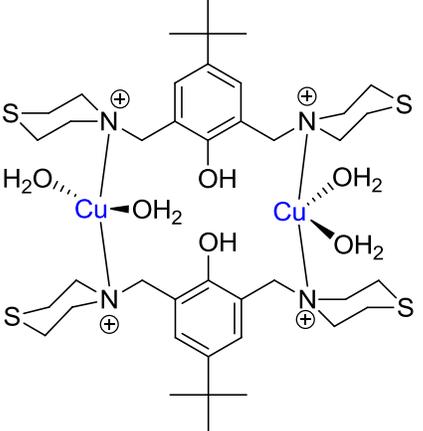
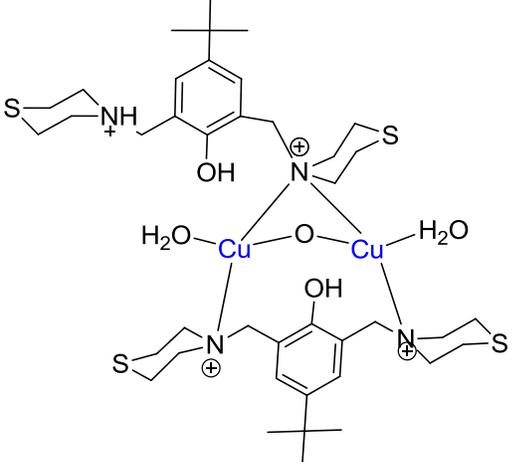
Figura 3.26. Comparación de espectros ajustados (línea continua) y espectro experimental (marcadores) a diferente pH, correspondiente a la relación molar 1Cu-2LQM.

Con base en la comparación de espectros de las tres relaciones molares fijas, se puede concluir que el modelo presentado describe el comportamiento químico de la formación de complejos entre Cu^{2+} y LQM303. Es importante recordar que existen problemas de solubilidad para el LQM303 (a valores de pH mayores a 7) como se mencionó en la determinación de las constantes de acidez del capítulo 2. Se plantea como hipótesis que las diferencias que existen entre los espectros ajustado y experimental, son provocadas por una disminución en la concentración de LQM en solución, debido a la formación de precipitado. En todos los casos se observa un efecto hipocrómico del espectro experimental a 286 nm, que es la longitud de onda en la cual absorbe el LQM303.

Por último en la *tabla 3.5* se presenta una propuesta de las posibles estructuras de los complejos encontrados en el refinamiento.

Tabla 3.5. Estructuras propuestas de los complejos formados de Cu^{2+} y LQM303. En la columna de complejo se presenta la notación usada en el ajuste con SQUAD. Se presenta los valores de $\log \beta$ y su desviación estándar. Las estructuras se construyeron con el software *ChemBioDraw*.

| Complejo | $\log \beta \pm \sigma$ | Estructura propuesta |
|--|-------------------------|--|
| Cu X H | 13.292 ± 0.029 |  |
| $\text{Cu}_2 (\text{OH})_2 \text{X}_2$ | 4.077 ± 0.066 |  |
| Cu X ₃ | 20.216 ± 0.101 |  |

| | | |
|---|--------------------------------------|---|
| <p>$\text{Cu}_2 \text{X}_2$</p> | <p>18.439 ± 0.066</p> |  |
| <p>$\text{Cu}_2 \text{X}_2 \text{H}$</p> | <p>$24.122 \pm 0.124$</p> |  |

3.6 CÁLCULO DE CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN

Cu-LQM (en metanol)

En la experimentación se trabajó con los siguientes reactivos de grado analítico:

(1) cloruro de cobre dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), (2) ácido perclórico ($HClO_4$), e (3) hidróxido de sodio ($NaOH$) (disolución preparada con agua desionizada).

La instrumentación y las condiciones de trabajo fue la usada en las determinaciones anteriores:

Equipo: Espectrómetro modelo Lambda 950 UV-Vis de Perkin-Elmer.

Celda: celda de cuarzo (Perkin-Elmer) de 1cm de longitud de paso óptico

pH-metro: Radiometer pH/ION METER modelo PHM240

Electrodo: Microelectrodo combinado Ag/AgCl – Radiometer analytical.

Temperatura: 25°C

Las soluciones de trabajo se prepararon de la siguiente manera:

- 1) Se pesa y disuelve en metanol, la cantidad necesaria de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ para tener una concentración 2.6×10^{-3} M.
- 2) Se disuelve en metanol, la cantidad necesaria de LQM303 para tener una concentración 2.6×10^{-3} M.
- 3) Se preparó una solución acuosa de NaOH disolviendo la cantidad necesaria para tener una concentración 1.0 M.
- 4) La solución muestra se prepara mezclando 3 mL de la solución de $CuCl_2$ con 3 mL de la solución de LQM y se adicionan 5 μ l de $HClO_4$ concentrado.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Se realizó la valoración ácido-base de la solución muestra, en la cual se fijaron las concentraciones iniciales de cada especie para tener una relación molar 1Cu-1LQM, se utilizó NaOH como valorante. Se obtuvieron los espectros de absorción en la región visible

del espectro electromagnético después de la adición de cada volumen de hidróxido de sodio. Este análisis se llevó a cabo en una celda termostataada a 25°C.

En la *figura 3.27* se presentan dos gráficos que corresponden a espectros UV-vis de las especies de: Cobre (II) en metanol y LQM303 en metanol.

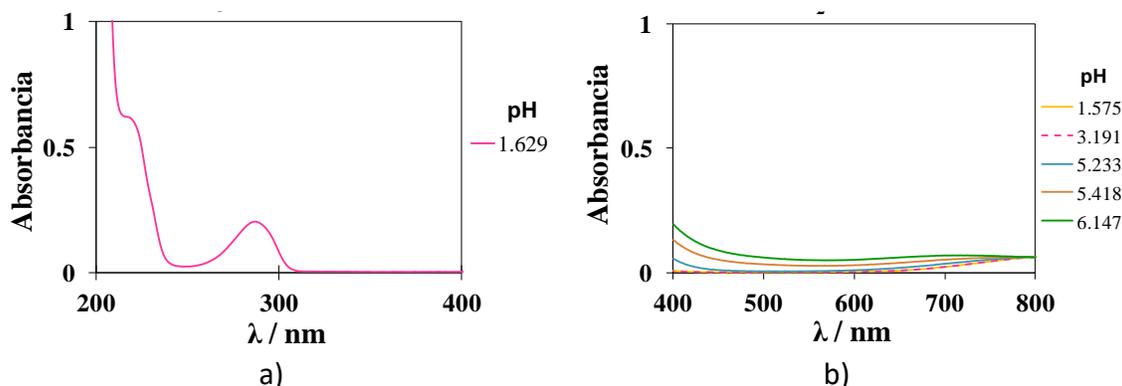


Figura 3.27. a) Espectro UV-vis de LQM en metanol, pH=1.629 y 2.6×10^{-4} M.

b) Espectros en la región visible de cobre en metanol a diferente pH y una concentración de 1.3×10^{-3} M.

Los espectros de la *figura 3.27*, sirven de evidencia para poder justificar, de manera cualitativa, la formación de complejos de Cu(II)-LQM303. Como se observa en la *figura 3.27 a*), el LQM303 solo presenta una banda de absorción alrededor de 290 nm; el cobre (II) presenta una banda de absorción por arriba de los 700 nm en las concentraciones mostradas, y en todos casos los valores de absorbancia están alrededor de 0.1. Por lo tanto se decide trabajar en un intervalo que va de los 400 nm hasta los 800nm.

Así, para el estudio de la formación de complejos de cobre (II) con LQM en metanol se trabajó con una mezcla equimolar de Cu-LQM; lo anterior se llevó a cabo fijando las concentraciones iniciales de cada especie. En seguida se obtuvo un grupo de espectros UV-vis en función del pH, los valores van de pH = 1.878 hasta pH = 8.603. En la *figura 3.28* se presenta el conjunto de espectros obtenido para la mezcla *ICu-ILQM* en un intervalo de longitud de onda entre 400 y 800 nm.

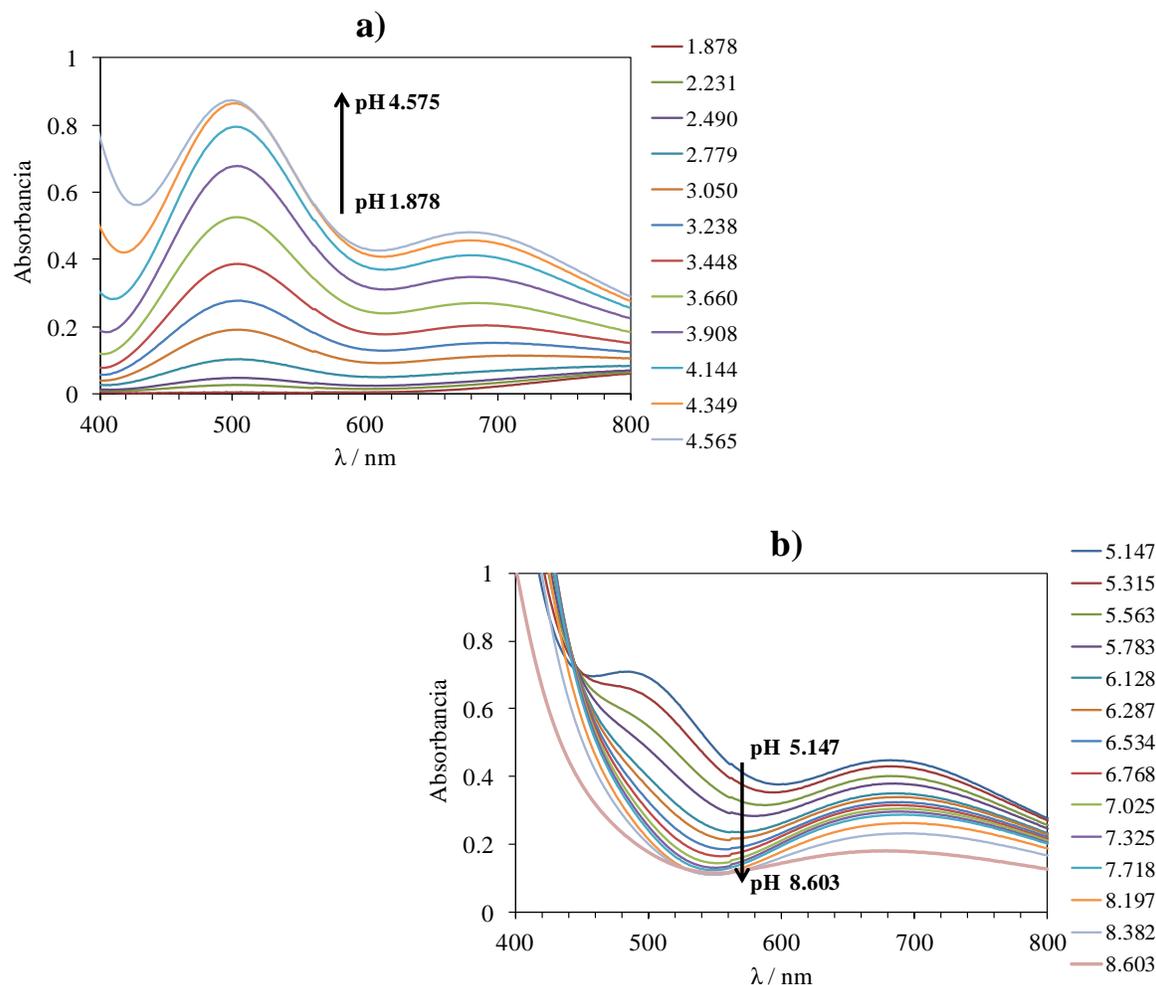


Figura 3.28. Espectros UV-vis en función del pH, para la mezcla 1Cu-1LQM. Estos valores son a) de pH =1.878 a pH=4.656 y b) de pH =5.147 a pH=8.603.

En la *figura 3.28* podemos observar la formación de una banda en 500 nm, lo que podemos interpretar como la formación de nuevas especies de Cu-LQM. Podemos ver que a medida que aumenta el pH esta banda en 500 nm tiene un efecto hipercrómico hasta llegar a pH = 5.147, a partir de aquí la absorbancia disminuye hasta el último espectro de absorción experimental obtenido, que es pH = 8.603.

Se observa una segunda banda de absorción en 700 nm, la cual tiene un efecto hipercrómico hasta pH = 5.147, y al continuar aumentando el valor de pH se puede notar que la absorbancia disminuye. Cabe señalar que a lo largo de esta valoración ácido-base, el

color de la solución va cambiando de un color rojo intenso a un azul verdoso para, finalmente, llegar a un color azul tenue al final de la titulación. *Figura 3.29.*

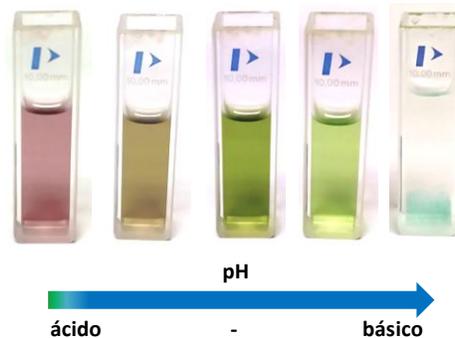


Figura 3.29. Colores de la solución de cobre-LQM a través de la valoración ácido base.

Asimismo, en la *figura 3.30* se presenta la gráfica de absorbancia en función de pH a una longitud de onda de 500 nm. Los valores de absorbancia y pH se corrigieron por dilución y por eficiencia de la celda [9], respectivamente, con las ecuaciones 10 y 1 mencionadas en secciones anteriores.

$$A_{corr} = A_{experimental} \cdot \left[\frac{V_{inicial} + V_{acumulado}}{V_{inicial}} \right]$$

$$pH_{corr} = pH_{observado} + \left[\frac{pH_{calib} - pH_{observado}}{pH_{calib}} \right] * Ef$$

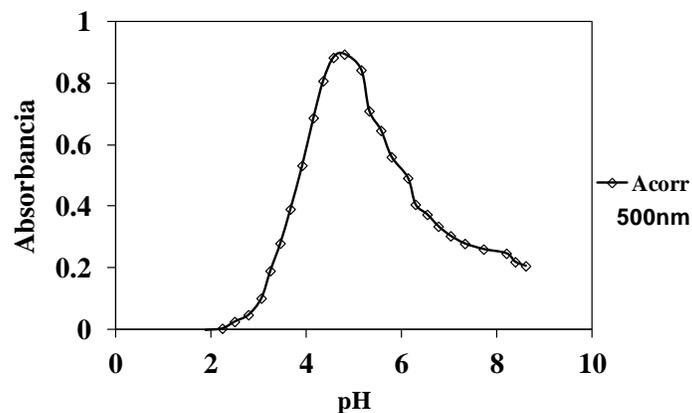


Fig. 3.30. Absorbancia en función de pH a una longitud de onda de 500 nm (Ambos parámetros corregidos por dilución).

Se realizó un tratamiento quimiométrico de los datos experimentales. Este tratamiento se realiza con el software DATAN y, utilizando análisis de factores y componentes principales, obtenemos como resultado cuatro factores o componentes principales presentes en nuestro sistema, que se interpreta como el número de especies que absorben diferente en el sistema. A continuación se presenta una tabla de los porcentajes de varianza acumulada, así como la gráfica de ruido construida con DATAN.

Tabla 3.6. Valores de porcentaje de varianza acumulada obtenidos con DATAN.

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Porcentaje de varianza acumulada | 89.523 | 99.941 | 99.990 | 99.999 | 100.00 |

Como se observa en la *tabla 3.6*, el quinto componente suma 100%, es decir, reconstruye toda la información relevante de la matriz original. Por lo tanto se concluye que son cuatro los componentes relevantes en nuestro sistema.

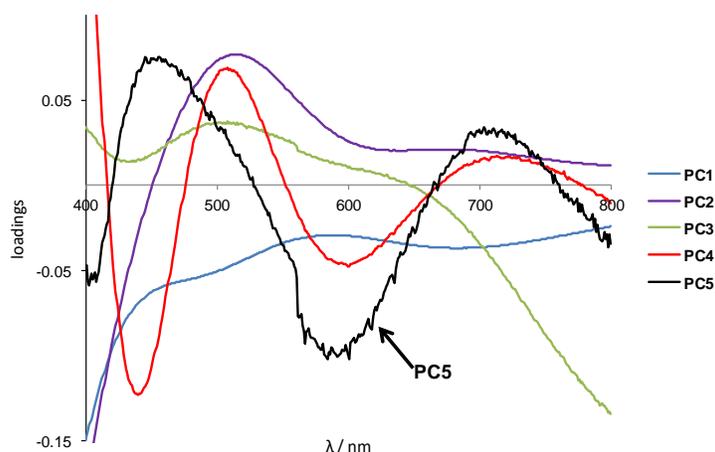


Figura 3.31. Curvas de *loadings* de los primeros cinco componentes principales obtenidos con DATAN.

En la *figura 3.31* se observa que el *loading* del PC5 ya exhibe ruido, por lo cual se concluye que a partir de él ya no hay información relevante en el sistema, de acuerdo a la documentación del programa HypSpec2014, de la *suite* de programas HYPERQUAD.

Finalmente se realiza un refinamiento de datos de los espectros experimentales. Para este refinamiento se utiliza el programa SQUAD, en el cual se propone un modelo con 6 equilibrios: cuatro equilibrios pertenecientes a los complejos formados de Cu-LQM, un equilibrio de la última desprotonación del LQM y el último equilibrio del hidroxocomplejo de cobre.

Tabla 3.7. Valores de $\log \beta$ refinados con SQUAD para Cu con LQM303. $\sigma_{\text{reg}}=0.006$ representa la desviación estándar de la regresión.

| Especie | $\log \beta \pm \sigma_{\text{reg}}$ |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Cu X H | 11.107 ± 0.002 |
| Cu X ₂ | 12.623 ± 0.030 |
| Cu ₂ X ₂ | 16.325 ± 0.027 |
| Cu ₂ X ₂ H | 21.063 ± 0.057 |

En la *tabla 3.7* se tienen cuatro especies de complejos formados, y de estas especies, tres coinciden con los resultados obtenidos para el estudio realizado en medio acuoso. Para el caso de las constantes de complejación en metanol, los valores encontrados de $\log \beta$ difieren dos unidades por debajo para CuXH y Cu₂X₂; y en la especie Cu₂X₂H la diferencia es de tres unidades por debajo del valor obtenido en medio acuoso.

Una vez obtenidos estos valores de constantes de complejación, se construyen los espectros UV-vis ajustados con SQUAD (con ayuda del programa MEDUSA) y se comparan con los espectros experimentales, *figura 3.32*.

En esta comparación podemos observar que el modelo químico propuesto se ajusta de buena forma a los datos experimentales, es decir, el espectro ajustado con los datos de SQUAD y MEDUSA se superpone a la forma del espectro experimental en los diferentes valores de pH presentados.

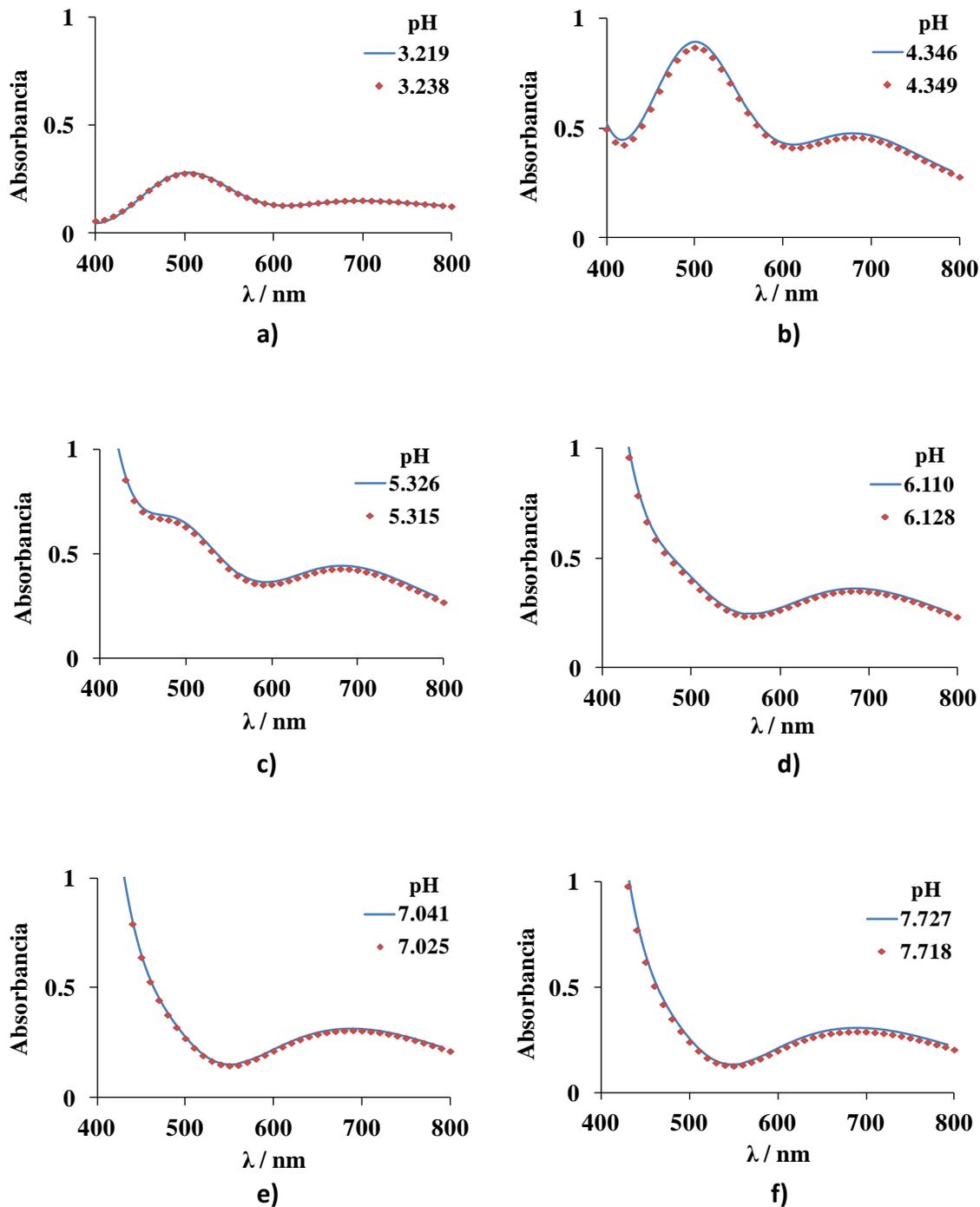


Figura 3.32. Comparación a diferente pH del espectro experimental (*marcadores*) y el espectro ajustado con SQUAD (*línea continua*).

3.7 CONCLUSIONES

A través del método de relaciones molares se determinaron tres posibles estequiometrías en los complejos de cobre-LQM: $1\text{Cu}-1\text{LQM}$, $1\text{Cu}-2\text{LQM}$ y $2\text{Cu}-1\text{LQM}$. Adicionalmente se planteó una cuarta relación molar $1\text{Cu}-3\text{LQM}$, la cual quedó como dato adicional para la propuesta final del modelo químico planteado.

Se refinaron los datos experimentales con el programa SQUAD y se obtuvieron los valores de las constantes de complejación de cinco especies de Cu-LQM en medio acuoso. Se propuso un modelo químico formado por nueve especies: cinco especies de Cu-LQM, dos especies pertenecientes al LQM y, dos hidroxocomplejos de cobre.

Adicionalmente se estudió la formación de complejos en metanol, esto para tratar de evitar problemas de solubilidad, y se determinaron los valores de constantes de complejación para cuatro especies de Cu-LQM. Tres de estas especies coinciden con los resultados obtenidos en medio acuoso.

Finalmente se presenta una propuesta de las estructuras para los complejos formados en medio acuoso.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO TEÓRICO DE LQM's

4.1 RUTAS DE DESPROTONACIÓN

Los equilibrios ácido-base son fenómenos muy importantes, los cuales no solo tienen implicaciones para la química, sino también para distintos campos de la ciencia como la farmacología, la medicina, la biología, etc. Como se mencionó en capítulos anteriores, una gran cantidad de compuestos químicos tienen comportamientos como ácidos (o bases) de Bronsted en solución acuosa, y su acidez se expresa comúnmente como pK_a , que es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida. Muchos compuestos presentan más de un sitio ácido, lo que hace imprescindible identificar la ruta de desprotonación más probable para poder conocer a que estructura química exacta que corresponde a cada grado de desprotonación. Sin embargo, la identificación de rutas de desprotonación para compuestos polipróticos es con frecuencia una tarea difícil. Esto se puede lograr mediante diferentes técnicas, dentro de las que destacan los cálculos computacionales que constituyen alternativas viables, confiables y relativamente baratas por lo que se usan frecuentemente en este contexto [45, 46].

4.1.1 METODOLOGÍA

DETALLES COMPUTACIONALES

Para el estudio teórico del LQM303 y LQM314, se procedió de la siguiente manera. El estudio conformacional, la optimización de la geometría y los cálculos de frecuencia fueron realizados con el paquete de programas Gaussian 09 [47]. Se utilizó la Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD), en particular el funcional B3LYP, ambos en combinación con el modelo continuo polarizable SMD. Este funcional ha sido utilizado con éxito para el estudio de moléculas similares [48, 49]. En todos los casos se utilizó el conjunto de funciones de base 6-31+G(d), para la optimización de geometrías y los cálculos de frecuencia. Posteriormente, utilizando estas geometrías se realizaron cálculos de punto simple para mejorar las energías utilizando un conjunto de funciones de base mayor, 6-311++G(d,p).

Dada la complejidad de los sistemas a estudiar se realizó un estudio adicional del LQM303 utilizando el funcional M052X en combinación con el modelo continuo polarizable SMD. Esto para investigar la posible influencia del método de cálculo en los resultados obtenidos. En este caso se realizaron todos los cálculos con el conjunto de funciones de base 6-31+G(d,p). Esta decisión se tomó en base a resultados anteriores, ya que dichos resultados obtenidos con cualquiera de los 3 conjuntos de base antes mencionados son muy similares cuando se usan en combinación con la TFD [50].

4.1.2 B3LYP - LQM303

Se optimizó la molécula diprotonada del LQM303, y se obtuvo la estructura mostrada en la *figura 4.1*. Esta es la molécula de partida para los siguientes cálculos teóricos.

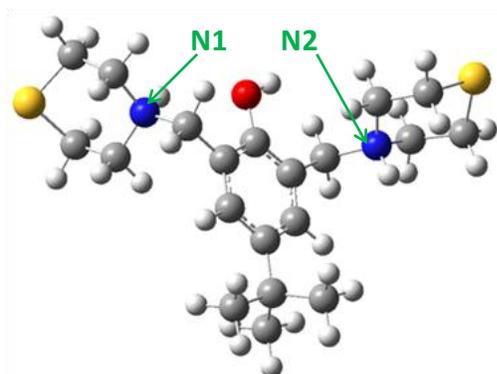


Figura 4.1. Estructura optimizada para el compuesto LQM303.

Posteriormente se determinaron los valores de energía libre de Gibbs correspondientes a la primera desprotonación para los tres sitios ácidos de la molécula totalmente protonada del LQM303. Estos sitios corresponden a la amina protonada de cada anillo de tiomorfolina, átomos de nitrógeno N-1 y N-2; el tercer sitio es el OH del fenol. Los valores de energías relativas para los productos de desprotonación, i.e. especies monoprotionadas se reportan en la *Tabla 4.1*. Los valores de energías obtenidos sugieren que la primera desprotonación ocurre del sitio O del fenol.

Sin embargo es importante notar que la diferencia en energías de desprotonación para los sitios O y N-1 es menor a 1 kcal/mol, de modo que se encuentra por debajo de la incertidumbre esperada para cualquier método de cálculo. Es por ello que consideramos conveniente realizar esta parte de la investigación con otro funcional, de modo que pueda corroborarse o refutarse la ruta de desprotonación propuesta.

Para la segunda desprotonación se parte de la estructura monoprotionada de menor energía y se analizan los sitios restantes para la segunda desprotonación, que son los dos grupos amino en los anillos de tiomorfolina (N-1 y N-2). Así, la energía más baja se tiene para la desprotonación del nitrógeno N-1.

Tabla 4.1. Energía relativa (ΔG / [kcal]) para los posibles sitios de desprotonación.

| | Sitio de Desprotonación | 1ª Desp | 2ª Desp |
|--------|-------------------------|---------|---------|
| LQM303 | N-1 | 0.77 | 0.00 |
| | N-2 | 3.27 | 4.45 |
| | O | 0.00 | |

De acuerdo a los valores de energías relativas reportadas en la *tabla 4.1*, la ruta de desprotonación más probable para el LQM303, según los resultados obtenidos con el funcional B3LYP, es la que se muestra en la *figura 4.2*.

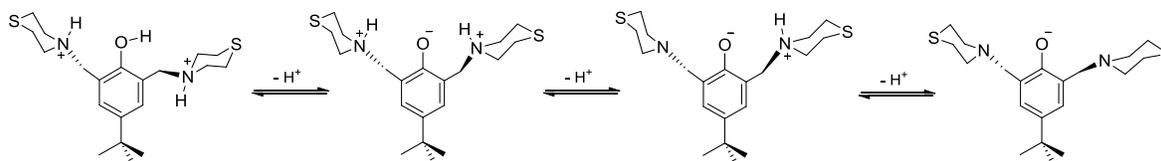


Figura 4.2. Orden de desprotonación propuesto para la molécula LQM303, según los resultados obtenidos con el funcional B3LYP

4.1.3 B3LYP - LQM314

Para determinar el orden de desprotonación del LQM314 se siguió el mismo procedimiento de la sección anterior calculando la energía libre de Gibbs de los tres sitios ácidos partiendo de la estructura optimizada para el LQM314, *figura 4.3*.

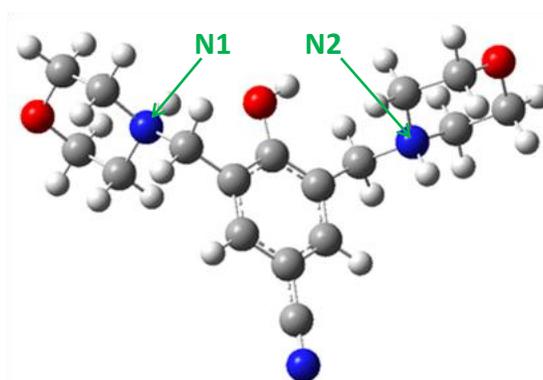


Figura 4.3. Estructura optimizada para el compuesto LQM314.

Inicialmente se determinaron los valores de la energía libre de Gibbs correspondientes a la primera desprotonación para los tres sitios posibles de la molécula totalmente protonada del LQM314. Estos sitios corresponden a la amina protonada de cada anillo de morfolina, el tercer sitio corresponde al OH del fenol (*Figura 4.3*). Los valores de energías relativas para los productos de desprotonación, i.e. especies monoprotonadas se reportan en la *Tabla 4.2*. Se encontró que la primera desprotonación ocurre del sitio O del fenol. En este caso las diferencias de energías correspondientes a las desprotonaciones de O y N1 sí son significativas (mayores a 4 kcal/mol) y mayores a las incertidumbres esperadas para el método de cálculo empleado. Por lo que se espera que el orden de desprotonación propuesto sea confiable y no cambie con el método de cálculo.

Para la segunda desprotonación se parte de la estructura monoprotonada de menor energía y se analizan los posibles sitios para la segunda desprotonación, que corresponden a cada uno de los dos grupos amino en los anillos de morfolina. Así, la energía más baja se tiene para la desprotonación del nitrógeno N-1.

Tabla 4.2. Energía relativa (ΔG / [kcal]) para los posibles sitios de desprotonación.

| | Sitio de Desprotonación | 1ª Desp | 2ª Desp |
|--------|-------------------------|---------|---------|
| LQM314 | N-1 | 4.40 | 0.00 |
| | N-2 | 7.25 | 2.59 |
| | O | 0.00 | |

De acuerdo a los valores de energía relativa de la tabla anterior, se propone la siguiente ruta de desprotonación para el LQM314 (figura 4.4).

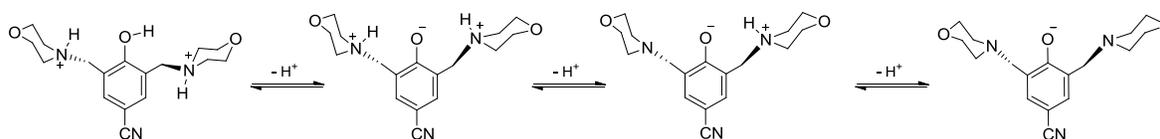


Figura 4.4. Orden de desprotonación propuesto para la molécula LQM314.

4.1.4 M052X - LQM303

Como se mencionó anteriormente la diferencia en energías de deprotonación para los sitios O y N-1 en este compuesto es muy pequeña, por lo que el orden de deprotonación propuesto en base a los resultados obtenidos con el funcional B3LYP podría modificarse con un cambio de metodología de cálculo. Es por ello que la ruta de deprotonación de este compuesto se volvió a investigar utilizando un funcional diferente (M05-2X). Adicionalmente, se realizó un estudio conformacional para las diferentes especies ácido-base.

Partiendo del conformero de menor energía se realizó el estudio teórico para determinar la ruta de desprotonación más probable. Considerando tres posibles sitios de desprotonación para la molécula totalmente protonada (H₃L²⁺) de LQM303, un sitio corresponde al protón fenólico y dos sitios a las aminas terciarias protonadas.

Tomando como hipótesis que, la formación de puentes de hidrógeno entre el sitio desprotonado y el protón del sitio ácido más cercano estabilizaría la molécula, para la primera desprotonación se modelaron tres posibilidades por cada sitio de desprotonación, es

decir, en total se tendrán nueve conforméromos posibles. Por ejemplo, para la primera desprotonación que involucra al OH fenólico se tendrían tres posibilidades para la especie desprotonada, (a) con dos puentes de hidrógeno: entre el oxígeno y cada una de las dos aminas protonadas; (b) un puente de hidrógeno: entre el oxígeno con carga negativa y una amina protonada, y, (c) sin ningún puente de hidrógeno (*figura 4.5*). Análogamente, lo anterior se realiza para las dos posibilidades restantes de sitios de desprotonación.

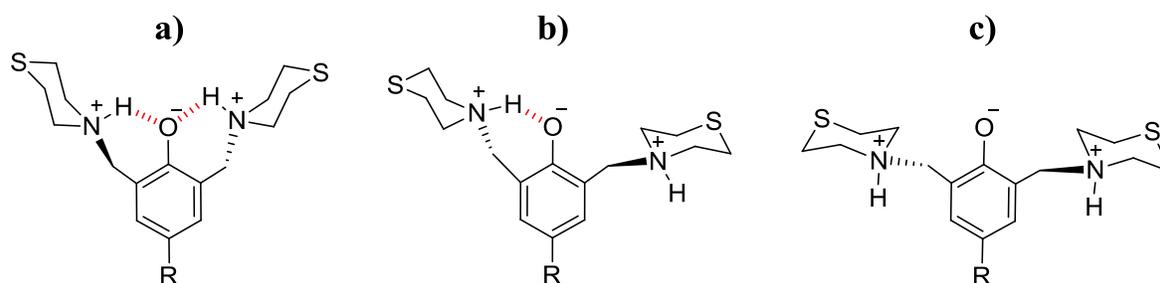


Figura 4.5. Conforméromos posibles para fenolato considerando formación de puentes de H intramoleculares.

Se calcularon los valores de energías libres de Gibbs correspondientes a las nueve posibles conformaciones mencionadas en el párrafo anterior, y como se observa en la *figura 4.6*, los conforméromos más estables son los que forman dos puentes de hidrógeno. Así, se encontró que la primera desprotonación se lleva a cabo en un grupo amino. Este resultado contradice lo obtenido con el funcional B3LYP. Sin embargo, también en este caso las diferencias de energía son muy pequeñas y por debajo de la exactitud química. De modo que las energías de desprotonación parecen no ser un criterio suficiente en este caso para elucidar la ruta de desprotonación más probable. En la siguiente sección se analizarán otros criterios que ayuden a decidir sobre este punto.

Para la segunda desprotonación de acuerdo al valor de energía libre de Gibbs se determinó que ocurre en la segunda amina y, finalmente la tercer desprotonación corresponde al grupo OH. Una vez comprobada la hipótesis; los puentes de hidrógeno estabilizarían la estructura, se toman los conforméromos en los cuales se formaron dos puentes de hidrógeno para proponer la ruta de desprotonación.

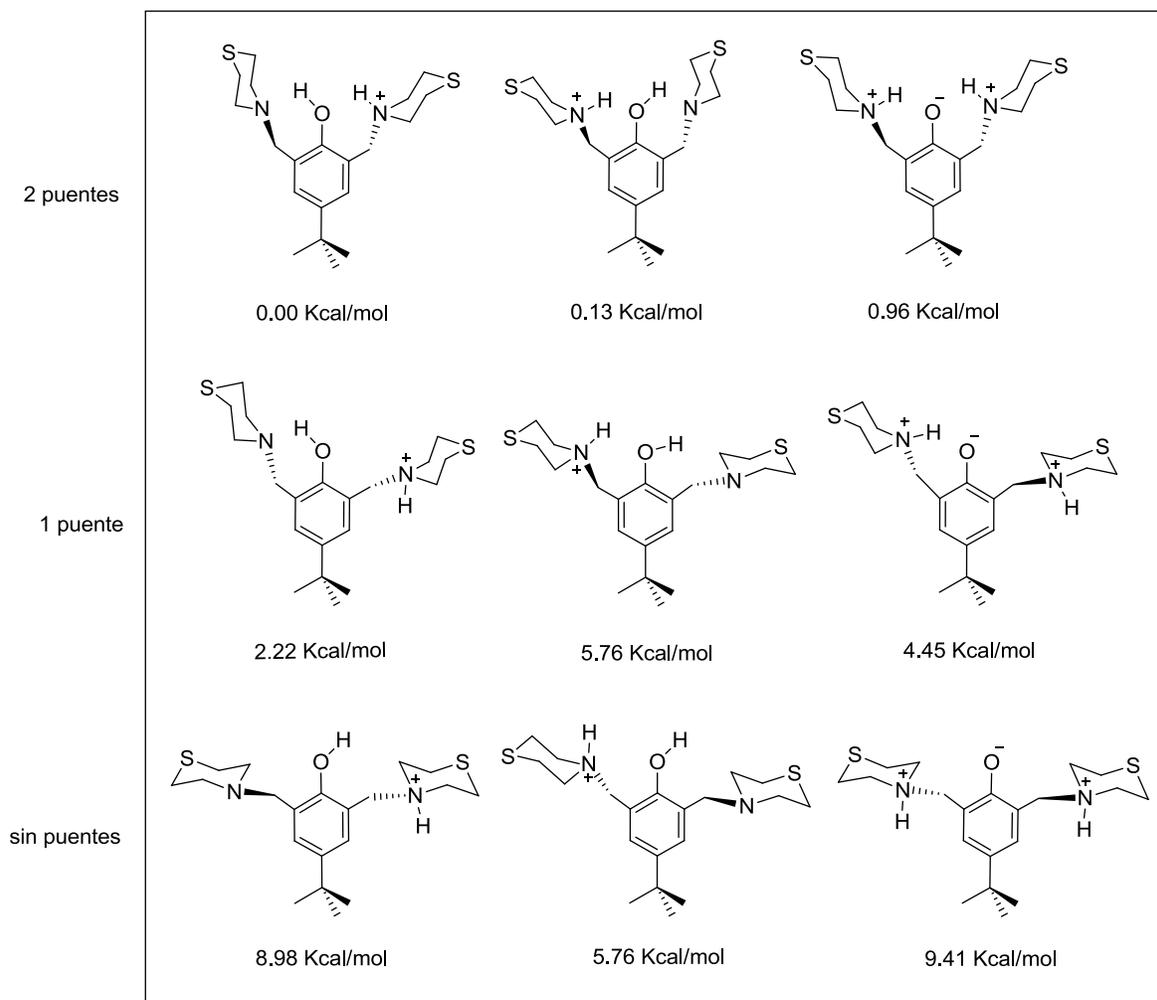


Figura 4.6. Estructuras posibles y energía relativa para la primer desprotonación del LQM303.

De modo que, según los resultados obtenidos con el funcional M05-2X (tabla 4.3), la ruta de desprotonación más probable para el LQM303, es la que se muestra en la figura 4.7.

Tabla 4.3. Energía relativa (ΔG / [kcal]) para los posibles sitios de desprotonación.

| | Sitio de Desprotonación | 1ª Desp | 2ª Desp |
|--------|-------------------------|---------|---------|
| LQM303 | N-1 | 0.00 | 0.00 |
| | N-2 | 0.13 | 2.33 |
| | O | 0.96 | |

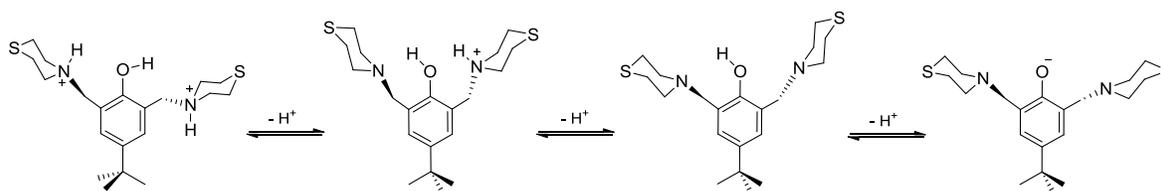


Figura 4.7. Orden de desprotonación propuesto para las moléculas LQM303, según los resultados obtenidos con el funcional M05-2X.

4.1.5 COMPARACIÓN ENTRE *B3LYP* Y *M052X*

La ruta de desprotonación del LQM303 se determinó mediante dos funcionales diferentes (*B3LYP* y *M05-2X*), dando lugar a dos rutas diferentes. En los dos casos, para la primer desprotonación se obtienen diferencias de energía relativa muy pequeñas (menor a 1 kcal/mol) lo que teóricamente dificulta concluir cuál de las dos rutas será más probable.

Se tomaron algunas consideraciones extra en el estudio con *M052X*, que fue la formación de puentes de hidrógeno en los conformeros en la primer desprotonación y aunque se encontraron conformeros más estables, la conclusión final puede resultar dudosa desde el punto de vista de las energías relativas. Estos valores, correspondientes a los tres sitios ácidos para la primer desprotonación están por debajo de 1 kcal.

Debido a lo anterior se decidió realizar un estudio más detallado para corroborar el orden de desprotonación. Para ello se usaron dos criterios adicionales que se tomarán en cuenta para la propuesta final de la ruta de desprotonación. Estos son la localización del LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) y las cargas sobre los átomos de H.

Recordando que se espera que los sitios ácidos en una molécula estén directamente relacionados con el orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO). Se espera que el sitio sobre el que esté mayormente localizado el LUMO sea el sitio más ácido.

Como se observa en la *figura 4.8*, la mayor contribución al LUMO en el LQM303 aparece en los grupos amino, por lo tanto se espera que el sitio más ácido este en los anillos de tiomorfolina. Este criterio soporta entonces los resultados obtenidos con el funcional M05-2X.

Adicionalmente se calcularon las densidades de superficie LUMO para el LQM303 y dos sustituyentes con características electroattractoras como el $-NO_2$ y $-CN$; y otro con características similares a las del *-tertbutil*, que es el $-NH_2$. Recordando que se espera que los sitios ácidos en una molécula estén directamente relacionados con el orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO).

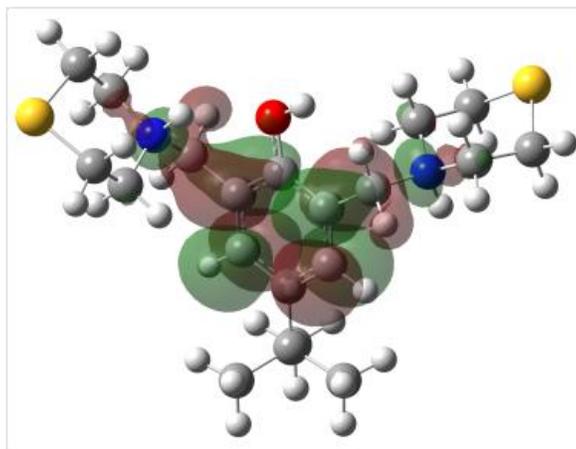


Figura 4.8. Localización LUMO para LQM303, calculada con un valor de isodensidad de 0.015 au.

En cuanto al otro criterio usado, que fueron las cargas de Mulliken, los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 4.4*. En este caso, se asume que el H más ácido será el que tenga mayor carga positiva. De modo que según este criterio también se predice que los N en las tiomorfolinas son sitios más ácidos que el OH fenólico. Lo que soporta la ruta de desprotonación que se predice a partir de las energías obtenidas con el funcional M05-2X. O sea que los dos criterios adicionales sugieren que la ruta de desprotonación predicha según este funcional es la correcta y no la obtenida con el funcional B3LYP.

Tabla 4.4. Cargas de Mulliken de los tres protones ácidos en la molécula del LQM303.

| Sitio | q^+ |
|-------|-------|
| O | 0.447 |
| N1 | 0.495 |
| N2 | 0.483 |

Considerando entonces los tres criterios utilizados, o sea energías de desprotonación (M05-2X), localización del LUMO y cargas sobre los H ácidos, todos predicen como ruta de desprotonación más probable para LQM303 la mostrada en la *figura 4.7*. Es por ello que esa es la ruta propuesta en el presente trabajo. Es importante insistir en que estos compuestos son particularmente difíciles en este contexto, debido a la similitud de energías de desprotonación de los sitios amina terciaria y fenol. Esto hace recomendable utilizar más de un criterio para identificar las rutas de desprotonación más probables para este tipo de compuestos.

4.1.6 INFLUENCIA DEL SUSTITUYENTE *-para*

Como alternativa adicional, se realizó un estudio teórico de la influencia en la ruta de desprotonación del grupo sustituyente en la posición *-para* del fenol. Para esto se sustituyó el grupo tertbutil por grupos electroattractores y electrodonadores como son los grupos -CN, -NO₂ y -Cl, -NH₂, -H, respectivamente. Como criterio se utilizó en este caso los valores de energía de desprotonación obtenidos con el funcional M05-2X, ya que como se demostró anteriormente éste es el que está de acuerdo con los otros criterios. Los valores obtenidos se resumen en la *tabla 4.5*.

Tabla 4.5. Energías relativas (kcal/mol) del LQM303 con los diferentes sustituyentes.

| | Sitio | Tert-butil | H | Cl | NH ₂ | NO ₂ | CN |
|-----------|-------|------------|------|--------|-----------------|-----------------|------|
| 1er Desp. | O | 0.96 | 0.64 | 0.00 | 0.89 | 0.00 | 0.00 |
| | N1 | 0.00 | 0.00 | 0.73 | 0.00 | 3.80 | 1.85 |
| | N2 | 0.13 | 0.62 | 0.74 | 0.01 | 3.80 | 1.86 |
| 2a Desp. | O | 2.33 | 1.72 | | * | | |
| | N1 | | | 0.00 | | 0.00 | 0.00 |
| | N2 | 0.00 | 0.00 | < 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.01 |

*El hidrógeno se pega al oxígeno

Con los resultados anteriores se propone una ruta de desprotonación de acuerdo al tipo de sustituyente que se tiene en la posición *-para* del anillo fenólico (figura 4.9).

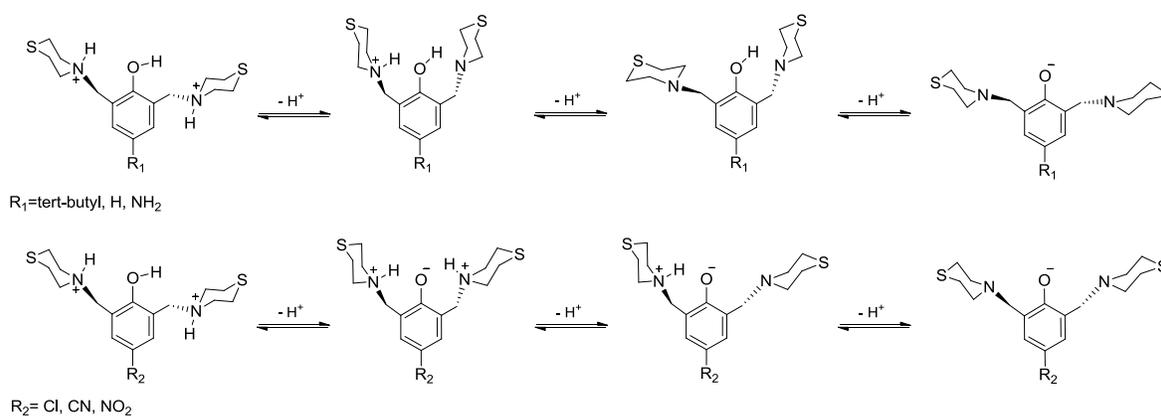


Figura 4.9. Ruta de desprotonación propuesta para el LQM303, para los diferentes sustituyentes.

Así, podemos observar que los sustituyentes con características similares al *tert*butil coinciden en la ruta de desprotonación, iniciando en el grupo amino. Por el contrario, los sustituyentes electroaceptores como CN y NO₂ hacen más ácido al OH fenólico y provocan que éste sea el sitio involucrado en la primera desprotonación.

4.2 CONCLUSIONES

En este apartado se ha presentado la determinación de los órdenes de desprotonación para el compuesto LQM303 *4-terbutil-2,6-bis(tiomorfolin-1-ilmetil)fenol* utilizando métodos teóricos, en particular los funcionales de la densidad B3LYP y M05-2X y dos conjuntos diferentes de funciones de base.

Con base en energías libres de Gibbs y usando el funcional B3LYP, se encontró que la primera desprotonación ocurre en el grupo OH de anillo fenólico, la segunda se lleva a cabo en el nitrógeno (N-41); y la última desprotonación es en el nitrógeno (N-51) del anillo B de tiomorfolina. Por el contrario según las energías obtenidas con el funcional M05-2X la primera desprotonación ocurre en la amina del anillo tiomorfolínico. La segunda desprotonación se tiene en la amina del segundo anillo de tiomorfolina y, finalmente la tercer desprotonación se lleva a cabo en el grupo OH del anillo fenólico.

Esta contradicción se debe a que las diferencias en energías libres de Gibbs son muy pequeñas e inferiores a las incertidumbres asociadas a cualquier método de cálculo. Por ello fue necesario usar dos criterios adicionales: la localización del LUMO y las cargas sobre los H ácidos. Con estos criterios se confirmó la ruta identificada como más probable con el método M05-2X. Por lo que este método fue el empleado para investigar la ruta de desprotonación de compuestos similares al LQM303. Se comprobó que los sustituyentes de características similares al *tert*butil (electrodonador) presentan el mismo orden de desprotonación.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Utilizando Electroforesis Capilar de Zona y Espectrofotometría UV-vis se determinaron dos valores de pK_a del LQM303: 4-terbutil-2,6-bis (tiomorfolin-1-ilmetil) fenol. Estos valores corresponden a las primeras dos desprotonaciones del LQM303. A partir de pH aproximado de 7.0 se forma un precipitado que impidió la determinación del tercer valor de pK_a restante. La determinación de las constantes de acidez se llevó a cabo en condiciones pseudofisiológicas de temperatura ($T = 310.15K$).

En la parte del estudio de formación de complejos de cobre con LQM en medio acuoso, se utilizó el método de relaciones molares para determinar tres posibles estequiometrías para las especies de Cu-LQM formadas. Estos resultados sirvieron para proponer un conjunto de equilibrios mediante el cual se calcularon las constantes de complejación de cinco especies de Cu-LQM.

Adicionalmente se realizó el estudio de formación de complejos teniendo como medio Metanol, y se propuso un modelo con cuatro complejos de cobre. Se calcularon las constantes de complejación y se comprobó que tres de las especies propuestas en este modelo coincidían con las propuestas en el estudio en medio acuoso. Lo anterior corrobora la validez del conjunto de equilibrios propuesto.

Mediante cálculos teóricos se determinó el orden de desprotonación para el LQM303 mediante dos funcionales de la densidad (B3LYP y M052X). En el estudio teórico realizado mediante el funcional M052X se usaron diferentes criterios para comprobar la validez de la ruta de desprotonación propuesta, y se encontró que las primeras dos desprotonaciones ocurren en los grupos amino de los anillos de tiomorfolina.

Se trabajó también con otro compuesto de la familia de LQM's; (4-Hidroxi-3,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benzonitrilo) o LQM314. Se calcularon tres valores de pK_a mediante electroforesis capilar y se determinó el valor de $\log P$ entre octanol y agua.

PERSPECTIVAS

Un tema de gran importancia en la salud pública a nivel nacional e internacional es la hipertensión, de aquí la importancia en la caracterización fisicoquímica de nuevos compuestos con propiedades antihipertensivas.

- 1) Como continuación de este trabajo, se plantea seguir con el estudio de complejación a través de otros métodos de análisis con el objetivo de comprobar y reafirmar los resultados obtenidos del modelo químico presentado. El método de variaciones continuas puede ser una herramienta útil en el desarrollo de este tema.
- 2) Para los resultados del estudio de complejación en Metanol, solo se analizó una relación molar 1:1; sin embargo faltaría complementar el estudio de las relaciones molares 1:2 y 2:1.
- 3) El estudio de la interacción del LQM con otros metales de interés biológico como Zn y Ni, es una tema adicional de gran importancia, el cual puede colaborar en el objetivo principal de este trabajo.
- 4) Adicionalmente se pretende apoyar en la química computacional para realizar diversos estudios como son: determinación de la actividad antioxidante del LQM303, análisis de la interacción de cobre con LQM.
- 5) El uso de métodos computacionales podría ser una herramienta de gran utilizar para poder predecir el valor del pK_{a3} que no fue posible determinar mediante técnicas experimentales.

Lo antes mencionado son algunas de las perspectivas que se tienen para la caracterización fisicoquímica de este nuevo compuesto con propiedades antihipertensivas.

APÉNDICE

APÉNDICE A

DETERMINACIÓN DE $\log P$ para LQM314

De especial valor son las propiedades físico-químicas, que están directamente relacionadas con las fuerzas intermoleculares implicadas en la interacción fármaco-receptor, así como las propiedades de transporte y distribución del fármaco. En este sentido, algunas de las propiedades como hidróficas, polares, electrónicas y estéricas son de las más importantes. La lipofilia (sinónimo llamado hidrofobicidad) está definida por la partición de un compuesto entre una fase acuosa y una fase no acuosa. Hoy en día P (*n*-octanol/agua) se define como la relación de concentraciones de la sustancia entre las fases orgánica y acuosa de un sistema de dos componentes en condiciones de equilibrio [51, 52].

Determinación de $\log P$ del compuesto LQM314 entre *n*-Octanol y agua.

Los reactivos usados son: *n*-octanol (Baker) y agua desionizada con un equipo Milli-Q de la marca Millipore (0.182 M Ω • m), ambos fueron presaturados para mantener constante la relación de volumen durante el proceso de extracción líquido-líquido. Los espectros UV de la fase octanólica fueron obtenidos con un espectrofotómetro de la marca Perkin Elmer 950, usando una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Curva de Calibración. Se obtuvieron los espectros de absorción para elaborar la curva de calibración, disolviendo cantidades adecuadas de LQM314 en *n*-octanol presaturado con agua (Figura A1). En la figura A2 se presenta la curva de calibración para el LQM314.

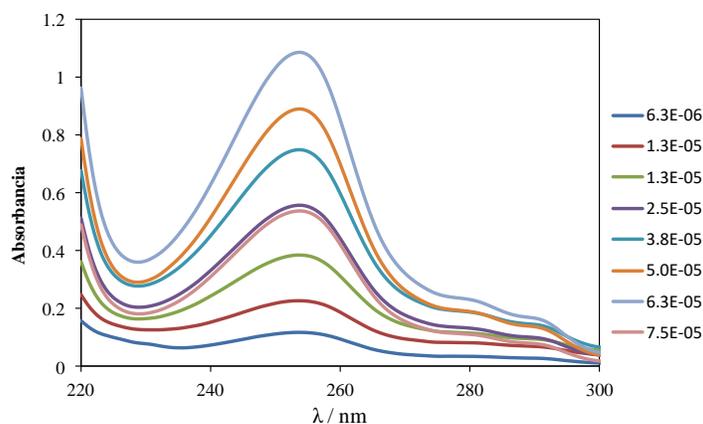


Figura A1. Conjunto de espectros UV de LQM314 para la curva de calibración con diferentes concentraciones.

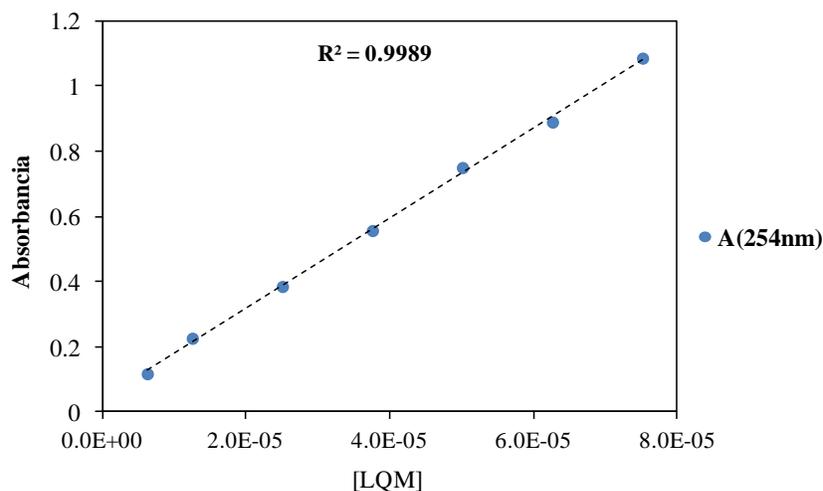


Figura A2. Curva de calibración elaborada a partir de los espectros de la figura A1, a una longitud de onda de 254 nm.

La ecuación obtenida para la regresión lineal de la curva de calibración fue:

$$A^{\lambda} = [LQM]_{\text{octanol}} \frac{\text{mol}}{\text{L}} + \text{ordenada}$$

$$A^{254} = (13838.48 \pm 259.89) \frac{\text{mol}}{\text{L}} + (0.04 \pm 0.01) \quad R^2 = 0.998 \quad \text{para } LQM314$$

donde $[LQM]_{\text{octanol}}$ representa la concentración de LQM en la fase octanólica.

Un volumen de 10 mL de la solución stock de LQM en octanol, con una concentración aproximada alrededor de la mitad de la curva de calibración, se mezcló con 10 mL de agua desionizada presaturada con octanol. Se agitó muy fuerte por aproximadamente 2 min y posteriormente se dejó reposar para permitir la separación de las fases. Se utilizó una mezcla similar como blanco en las mediciones de absorbancia, pero se cambió octanol presaturado con agua en lugar de la solución stock de LQM.

La concentración del LQM314 en la fase octanólica se obtuvo por interpolación en la curva de calibración de la absorbancia medida. Esta determinación se realizó por triplicado (figura A3). En la figura A4 se presenta los espectros de absorción para el LQM314 en la fase acuosa.

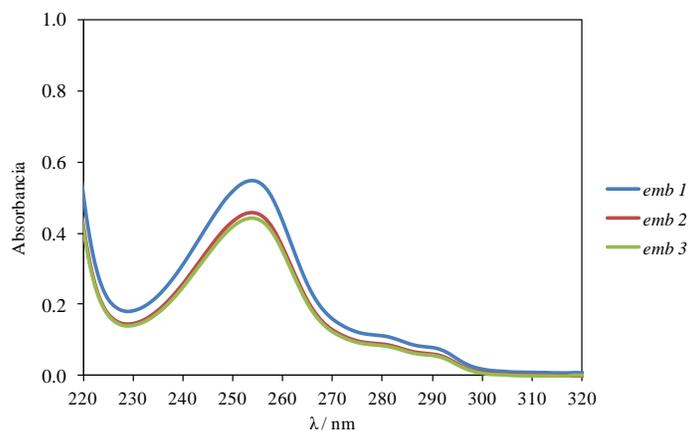


Figura A3. Espectros UV obtenidos por triplicado del LQM314 en la fase orgánica.

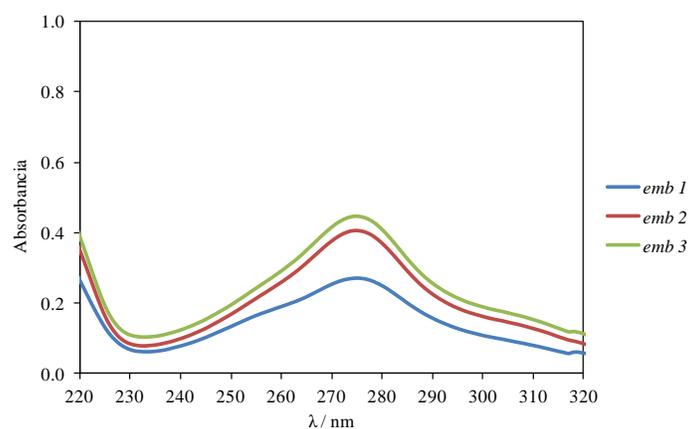


Figura A4. Espectros UV obtenidos por triplicado del de LQM314 en la fase acuosa.

Fracción extraída y log P. La fracción extraída del LQM314 de obtuvo mediante la siguiente ecuación.

$$E_{LQM,oct} = \frac{[LQM_{oct}]}{[LQM_{oct}]_0}$$

donde $[LQM_{oct}]_0$ representa la concentración correspondiente a la fase octanólica antes de la extracción, y finalmente el valor de $\log P$ se obtuvo con la ecuación:

$$\log P_{LQM} = \log \left[\frac{1}{r} \left(\frac{E_{LQM,oct}}{1 - E_{LQM,oct}} \right) \right]$$

r , es la relación de volumen entre n-octanol y agua.

Tabla A1. Valor experimental de $\log P$ en Octanol-Agua para el compuesto LQM314

| <i>compuesto</i> | <i>log P</i> |
|------------------|-------------------|
| LQM314 | 0.243 \pm 0.009 |

Para el LQM314 se obtuvo un valor pequeño para su $\log P$ como se observa en la *tabla A1*, esto se atribuye a los anillos morfolínicos presentes en la estructura de este compuesto, además de que este compuesto tiene una solubilidad muy alta en agua en comparación con el LQM303 mencionado en este trabajo. Es importante mencionar en base a este valor determinado de $\log P$, que se cumple con la regla de Lipinski [53], que habla sobre las características físico-químicas que deben de cumplir los fármacos.

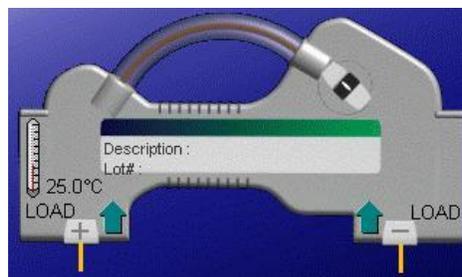
APÉNDICE B

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

La electroforesis capilar (**CE**, Capillary Electrophoresis) es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución buffer a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante.

El mecanismo de separación en CE es la migración diferencial debido a las diferentes movilidades electroforéticas. La técnica de electroforesis capilar da lugar a separaciones en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño (10-200 nm) con volúmenes de muestra extraordinariamente pequeños (0.1 a 10 nL), con una elevada resolución y rapidez [54].

La instrumentación básica es simple, consta de una fuente de voltaje, un capilar, viales de muestra, buffer, y un detector. El capilar está en contacto con los viales de entrada y salida, los cuales a su vez contienen los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial. El capilar está lleno con la misma solución contenida en ambos viales y esta solución constituye el medio de conducción de la corriente eléctrica [54].



FUNDAMENTO DE LAS SEPARACIONES ELECTROFORÉTICAS.

La **velocidad de migración** de un ión, v , en centímetros por segundo, afectado por un campo eléctrico, es igual al producto de la intensidad del campo eléctrico E ($V\ m^{-1}$) por la *movilidad electroforética* μ_{ef} ($m^2\ V^{-1}\ s^{-1}$), esto es:

$$v = \mu_{ef} \cdot E$$

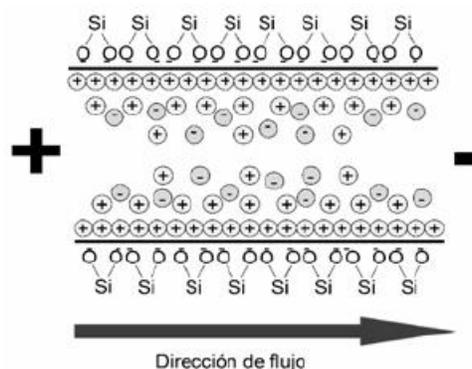
por lo cual, es necesario aplicar potenciales elevados para obtener migraciones iónicas rápidas y, por lo tanto, una rápida separación [55].

FLUJO ELECTROOSMÓTICO

Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada.

La causa de este flujo es la doble capa eléctrica que se forma en la interfase sílice/disolución. A valores de pH por encima de 3, la pared interna del capilar de sílice presenta carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie. Los cationes del buffer se agrupan sobre la superficie negativa del capilar de sílice para formar la doble capa eléctrica.

Los cationes, situados en la capa exterior difusa de la doble capa, son atraídos hacia el cátodo o electrodo negativo, y dado que los cationes están solvatados arrastran al resto de la disolución con ellos, a lo largo del capilar.



Esta acción de bombeo es llamada electroósmosis. La electroósmosis conduce a un flujo en la disolución que tiene un perfil plano, perpendicular al capilar. Debido a este perfil esencialmente plano, el flujo electroosmótico no contribuye de manera significativa al ensanchamiento de banda. Como consecuencia de la electroósmosis, el orden de elución en una separación por electroforesis capilar es:

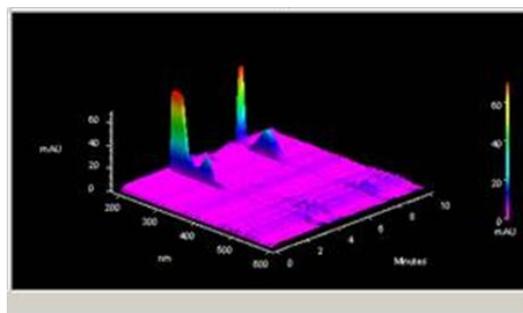
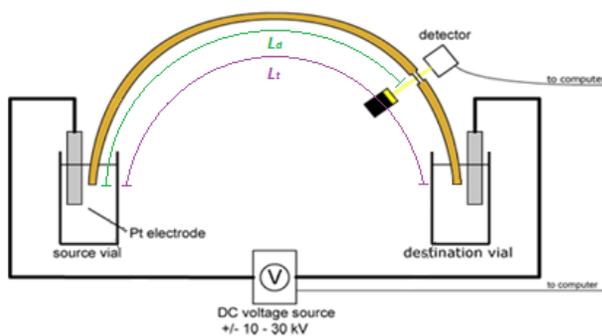
- 1) primero los cationes más rápidos
- 2) seguidos sucesivamente de los cationes más lentos,
- 3) las especies neutras (con la velocidad del EOF), en una única zona
- 4) finalmente los aniones más lentos seguidos de los aniones más rápidos.

MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Un concepto de gran importancia en CE, es el de *movilidad electroforética*, la cual se ve afectada por la carga, la forma y el tamaño del analito. Para calcularla es necesario conocer su tiempo de migración, que es el tiempo requerido por el analito para migrar desde el punto de introducción de la muestra hasta el punto de detección.

$$\mu = \frac{(L_d \cdot L_t)}{(t \cdot V)}$$

| | |
|---|-----|
| L_d : longitud efectiva del capilar (del “inlet” al detector) | [m] |
| L_t : longitud total del capilar | [m] |
| t : tiempo de respuesta | [s] |
| V : voltaje aplicado en la separación | [V] |



APÉNDICE C

ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Todas las especies químicas interactúan con las radiaciones electromagnéticas y al hacerlo, decrece la intensidad del haz de la radiación. La espectroscopia de absorción, una de las técnicas de la química analítica que se basa en la medida de esta disminución.

Los principios y leyes que rigen la absorción de radiaciones son aplicables a todas las longitudes de onda. Las medidas de absorción consisten en determinar la disminución de la intensidad de un haz de radiaciones cuando éste pasa a través de un medio absorbente de unas dimensiones dadas.

Cuando una molécula absorbe un fotón aumenta la energía de la molécula. Se dice que la molécula ha pasado a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, disminuye la energía de la molécula. El estado de mínima energía de una molécula se llama estado fundamental. Las radiaciones visibles y UV hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía.

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible encuentran una enorme aplicación en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies tanto inorgánicas como orgánicas [54].

Cuando una muestra absorbe luz, la intensidad del haz de luz disminuye. La intensidad, I , es la energía por segundo y por unidad de área del haz de luz.

La transmitancia, T se define como la fracción de la luz incidente que pasa a través de la muestra.

$$\text{Transmitancia:} \quad T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Por tanto, T puede valer entre 0 y 1. La absorbancia se define como:

Absorbancia:
$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log(T) \quad (2)$$

Cuando no se absorbe luz, $I = I_0$ y $A = 0$. Por ejemplo, si se absorbe el 90% de la luz, se transmite el 10%, y $I = I_0/10$. Este cociente vale $A = 1$.

Cuando una radiación monocromática atraviesa una muestra que contiene especies absorbentes, la intensidad de la energía radiante disminuye progresivamente en la medida que las partículas de aquellas especies absorben esta energía. La disminución de la intensidad de la radiación depende de la concentración del absorbente y de la longitud del camino recorrido por el haz. Lo anterior se agrupa en la ley de Beer-Lambert [55].

La ley de Beer-Lambert muestra que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, C , de la especie que absorbe la luz en la muestra.

Ley de Beer:
$$A = \epsilon b C \quad (3)$$

La ecuación anterior es el fundamento de la espectrofotometría tal como se aplica en química analítica. La absorbancia es adimensional. La concentración de la muestra, C , normalmente tiene unidades de mol/L . El paso óptico tiene unidades de centímetros. A la cantidad “ ϵ ” se le denomina absortividad molar y sus unidades son $M^{-1}cm^{-1}$. La absorbancia molar es la característica de una sustancia que nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada.

APÉNDICE D

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

En este trabajo se utilizó un análisis quimiométrico multivariante llamado análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) para realizar una estimación del número de especies que absorben en forma diferente en el sistema. El método se basa en la descomposición de la matriz de datos de absorbancia en tres matrices, cuyo producto reconstruye la matriz original, como se muestra en la ecuación 1.

$$\mathbf{A} = \mathbf{SEL} \quad (1)$$

En la ecuación 1, **A** representa la matriz de las absorbancias, **S** representa la matriz de los *scores*, **L** representa la matriz de los *loadings* y **E** representa la matriz de los eigenvalores (o valores propios).

Las columnas de la matriz **A** están formadas por los espectros de absorción de la solución para cada uno de los valores de pH obtenidos.

Los renglones de la matriz **S** tienen información de las muestras (que en el caso del presente trabajo son soluciones equimolares de Cu(II) y LQM a diferentes valores de pH). Es por eso que se dice que los *scores* son combinaciones de las muestras y, en cierto sentido, pueden considerarse nuevas muestras en un espacio abstracto.

Las columnas de la matriz **L** tienen información de las variables (que aquí son los espectros de absorción para cada una de las soluciones). Así, los *loadings* se relacionan con los eigenvectores (o vectores propios) y, en forma abstracta, con las especies que absorben luz en el sistema. Los *loadings* son entonces combinaciones de las variables y, en cierto sentido, pueden considerarse nuevas variables en un espacio abstracto.

Finalmente, **E** es una matriz diagonal formada por los eigenvalores, en donde cada elemento de la diagonal va de mayor a menor.

Así, se dice que el i -ésimo renglón de la matriz \mathbf{S} , el i -ésimo elemento diagonal de la matriz \mathbf{E} y la i -ésima columna de la matriz \mathbf{L} se relacionan con el i -ésimo componente.

El PCA, que se resume en la ecuación 1, tiene dos restricciones relevantes: cada componente debe apuntar en la dirección de máxima dispersión (maximizar la varianza) y los componentes deben ser ortogonales.

De esta forma, el eigenvalor del primer componente es el más grande de todos los eigenvalores y los demás son cada vez menores. Es por eso que los eigenvalores son directamente proporcionales a la varianza. También es posible concluir que los primeros eigenvalores están asociados a los componentes principales (PC, por sus siglas en inglés, y que se representan como PC1, PC2, ..., PCM). El adjetivo “principales” tiene el significado de que explican la varianza que representan por factores deterministas; esto es, contienen información relevante.

De algún componente en adelante (PCM, de acuerdo al párrafo anterior), los componentes están asociados a varianza aleatoria (PC(M+1), PC(M+2), ..., PCN; y, aunque ya no son principales se acostumbra mantener la etiqueta “PC”). Estos componentes ya no tienen información relevante en el sistema porque representan el nivel del error de las mediciones.

Si se quiere conocer el número mínimo de componentes principales que explican prácticamente toda la varianza determinista entonces se puede hacer una descripción prácticamente total del sistema, con menos variables que las utilizadas para la caracterización del mismo.

Es posible contar los primeros componentes principales (PC1, PC2, ..., PCM) y reconstruir el total de la información de la matriz original dentro del nivel de error de las determinaciones experimentales: se dice entonces que sólo se necesitan M factores o componentes para reconstruir la información relevante del sistema. Los componentes

restantes ($PC(M+1)$, $PC(M+2)$, ..., PCN) pueden ser considerados como componentes asociados al error, reflejando ruido principalmente.

En el caso de este trabajo, el número de PC's que reconstruyen la información relevante se interpreta como igual al número de especies químicas que absorben diferente en el sistema.

REFERENCIAS

1. Beledo, J.F., J.A.A. Simón, and Á.M. Martínez, *Farmacología humana*. 2013: Elsevier Health Sciences Spain.
2. Velázquez, A.M., et al., *Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **43**(3): p. 486-500.
3. Salud, O.M.d.I., *Información general sobre la hipertensión en el mundo.*, in *Publicaciones OMS*. 2013, WHO Document Production Service: Ginebra (Suiza). p. 40.
4. Salud, O.M.d.I., *Causas de muerte 2008*. 2008: Ginebra, Suiza.
5. Lim SS, V.T., Flaxman AD, Danaei G, et al, *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2224-2260.
6. Campos-Nonato I, H.-B.L., Rojas-Martínez R, Pedroza-Tobías A, Medina-García C, Barquera S., *Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos*, S.P. Mex., Editor. 2013: México. p. 144-150.
7. Salud, O.M.d.I., *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles*. 2010, Organización Mundial de la Salud: Ginebra, Suiza.
8. Evelyn, C.d.L., *Hipertensión Arterial*. 1997, Caracas, Venezuela.
9. N., K.W., *Medicina Interna*. 2da ed. 1992, Madrid, España.
10. Chobanian, A.V., et al., *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. JAMA, 2003. **289**(19): p. 2560-72.
11. Lorenzo, M.G.L.L.H.M.S.P.P. and P.L. Fernández, *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Médica Panamericana.
12. Katzung, B.G., *Farmacología básica y clínica*. 12a ed. 2013: McGrawHill Edición.
13. Nelson, P.H., A.M. Strosberg, and K.G. Untch, *Mono- and diaryl-2-quinuclidinylcarbinols with local anesthetic and antiarrhythmic activity*. Journal of Medicinal Chemistry, 1980. **23**(2): p. 180-184.
14. Li, L.Q., et al., *Studies on a new antiarrhythmic drug changrolin-4-(3',5'-bis [(N-pyrrolidinyl) methyl]-4'-hydroxyanilino)-quinazoline*. Scientia Sinica, 1979. **22**(10): p. 1220-1228.
15. Stout, D.M., et al., *Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols. 1. Heteroarylamine derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry, 1983. **26**(6): p. 808-813.
16. Stout, D.M., et al., *Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols. 2. Amides*. Journal of Medicinal Chemistry, 1984. **27**(10): p. 1347-1350.
17. Stout, D.M., et al., *Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols. 3. Modifications to the linkage region (region 3)*. Journal of Medicinal Chemistry, 1985. **28**(3): p. 295-298.
18. Velázquez, A.M., et al., *A novel one pot, solvent-free Mannich synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation*. Arkivoc, 2006. **2006**(2): p. 150-161.
19. Sharpe, A.G. and V.I. Rubio, *Química inorgánica*. 1996: Reverté.
20. Fernández, J.S.C., *Química bioinorgánica*. 2002: Síntesis.
21. Martell, A.E. and R.D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions*. 1996: Springer US.

22. Brewer, G.J., *Wilson's Disease: A Clinician's Guide to Recognition, Diagnosis, and Management*. 2012: Springer US.
23. Scheinberg, I.H. and I. Sternlieb, *Wilson disease and idiopathic copper toxicosis*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1996. **63**(5): p. 842S-5S.
24. Walshe, J.M., *Copper Chelation in Patients with Wilson's Disease* A COMPARISON OF PENICILLAMINE AND TRIETHYLENE TETRAMINE DIHYDROCHLORIDE. QJM, 1973. **42**(3): p. 441.
25. Frías González, S.E., et al., *Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer*. Toxicology, 2013. **314**(1): p. 155-165.
26. Zuniga, O., et al., *Molecular docking of 4-tert-butyl-bis-(2,6-thiomorpholin-4-ylmethyl)-1-phenol (LQM319) on Fas receptor (CD95)*. J. Cancer Ther., 2013. **4**(1): p. 176-181, 6 pp.
27. Bontchev, P.R. and I.N. Pantcheva, *Copper(II) complexes of blood pressure active drugs*. Transition Metal Chemistry, 2002. **27**(1): p. 1-21.
28. Islas-Martínez, J.M., et al., *Deprotonation mechanism of new antihypertensive piperidinylmethylphenols: A combined experimental and theoretical study*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(34): p. 11765-11774.
29. Westcott, C.C., *pH measurements*. 1978, New York: Academic Press.
30. Woermann, D., *R. G. Bates: Determination of pH, Theory and Practice. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1973. 479 Seiten. Preis: £ 10.00*. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1973. **77**(9): p. 737-737.
31. L. Fonseca, L.B., *Cinética Química Aplicada a Los Procesos de Descomposición de Los Fármacos*. 2004: Editorial Universidad de Costa Rica.
32. Rodríguez-Barrientos, D., et al., *Determination of pKa values of tenoxicam from ¹H NMR chemical shifts and of oxicams from electrophoretic mobilities (CZE) with the aid of programs SQUAD and HYPNMR*. Talanta, 2009. **80**(2): p. 754-762.
33. Leggette, D.J., *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, in *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, P. Press, Editor. 1985: New York. US.
34. Moya-Hernández, R., et al., *Statistical Study of Distribution Diagrams for Two-Component Systems: Relationships of Means and Variances of the Discrete Variable Distributions with Average Ligand Number and Intrinsic Buffer Capacity*. Journal of Chemical Education, 2002. **79**(3): p. 389.
35. Rojas-Hernández, A., et al., *Predominance-Zone Diagrams in Solution Chemistry: Dismutation Processes in Two-Component Systems (M-L)*. Journal of Chemical Education, 1995. **72**(12): p. 1099.
36. A., A.-H., *Estudio de la interacción química del compuesto LQM314 con el ión metálico Cu(II)*. 2012, UNAM.
37. Puigdomenech, I., *MEDUSA - Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms*. 2009.
38. Skoog, D.A., D.M. West, and S. Crouch, *Fundamentos de química analítica*. 2005: Thomson.
39. AB, M.A., *DATAN 5.0 Software* <http://multid.se/datan.php> p. DATAN is the ultimate tool to analyze chemical equilibria and chemical reaction kinetic by spectroscopy. The software is based on MultiD proprietary technology, and can decompose spectroscopic data into fundamental components.
40. Ghasemi, J., et al., *Determination of Acidity Constants of 4-(2-Pyridylazo)resorcinol in Binary Acetonitrile + Water Mixtures*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2003. **48**(5): p. 1178-1182.

41. Conny, J.M. and R.R. Meglen, *Effect of white noise on abstract factor analysis using simulated equilibrium data*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(21): p. 2580-2589.
42. Gans, P., A. Sabatini, and A. Vacca, *Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs*. Talanta, 1996. **43**(10): p. 1739-1753.
43. Lucia, M.M.D., *Estudios de especiación química del compuesto LQM314 con el Cation Cu(II) en su sal de acetato.*, in *Facultad de estudios superiores, Cuautitlán. UNAM*. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México.
44. Ringbom, A., *Complexation in Analytical Chemistry*. 1993: John Wiley & Sons Australia, Limited.
45. Álvarez-Diduk, R., et al., *Deprotonation Mechanism and Acidity Constants in Aqueous Solution of Flavonols: a Combined Experimental and Theoretical Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2013. **117**(41): p. 12347-12359.
46. Rebollar-Zepeda, A.M. and A. Galano, *First principles calculations of pKa values of amines in aqueous solution: Application to neurotransmitters*. International Journal of Quantum Chemistry, 2012. **112**(21): p. 3449-3460.
47. M. J. Frisch, G.W.T., 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. J. Rega Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. E. Gomperts, O. Stratmann, A. J. Yazyev, R. Austin, C. Cammi, J. W. Pomelli, R. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, y D. J. Fox, *Gaussian 09*. 2009, Gaussian, Inc: Wallingford CT.
48. Víctor H Vázquez-Valadez, V.H.A., Pablo A Martínez, Gabriela Torres, Oscar Zúñiga, Daniel Escutia, Rebeca Vilchis, Ana Ma. Velázquez, Luisa Martínez, Mónica Ruiz, Brígida Camacho, Rafael López-Castañares, Enrique Angeles *Docking Studies of Methylthiomorpholin Phenols (LQM300 Series) with Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)* The Open Medicinal Chemistry Journal 2013. **7**: p. 30-38.
49. Pérez-González, A. and A. Galano, *On the hydroperoxyl radical scavenging activity of two Edaravone derivatives: mechanism and kinetics*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2013. **26**(3): p. 261-268.
50. Mariana, R.Z.A., *Estudio Computacional de Equilibrios Químicos en Solución: Acidez y Formación de Complejos*, in *Química*. 2016, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa: México, D.F.
51. Kubinyi, H., *QSAR : Hansch analysis and related approaches*. 1993: VCH.
52. Lipinski, C.A., *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(1): p. 235-49.
53. Lipinski, C.A., *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*. Drug Discovery Today: Technologies, 2004. **1**(4): p. 337-341.
54. D. A. Skoog, F.J.H., T. A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*. 5a ed. 2001, Madrid, España.
55. Harris, D.C., *Análisis Químico Cuantitativo*. 3a ed. 2007, España.

Determination of Acidity Constants, Partition Coefficients between Water and 1-Octanol, and Deprotonation Route of 4-*tert*-butyl-bis-(2,6-thiomorpholin-4-ylmethyl)-1-phenol and 4-hydroxy-3,5-bis(morpholin-1-ylmethyl)benzotrile; Compounds with Antihypertensive Properties

Agustin Ibarra-Escutia,¹ Alberto Rojas-Hernández,^{1*} Annia Galano,¹ Enrique Ángeles,² Diana Martínez-Mendoza³ and Rosario Moya-Hernández³

¹ Departamento de Química, Área de Química Analítica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ap. Postal 55-534, San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina, 09340 México, D.F. México.

² Departamento de Ciencias Químicas, Laboratorio de Química Medicinal, Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, Campo 1, Av. 1ero de Mayo S/N. Col. Sta. María las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México.

³ Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, Campo 4, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Col. San Sebastián Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

* Corresponding author: suemi918@xanum.uam.mx

Received March 28th, 2016; Accepted August 3rd, 2016.

Abstract. The pK_a values for two compounds (LQM303 and LQM314) with antihypertensive properties were determined by UV spectroscopy (T = 310.15 K and I = 0.15 M) and by Capillary Zone Electrophoresis (T = 310.15 K and I = 0.05 M), using the program SQUAD. The partition coefficients (log*P*) between water and 1-octanol have also been determined experimentally, demonstrating that both compounds fulfill with the physicochemical parameter log*P* ≤ 5 of Lipinski's rules. Calculations on the framework of Density Functional Theory have allowed identifying the functional group related to each pK_a for each compound.

Key words: pK_a values; electrophoretic mobility; conformational study; UV absorption spectra; CZE; DFT.

Resumen. Los valores de pK_a de dos nuevos compuestos con propiedades antihipertensivas (LQM303 y LQM314) se determinaron por espectrofotometría UV (T = 310.15 K y I = 0.15 M) y por electroforesis capilar de zona (T = 310.15 K y I = 0.05 M), usando el programa SQUAD. Los coeficientes de reparto (log*P*) entre agua y 1-octanol también se determinaron experimentalmente, demostrándose que ambos compuestos cumplen el parámetro fisicoquímico log*P* ≤ 5 de las reglas de Lipinski. Cálculos en el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad permitieron identificar el grupo funcional asociado a cada pK_a para ambos compuestos.

Palabras clave: valores de pK_a; movilidad electroforética; estudio conformacional; espectros de absorción UV; CZE; DFT.

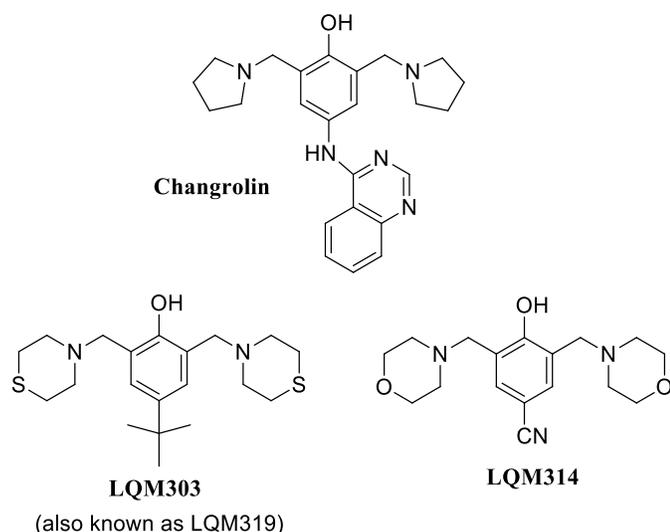
Introduction

One of the key risk factors of cardiovascular disease is hypertension. It already affects one billion people worldwide, and can cause heart attacks and strokes [1]. In the world, cardiovascular diseases are responsible for about 17 million deaths a year, almost one third of the total [2]. Among them, the complications of hypertension cause 9.4 million deaths annually [3]. That is why one of the main goals of the World Health Organization (WHO) in this context is to diminish the incidence of hypertension and the associated health risks. One of the targets of WHO is to cover at least 50% of people at moderate to high risk of developing heart attack and stroke with pharmacologically treating. This requires to guarantee the availability of basic technologies and essential generic drugs for this purpose. Some of them are thiazide diuretic, angiotensin converting enzyme inhibitor, long-acting calcium channel blockers, beta blockers,

etc. Therefore, it is of great importance to develop and characterize new drugs that can be used as anti-hypertensives.

In the early 80's Stout and coworkers [4-7] studied changrolin derivatives for that purpose. These researchers proposed that the presence of phenol and pyrrolidine rings are structural key factors for the antiarrhythmic effects. More recently, Velázquez *et al.* [8, 9] synthesized a series of compounds, usually referred to as LQM's, which exhibit antihypertensive effects. Compared to changrolin derivatives, these compounds present morpholin and thiomorpholin rings instead of the pyrrolidine ring (Scheme 1).

They show not only antihypertensive activity but also low toxicity. In the case of 4-*tert*-butyl-bis-(2,6-thiomorpholin-4-ylmethyl)-1-phenol (LQM303, Scheme 1), its anti-hypertensive effects exceed commercial drugs like losartan [9,10]. Other compounds, such as the 4-hydroxy-3,5-bis(morpholin-1-ylmethyl)benzotrile (LQM314, Scheme 1), are still in study



Scheme 1. Structures of changrolin, thiomorpholin (LQM303) and morpholin (LQM314) compounds studied in this work.

regarding their pharmacological properties, but are considered promising drugs. However, it has not been fully characterized yet. For example its acidity constants (pK_a values) and the partition coefficient ($\log P$) between water and 1-octanol have not been reported.

The acid-base character of a drug is of great significance in pharmacology, thus physicochemical characterization of compounds having biological activity includes determining their acidity constants [11]. Physicochemical properties are of special value since they are directly related to the intermolecular forces involved in the drug-receptor interaction as well as to the transport and distribution properties of drugs. In this respect hydrophobic, polar, electronic, and steric properties are most important. Lipophilicity (synonymously called hydrophobicity) is defined by the partitioning of a compound between an aqueous and a nonaqueous phases. Nowadays, the partition coefficient (P) is defined as the ratio of substance concentrations in the organic and aqueous phases of a two-compartment system under equilibrium conditions. [12, 13, 14]. It is now common to express this coefficient as $\log P$, as mentioned Lipinski [13].

Since most drugs are weak acids or bases, the pH of the environment frequently rules the dissolved fraction and the unionized form that can diffuse into the cells. This fraction depends on the chemical nature of the drug, its pK_a and the local pH. In addition, it is very common to find drugs that show more than one pK_a value, and the whole set of them should be considered for estimating the molar fractions of the different acid-base species, and consequently for fully characterizing their population under the conditions of interest. Identifying deprotonation routes for chemical compounds with several acid protons is frequently a challenging task that can be achieved using different techniques. Among them, computational theoretical studies constitute viable, and relatively inexpensive alternatives that are frequently used in this context [15, 16].

Then, one of the main goals of the present investigation is to determine the pK_a 's and $\log P$ values for LQM303 and

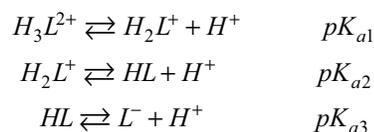
LQM314. For that purpose, the used methodology is similar to that previously used –successfully– for similar compounds [17]. In addition, the acidity constants are estimated under pseudo-physiological conditions of temperature (T) and ionic strength (I). Furthermore, since the drugs investigated in this work are poly-acids, computational chemistry has been used to identify the most viable deprotonation routes, albeit the pK_a values are estimated using experimental techniques.

Results and discussion

CZE Study

A model taking into account the contribution of each species to the effective mobility LQM was constructed. It was necessary to know the molar fraction of each species, i.e., H_3L^{2+} , H_2L^+ , HL and L^- , according to the distribution diagram [18,19], where HL represents the neutral species of LQM.

Therefore, for a set of species defined by the acid-base successive equilibria



the effective electrophoretic mobility (u_L) is defined by:

$$u_L = u_{L^-} f_{L^-} + u_{HL} f_{HL} + u_{H_2L^+} f_{H_2L^+} + u_{H_3L^{2+}} f_{H_3L^{2+}} \quad (1)$$

where the f_{HL} term represent the molar fraction of the LQM species, u_{L^-} , u_{HL} , $u_{H_2L^+}$ and $u_{H_3L^{2+}}$ are the corresponding mobilities. In equation (1), the electrophoretic mobility for species HL is zero. An equivalent way of representing Equation 1 is:

$$u_L = \frac{u_{L^-} + u_{H_2L^+} \left[10^{(pK_{a2} + pK_{a3} - 2pH)} \right] + u_{H_3L^{2+}} \left[10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)} \right]}{1 + 10^{(pK_{a3} - pH)} + 10^{(pK_{a2} + pK_{a3} - 2pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)}} \quad (2)$$

Equation 2 is used to propose a theoretical model of electrophoretic mobility as a function of pH that reproduces the experimental data.

Experimental values for the effective mobility (u_{eff}) of LQM303 and LQM314, calculated by the equation $u_{eff} = u_{app} - u_{eof}$, where u_{app} is the apparent (measured) mobility and u_{eof} is the electroosmotic mobility (related with the electroosmotic flow).

The experimental and calculated (by Equation 2) effective mobilities, as a function of pH, are presented in Figure 1. Theoretically, the inflection points of these curves should represent the pK_a values of the substance. Figure 2a shows that, in the case of LQM303, there is experimental data only up to $pH = 7.139$. This is because the compound precipitates at more basic pH values. In fact, the solubility of the neutral form of this

compound, in these conditions, was estimated to be approximately 4.4×10^{-5} M.

The pK_a values, ionic mobility of each species and the parameters of the fitting of the curves shown in Figure 1 with the program SQUAD [20,21] are shown in Table 1.

UV Spectrophotometric Study

Pseudophysiological Conditions Study

($T = 310.15$ K and $I = 0.15$ M)

This determination is a model based on Beer's law and the law of additivity that are the basis of the proposed analysis. This

model takes into account the contribution given by each LQM species. Thus, the absorbance of the system at a particular wavelength (A^λ), and given optical path length (l), is:

$$A^\lambda = A_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} + A_{H_2L^+}^{(\lambda)} + A_{HL}^{(\lambda)} + A_{L^-}^{(\lambda)} \quad (3)$$

$$A^\lambda = \varepsilon_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} l [H_3L^{2+}] + \varepsilon_{H_2L^+}^{(\lambda)} l [H_2L^+] + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} l [HL] + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)} l [L^-] \quad (4)$$

Using the concentration of each species in terms of molar fractions (f_i), Equation 4 takes the following form:

$$A^\lambda = (\varepsilon_{H_3L^{2+}}^{(\lambda)} f_3 + \varepsilon_{H_2L^+}^{(\lambda)} f_2 + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} f_1 + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)} f_0) l \cdot [L^-] \quad (5)$$

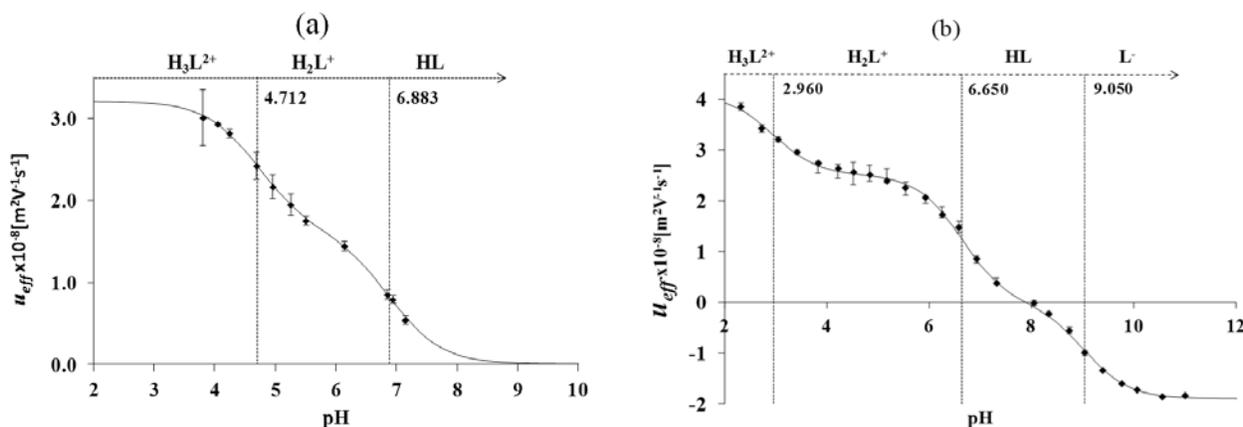


Fig. 1. Mobility curves as a function of pH, obtained at 37°C and ionic strength 0.05 M. The markers represent the experimental results, and the solid lines, the fittings obtained with the aid of the program SQUAD. In the top of each figure, the corresponding predominance-zone diagram of the species [18,19] is represented. a) LQM303. b) LQM314.

Table 1. pK_a values ($T=310.15$ K and $I=0.05$ M) refined with SQUAD from electrophoretic mobilities.

| Equilibria | $pK_{ai} \pm \sigma$ | effective ionic mobility ^(a) $u_{eff,i} (\times 10^8) / m^2V^{-1}s^{-1} \pm \sigma$ | equivalent conductivity ^(b) $\lambda_{HjLz} / cm^2S^{-1} equiv^{-1} \pm \sigma$ |
|--|----------------------|---|---|
| LQM303 $\sigma_{reg} = 0.027 \times 10^{-8} m^2V^{-1}s^{-1}$; $U = 0.019 \times 10^{-16} m^4V^{-2}s^{-2}$ (c) | | | |
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 4.712 ± 0.045 | | |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 6.883 ± 0.017 | | |
| $HL \rightleftharpoons L^- + H^+$ | - | | |
| H_3L^{2+} | | 3.206 ± 0.032 | 15.47 ± 0.15 |
| H_2L^+ | | 1.621 ± 0.027 | 15.64 ± 0.26 |
| L^- | | - | - |
| LQM314 $\sigma_{reg} = 0.061 \times 10^{-8} m^2V^{-1}s^{-1}$; $U = 0.221 \times 10^{-16} m^4V^{-2}s^{-2}$ (c) | | | |
| $H_3L^{2+} \rightleftharpoons H_2L^+ + H^+$ | 2.960 ± 0.070 | | |
| $H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ | 6.658 ± 0.035 | | |
| $HL \rightleftharpoons L^- + H^+$ | 9.050 ± 0.023 | | |
| H_3L^{2+} | | 4.099 ± 0.092 | 19.77 ± 0.44 |
| H_2L^+ | | 2.517 ± 0.038 | 24.28 ± 0.37 |
| L^- | | -1.884 ± 0.050 | 18.18 ± 0.48 |

(a) The effective ionic mobility of all the involved species were also estimated during refining.

(b) Equivalent conductivities of ions are calculated with the equation: $|\lambda_{HjLz}| = F u_{HjLz}$, where F accounts for the constant of Faraday. [21,22],

(c) σ_{reg} represents the standard deviation of the regression and U the sum of the squares for the residuals of effective mobilities.

Equation 5 represents the overall absorbance of LQM and describes the behavior of the model absorbance (at a wavelength) as a function of pH.

Due to the potential antihypertensive effects of the studied compounds, the UV spectrophotometric study was carried out under pseudophysiological conditions: $T = 310.15\text{ K}$ and $I = 0.15\text{ M}$.

The set of UV absorption spectra corresponding to LQM303 species for different pH values are shown in Figure 2. As it can be observed, there is a maximum of absorbance at 285 nm when the pH of the solution is 2.25 that presents bathochromic and hypochromic shifts when pH increases. In the same way that in CZE experiments, a precipitated is formed when solution pH is greater than 7, that prevented follow the study for that pH zone.

Additionally, the set of UV absorption spectra corresponding to LQM314 species are shown in Figure 3, for different pH values. An isosbestic point is shown at 255 nm in Figure 3a while a second isosbestic point is shown at 261 nm in Figure 3b; finally, a third isosbestic point, at 265 nm is shown in Figure 3c. These three isosbestic points seem to be related with three acid-base equilibria.

The absorption spectra shown in Figures 2 and 3 were introduced to program SQUAD for each LQM. For a two acid-base equilibria model for LQM303 and a three acid-base equilibria model for LQM314, the absorptivity coefficients obtained in the fitting are shown in Figure 4; the fitting obtained is good, as it can be shown in Table 2.

The calculated absorption spectra were obtained from global formation constants and molar absorptivity coefficients determined by SQUAD. Figure 5 presents a graphical comparison of the experimental with the calculated spectra, for different pH values. As it is shown in Figure 5, the fitting achieved is good, which strongly suggests that the refining procedure of the calculated constants is appropriate.

Log*P* Values between Water and 1-Octanol Obtained at Ambiance Temperature

Using direct experiments of liquid-liquid extraction between 1-octanol and water for each LQM, followed by the absorption spectra determination in the alcoholic phase, the partition coefficient of the LQM at neutral pH were determined. The log*P* values determined are shown in Table 3.

The $\log P = 2.031$ obtained for LQM303 agrees very well with some values reported previously for similar thiomorpholine compounds [23]. The lower value obtained for LQM314, $\log P = 0.243$, practically one order of magnitude lower, may

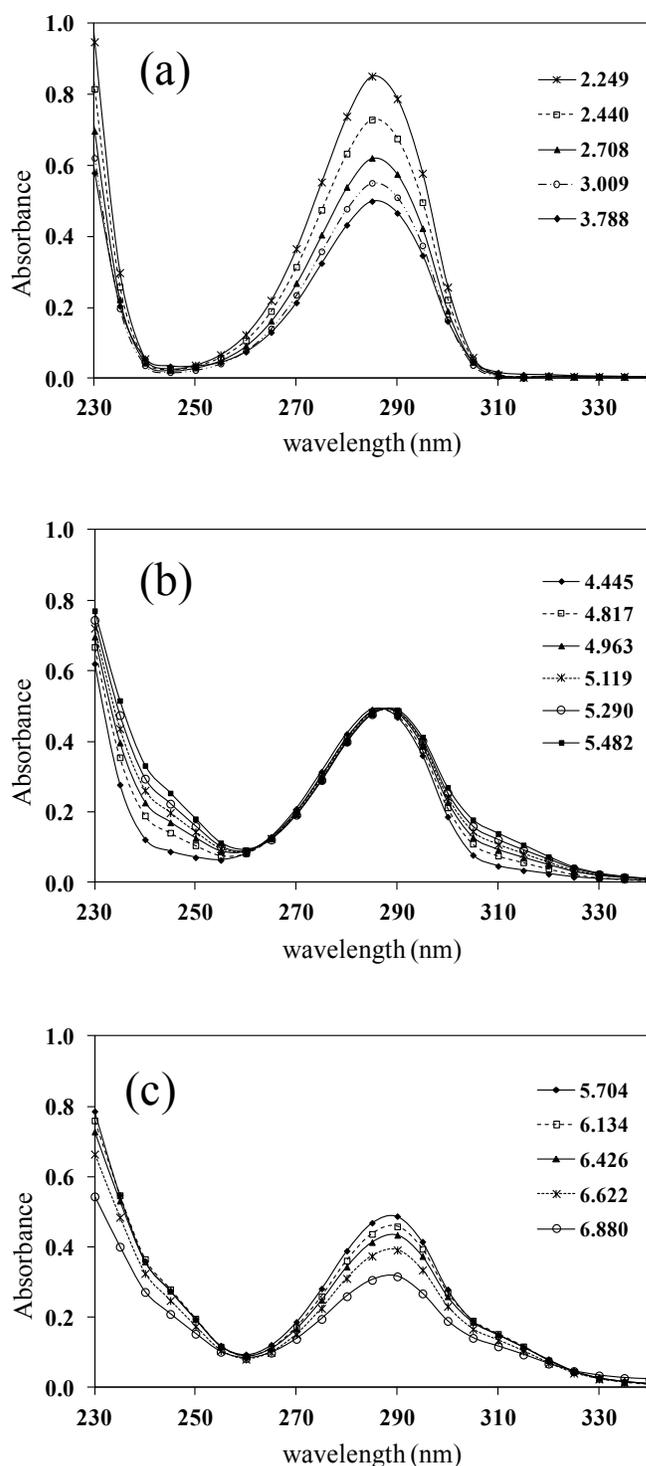


Fig. 2. UV absorption spectra for $[LQM303] = 2.6 \times 10^{-4}\text{ M}$. a) $2.249 \leq \text{pH} \leq 3.788$. b) $4.445 \leq \text{pH} \leq 5.482$. c) $5.704 \leq \text{pH} \leq 6.880$.

Table 2. pK_a values obtained under pseudophysiological conditions ($T = 310.15\text{ K}$ and $I = 0.15\text{ M}$), refined with SQUAD from spectrophotometric data.

| Compound | $\text{pK}_{a1} \pm \sigma$ | $\text{pK}_{a2} \pm \sigma$ | $\text{pK}_{a3} \pm \sigma$ | $\sigma_{\text{reg}}; U^a$ |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| LQM303 | 4.920 ± 0.013 | 7.111 ± 0.009 | - | $0.013; 0.025$ |
| LQM314 | 2.888 ± 0.014 | 7.005 ± 0.011 | 9.372 ± 0.004 | $0.006; 0.017$ |

^a σ_{reg} represents the standard deviation of the regression while U takes into account the sum of squares.

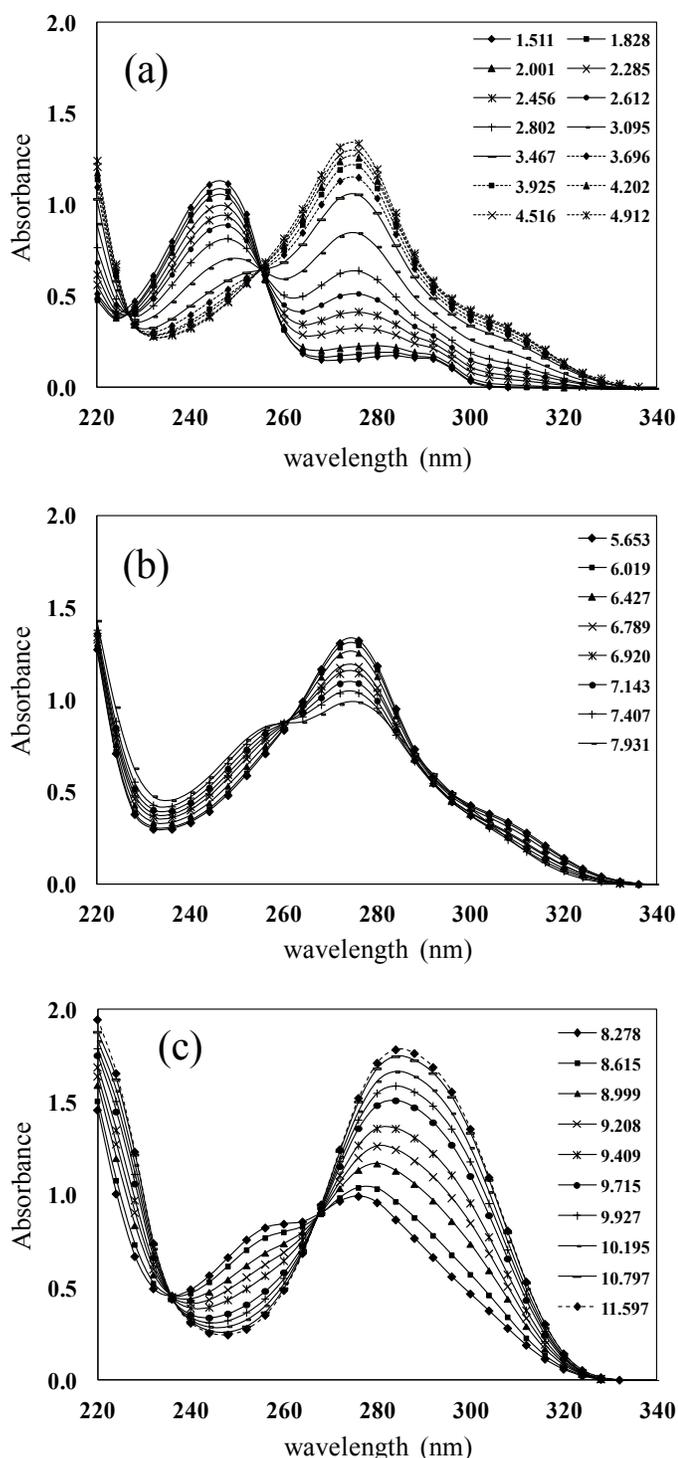


Fig. 3. UV absorption spectra for $[LQM314] = 6.9 \times 10^{-5} \text{ M}$. a) $1.511 \leq \text{pH} \leq 4.912$. b) $5.653 \leq \text{pH} \leq 7.931$. c) $8.278 \leq \text{pH} \leq 11.597$.

Table 3. Experimental $\log P$ values between water and 1-octanol for LQM compounds.

| Compound | $\log P$ |
|----------|-------------------------|
| LQM303 | $2.031 \pm 0.004^{(a)}$ |
| LQM314 | 0.243 ± 0.009 |

^(a) Good agreement with the value reported in [10].

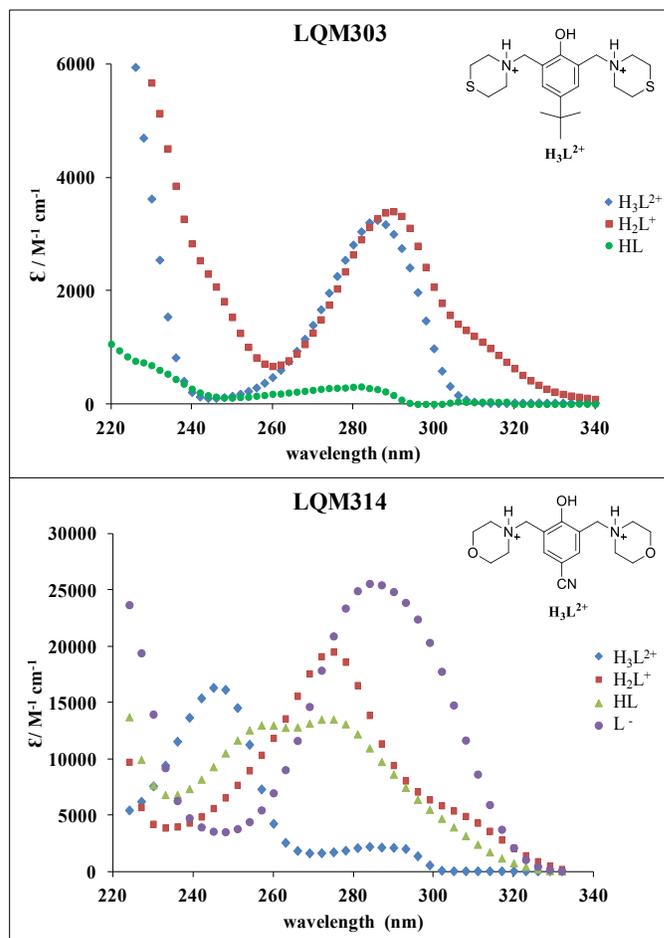


Fig. 4. Molar absorptivity coefficients of the LQM compounds refined with the program SQUAD.

be due to the oxygen atoms of morpholine rings present in the structure of this compound. Then LQM303 is more akin to the organic phase, as expected by its lower solubility in water than LQM314. It is important to remark that both compounds meet the corresponding Lipinski rule ($\log P < 5$), for compounds with great potential to develop drugs to treat diseases. The determined values in this work are in the expected range, compared with the values of two commercial antihypertensives: captopril ($\log P = 1.02$) and losartan ($\log P = 4.01$) [10].

Theoretical Study

The first step of the theoretical study was to perform conformational studies of the involved species. Six conformers were located for LQM303 compound, and five conformers for LQM314 compound (Tables 1S and 2S, Supporting Information), and their relative energies are provided in Table 4. The optimized structures of the conformers identified as the lowest in energy are shown in Figure 6.

After identifying the most likely conformers for the complete protonated species (H_3L^{2+}), they were used as starting points in the search for the most likely deprotonation route.

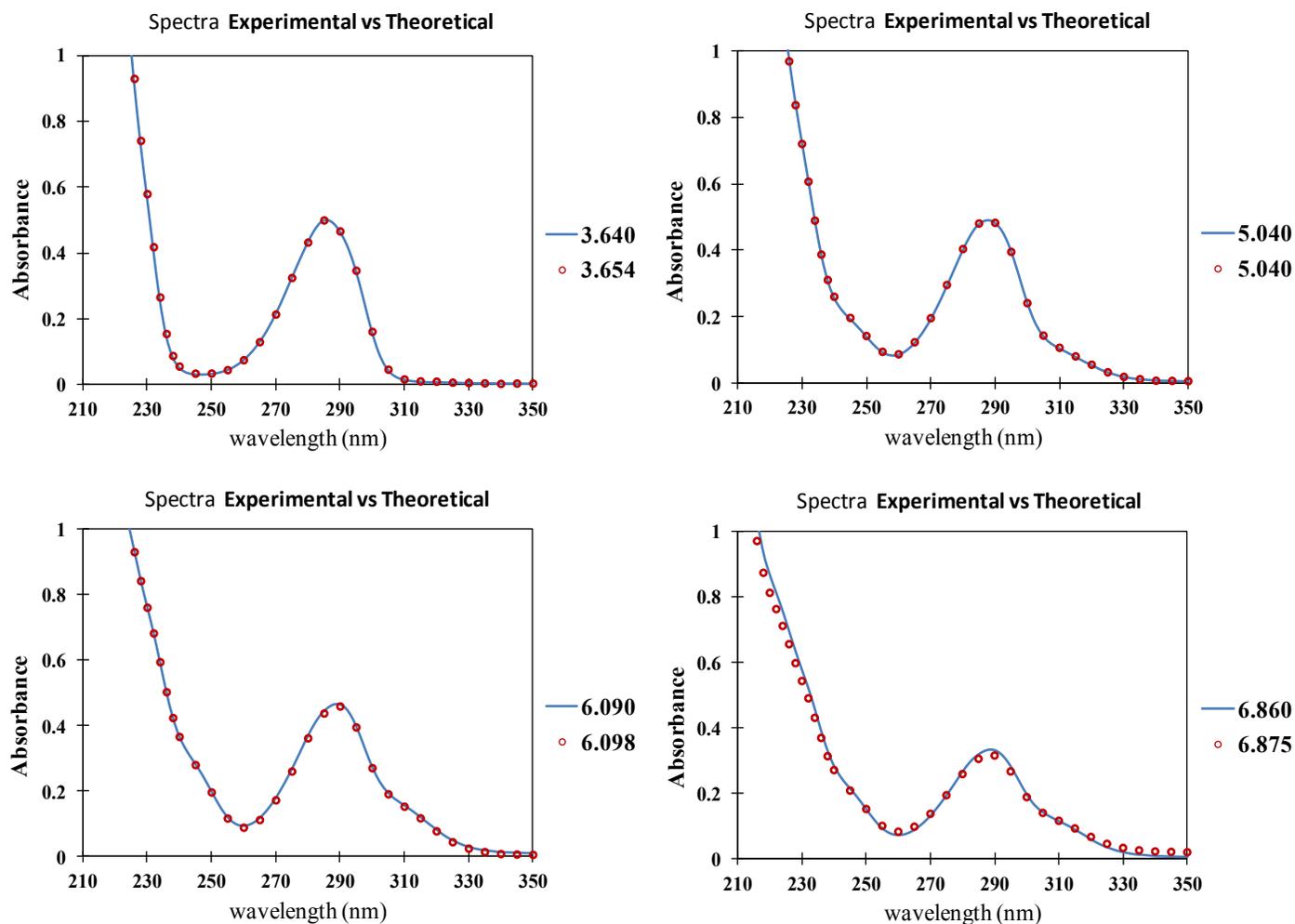


Fig. 5. Goodness of fit of the absorption spectra. The calculated spectra with the model (solid lines) and the experimental spectra (markers), for LQM303, to selected pH values, show a good agreement.

Table 4. Relative Gibbs energies (in kcal/mol) for the different located conformers.

| Conformer | LQM303 | LQM314 |
|-----------|--------|--------|
| I | 1.18 | 2.04 |
| II | 3.88 | 4.05 |
| III | 3.37 | 2.74 |
| IV | 0.85 | 0.15 |
| V | 0.00 | 0.00 |
| VI | 0.76 | - |

Table 5. Relative energies (ΔG° , in kcal/mol) of the possible sites of deprotonation.

| Compound | Deprotonation site | Relative energy (ΔG° , kcal/mol) | |
|----------|--------------------|--|-------------------|
| | | 1st deprotonation | 2nd deprotonation |
| LQM303 | NH (A) | 0.77 | 0.00 |
| | NH (B) | 3.27 | 4.45 |
| | OH | 0.00 | |
| LQM314 | NH (A) | 4.40 | 0.00 |
| | NH (B) | 7.25 | 2.59 |
| | OH | 0.00 | |

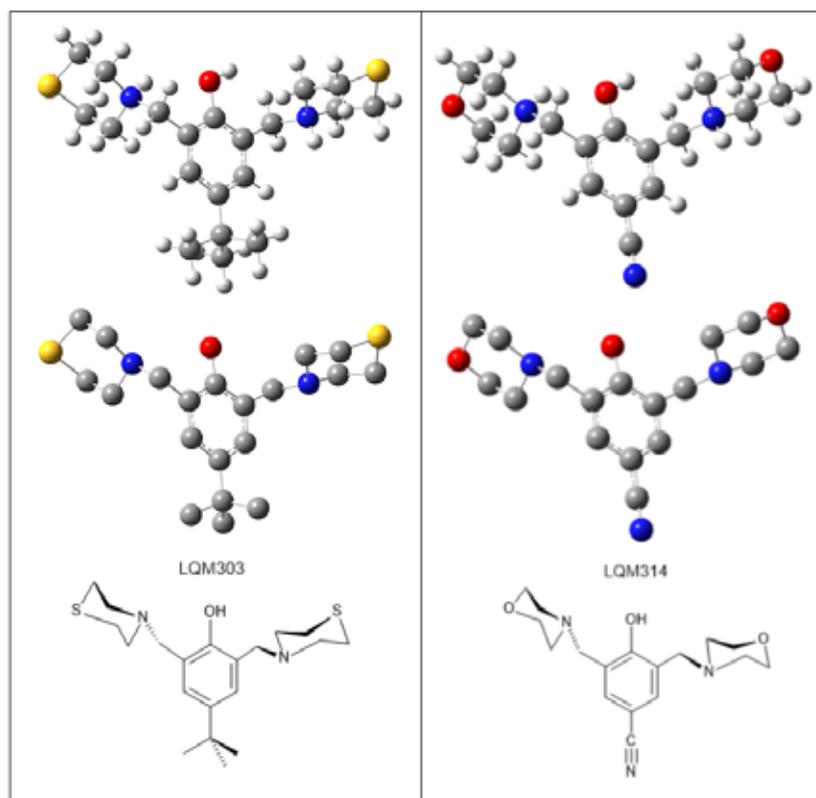
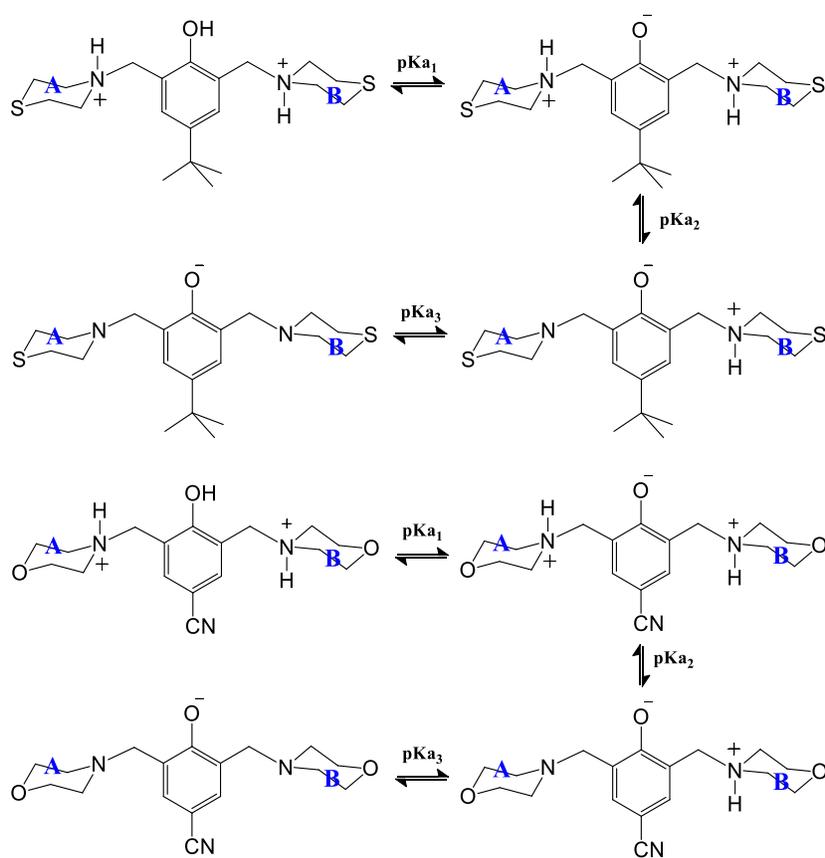


Fig. 6. Different views for the conformers of lowest energy. (left) LQM303, (right) LQM314.



Scheme 2. Proposed deprotonation route for LQM303 (top) and LQM314 (bottom).

There are three possible deprotonation sites for both investigated compounds, one corresponding to a phenolic site and two to protonated tertiary amine sites. The values of Gibbs free energies corresponding to the deprotonation from each of these three possible acid sites were calculated (Table 5). It was found that the first deprotonation takes place from the phenolic site for both studied compounds. Thus it is identified as H_2L^+ . For the second deprotonation only the two amino sites remain acid. Among them the most acidic one was found to be that in ring A. These results were used to predict the deprotonation routes of the studied compounds (Scheme 2).

Experimental section

Reagents

Common

HCl (36.5-38%, Baker) was used to prepare acidic solutions for spectrophotometric experiments. H_3PO_4 (85.2%, Baker), CH_3COOH (99.7% Latiz) and HBO_3 (99.5% Technical Chemistry) were employed in order to prepare the buffers for capillary zone electrophoresis (CZE) experiments. NaOH (98%, Baker) was used to adjust the pH of interest. All aqueous solutions were prepared with deionized water (18.2 M Ω cm) using a Millipore Milli-Q Gradient equipment.

Synthesis of LQM compounds

An appropriate phenol (1 equivalent), formaldehyde (4 equivalents) thiomorpholine or morpholine (2 equivalents) were mixed in a round flask fitted with a condenser, under solvent free conditions. The mixture was irradiated with IR light using a medicinal lamp (250 watts). The reaction temperature is in the range of 120°C to 180°C. The reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC) using silica gel as stationary phase and mixture hexane/ethyl acetate (1:4) as mobile phase. The final mixture was separated by column chromatography with the same stationary phase than in TLC and a gradient mixture of hexane/ethyl acetate as mobile phase.

LQM303 (4-tert-butyl-bis-(2,6-thiomorpholin-4-ylmethyl)-1-phenol) characterization

Reaction time: 20 min. MP: 95-97°C. Yield: 80%.

IR ($CHCl_3$ film) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3403 (O-H), 3089 (Csp²-H, Ar), 2986 (Csp³-H).

¹H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm, TMS): 10.69 (1H, s, OH), 7.09 (2H, s), 3.71 (4H, s, Ar-CH₂), 2.86 (8H, m, -S-CH₂-), 2.76 (8H, m, -N-CH₂-), 1.27 (9H, -CH₃).

¹³C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm, TMS): 153.6 (C), 141.14 (C), 125.79 (CH), 121.22 (C), 58.81 (Ar-CH₂-), 54.42 (-N-CH₂-), 33.78 (C), 31.47 (-CH₃), 27.74 (-S-CH₂-).

FAB-MS m/z : (M + 1) 381 (35%), 278 (100%), 175 (50%).

LQM314 (4-hydroxy-3,5-bis(morpholin-1-ylmethyl)benzotrile) characterization

Reaction time: 15 min. MP: 104-106°C. Yield: 87%.

IR ($CHCl_3$ film) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3455 (O-H), 3056 (Csp²-H, Ar), 2932 (Csp³-H).

¹H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm, TMS): 11.40 (1H, s, OH), 7.14 (2H, s), 3.72 (8H, m, -O-CH₂-), 3.63 (2H, s), 2.54 (8H, m, -N-CH₂-).

¹³C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm, TMS): 162.2 (C), 132.48 (C), 123.48 (CH), 119.34 (C), 101.75 (-O-CH₂-), 66.56 (Ar-CH₂-), 58.34 (-N-CH₂-), 53.03 (-CN).

FAB-MS m/z : (M + 1) 318 (34%), 230 (100%), 229 (45%).

Capillary Zone Electrophoresis (CZE) Study

Experimental conditions

The technique used was CZE. The experiments were performed with a Beckman Coulter P/ACE MDQ with diode array detector (DAD) equipment. A fused silica capillary with 50 μ m of internal diameter, a total length (L_t) of 50.2 cm, and an effective length to detector (L_d) of 40 cm on the long side. The sample injection was hydrodynamic using 1.0 psi for 5 seconds. The working temperature was maintained at 37°C, the voltage (V) applied in the separation was 20 kV (using direct polarity). Acetone was used as electroosmotic flow marker.

Capillary Conditioning

Before measuring the experimental activity, the capillary was washed with deionized H₂O for 5 minutes at 30 psi and 25°C; followed by 0.1M NaOH for 10 minutes at 30 psi and 25°C; 0.1M NaOH for 10 minutes at 30 psi and 40°C; H₂O for 10 minutes at 30 psi and 25°C; finally washed with buffer for 10 minutes at 30 psi and 25°C. Each run was started by a 1 min at 20 psi, wash with 0.1M NaOH, followed by a 1min at 20 psi, deionized water wash and, then, a 2 min at 20 psi, Britton-Robinson buffer wash of the desired pH. The capillary was stored full of deionized water.

Buffers Employed

Buffer (Britton-Robinson) pH solution, 50 mM, were prepared by mixing equimolar amount acetic, phosphoric and boric acids, adjusting the pH of each solutions with 0.5M NaOH or HCl as required. Sample solutions of LQM303 and LQM314 were prepared by dissolving 5 mg of compound LQM in 500 microliters of 1.0M HCl before filling to the mark with deionized water the 5.0 mL volumetric flask.

Methodology to obtain effective mobility of LQM [24,25]

Electropherograms of a group of LQM solutions at different pH were obtained. Acetone was used as a marker of electroosmotic flow (eof). Each solution was tested in triplicate and the migration times of acetone (t_{eof}) and LQM (t_{LQM}) were obtained. The electroosmotic mobility (u_{eof}) and apparent mobility (u_{app}) were obtained by Equations 6.

$$u_{eof} = \frac{L_t L_d}{V} \left(\frac{1}{t_{eof}} \right); \quad u_{app} = \frac{L_t L_d}{V} \left(\frac{1}{t_{LQM}} \right) \quad (6)$$

Effective mobilities ($u_{eff} = u_{LQM}$) were determined as the difference between the apparent mobility (u_{app}) and the mobility of the electroosmotic flow marker (u_{eof}) in agreement with the Equation 7.

$$u_{eff} = u_{LQM} = (u_{app} - u_{eof}) \quad (7)$$

Spectrophotometric Study

Experimental conditions

A Perkin-Elmer UV-Vis spectrometer, model Lambda 950, was used for the spectrophotometric determination of acidity constants. The pH was measured with a pH-meter model PHM240 and a combined Ag/AgCl, both Radiometer Analytical brand. Assessments were made at constant temperature.

Experimentation

A LQM solution for spectrophotometric measurements was prepared by dissolving 10 mg of the LQM desired on a volume of 100 mL of 0.01M HCl. A basic solution of 0.01M NaOH is used as titrant. In both solutions the ionic strength is imposed to 0.15M by adding the necessary amount of NaCl. Then, for each LQM, the acidic solution was titrated with the NaOH solution. The temperature of the titration cell was maintained at 37°C with a recirculator. The solution was maintained with a constant stirring. The atmosphere over the solution was kept inert through a nitrogen flow.

pH Measurements

The pH values were measured with a PHM240 potentiometer equipped (± 0.001 resolution) with a Radiometer Analytical combined pH electrode Ag/AgCl pHC3001-8. The pH of solution was corrected by cell efficiency with Equation 8.

$$pH_{corrected} = pH_{observed} + \left[\frac{pH_{calibration} - pH_{observed}}{pH_{calibration}} \right] \cdot Ef \quad (8)$$

Ef is an empirical parameter related to potentiometric cell efficiency that tends to zero while cell efficiency tends to 100% [17]. Wescott and Bates propose a method to correct the pH, which gives results similar to Equation 8 [26, 27].

Absorption Spectra Acquisition

For each addition of titrant the UV-vis spectrum was achieved with a Perkin-Elmer Lambda 950 spectrophotometer, using quartz cell of 1 cm path length and a temperature of 37°C. The working range was between 200 and 500nm of wavelength.

Determination of pK_a values

The equilibrium constants were obtained by fitting UV absorption spectra [20] or effective mobilities [21] with chemical composition of the solutions and the pH, a chemical model of two (for LQM303) or three acid-base equilibria (for LQM314), all this with the program SQUAD. The concentration values

used in the refinement with SQUAD were taken considering the dilution.

Determination of $\log P$ of LQM compounds between water and 1-octanol

1-Octanol (Baker) and deionized water obtained from a Milli-Q equipment of Millipore (0.182 M $\Omega \cdot$ m) were presaturated to maintain the volume ratio constant during liquid-liquid extraction processes [23]. The UV absorption spectra for the organic phase were recorded in the Perkin-Elmer 950 spectrophotometer, using quartz cells with an optical path length of 1 cm.

Calibration Curve

A calibration curve was prepared, by solving adequate amounts of each LQM in n-octanol presaturated with water.

The linear regression equations of the calibration curves obtained were

$$A^{(266)} = (3813.25 \pm 51.09)[LQM303]_{octanol} + (0.13 \pm 0.01) \\ R^2 = 0.999$$

and

$$A^{(254)} = (13838.48 \pm 259.89)[LQM314]_{octanol} + (0.04 \pm 0.01) \\ R^2 = 0.998$$

where $[LQM]_{octanol}$ represents the concentration of corresponding LQM in the octanolic phase, given in molarity units (mol/L).

Partition of LQM Compounds between Water and 1-Octanol

A mixture of 10 mL of LQM stock solution in 1-octanol (with a concentration sited around the middle of the calibration curve) and 10 mL of deionized water (presaturated with 1-octanol) was placed in a separating funnel of 30 mL. Vigorous stirring was undertaken during 2 min, and the phases were allowed to separate. A similar mixture in each case was used as a blank for absorbance measurements, but changing 1-octanol presaturated of deionized water in the place of the LQM314 stock solution.

In the case of LQM303, 10 mL of LQM303 organic solution were used with 90 mL of deionized water.

The concentration of the corresponding LQM compound in the octanolic phase was obtained by interpolation of the absorbance measured for the extracted solution on the calibration curve. This determination was repeated three times.

Extracted Fractions and $\log P$ Values Determination

The extracted fractions ($E_{LQM,oct}$) of the corresponding LQM were obtained from the equation

$$E_{LQM,oct} = \frac{[LQM_{oct}]}{[LQM_{oct}]_0}$$

Where $[LQM_{oct}]_0$ represents the concentration of corresponding LQM in the octanolic phase before the extraction. Finally, the $\log P$ values were obtained from the equation

$$\log P_{LQM} = \log \left[\frac{1}{r} \left(\frac{E_{LQM,oct}}{1 - E_{LQM,oct}} \right) \right]$$

r , is the volume ratio between 1-octanol and water.

Computational Details

All the electronic calculations were carried out with the Gaussian 09 package of programs [28]. Geometry optimizations and frequency calculations were performed with the 6-31+G(d) basis set and the solvation model based on density (SMD), and the Density Functional Theory (DFT), in particular the B3LYP functional [29]. This functional has been successfully used for studying similar molecules [23]. The energies were improved by single point calculations, using the 6-311++G(d,p) basis set. Local minima were identified by the absence of imaginary frequencies. Relative energies were calculated including thermodynamic corrections at 298.15 K. All the relative energies are reported at the 1M standard state.

Conclusions

The pK_a values of LQM303 and LQM314, compounds with good antihypertensive properties, were obtained by CZE and UV spectrophotometry. These results demonstrated that solubility, relative acidity and affinity to 1-octanol with respect to water are affected by the substituent in the position 4 of the phenol ring. The *tert*-butyl group (LQM303) causes low solubility in water while the cyano substituent (LQM314) increases the solubility and the acidity of the phenolic proton. The affinity for 1-octanol of LQM303 was greater than that of LQM314, almost for 10 times, as expected; even though both compounds meet the Lipinski rule that establishes that it is necessary that $\log P < 5$ for substances that could be considered for the development of drugs. The differences in lipophilicity and solubility of both compounds should be related to the S or O atoms in the alkyl rings where N atom is present.

The conformational theoretical study undertaken with Gibbs' energy calculations the structure with minimal energy was found for the most protonated species. From this structure the deprotonation order was determined for each LQM. It can be seen that the more acidic site corresponds to the proton of phenol group, for substituents morpholine, as well as thiomorpholine, for any group in the *para*- position to the phenolic -OH.

Acknowledgments

We want to acknowledge the Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa for computing time for the computational

chemistry calculations. This work was partially supported by SEP-CONACyT projects 167491 and 237997; and by UNAM PAPIIT No. IT200614. Two of us (AI-E) and (DM-M) want to acknowledge CONACyT for the stipend to follow doctoral and master studies, respectively.

References

1. http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html, accessed in March, 2016.
2. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf, accessed in March, 2016.
3. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. **2012**; *380*(9859), 2224-2260.
4. Stout, D.M.; Matier, W.L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R.D.; Brown, B.S. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 808-813.
5. Stout, D.M.; Matier, W.L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R.D.; Brown, B.S.; *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1347-1350.
6. Stout, D.M.; Matier, W.L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R.D.; Brown, B.S.; *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 295-298.
7. Glowka, M.L.; Codding, P.W. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2678-2684.
8. Velázquez, A.M.; Torres, L.A.; Díaz, G.; Ramírez, A.; Hernández, R.; Santillán, H.; Martínez, L.; Martínez, I.; Díaz-Barriga, S.; Abrego, V.; Balboa, M.A.; Camacho, B.; López-Castañares, R.; Dueñas-González, A.; Cabrera, G.; Angeles, E. *ARKIVOC* **2006** (ii) 150-161.
9. Velázquez, A. Ma.; Martínez, L.; Abrego, V.; Balboa, M. A.; Torres, L. A.; Camacho, B.; Díaz-Barriga, S.; Romero, A.; López-Castañares, R.; Ángeles, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 486-500.
10. Abrego, V.H.; Martínez-Pérez, B.; Torres, L.A.; Ángeles, E.; Martínez, L.; Marroquín-Pascual, J.L.; Moya-Hernández, R.; Amaro-Recillas, H.A.; Rueda-Jackson, J.C.; Rodríguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernández, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4622-4630.
11. Katzung, B.G. *Farmacología básica y clínica*. El manual moderno: México D.F-Santafé de Bogotá, 1996; 186-212.
12. Kubinyt H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. VCH Publishers, New York, NY (USA), 1993.
13. Lipinski, C.A. *Drug Discovery Today*, **2004**, *4*, 337-341.
14. *Acta Farm. Bonaerense* **25** (2): 252-5 (2006)
15. Álvarez-Diduk, R.; Ramírez-Silva, M.T.; Galano, A.; Merkoçi, A. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 12347-12359.
16. Rebollar-Zepeda, A.M.; Galano, A. *Int. J. Quant. Chem.*, **2012**, *112*, 3449-3460.
17. Islas-Martínez, J. M.; Rodríguez-Barrientos, D.; Galano, A.; Ángeles, E.; Torres, L.A.; Olvera, F.; Ramírez-Silva, M.T.; Rojas-Hernández, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11765-11774.
18. Rojas-Hernández, A.; Ramírez, M. T.; González, I. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 1099.
19. Moya-Hernández, R.; Rueda-Jackson, J. C.; Ramírez, M. T.; Vázquez, G. A.; Havel, J.; Rojas-Hernández, A. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 389.
20. Leggett, D.J. *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press: New York, 1985; 159-217.
21. Rodríguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernández, A.; Moya-Hernández, R.; Gómez-Balderas, R.; Ramírez-Silva, M.T., *Talanta*, **2009**, *80*, 754-762.

22. Bard, A.J.; Faulkner, R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: New York, 1980.
23. Sanpedro-Montoya, K.; Martínez-Pérez, B.; Galano, A.; Ángeles, E.; Abrego, V.H.; Ramírez-Silva, M.T.; Rojas-Hernández, A. *J. Chem. Eng. Data*, **2010**, 55, 4323-4331.
24. Foret, F. *Capillary Zone Electrophoresis*, VCH: Weinheim, 1993.
25. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8th Ed. Thomson: Belmont, 2004; 1003-1006.
26. Wescott, C. C. *pH Measurements*; Academia Press: New York, 1978.
27. Bates, R. G. *Determination of pH*, 2nd ed.; John Wiley and Sons: New York, 1973.
28. Gaussian 09, Revision A.08, 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. J. Rega Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. E. Gomperts, O. Stratmann, A. J. Yazyev, R. Austin, C. Cammi, J. W. Pomelli, R. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, y D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
29. Becke, A.D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.