



Construyendo al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**"DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE  
DERIVADOS TIOMORFOLÍNICOS CON  
PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS"**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**I.Q. KARLA SANPEDRO MONTOYA  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

**QUÍMICA ANALÍTICA**

**ASESOR:**

**Dr. ALBERTO ROJAS HERNÁNDEZ**

**JURADO CALIFICADOR:**

**PRESIDENTE: Dr. Andrés Hernández Arana**

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

**VOCAL: Dra. Laura Galicia Luis**

**VOCAL: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**

**VOCAL: Dra. María Elena Páez Hernández**

**México, D.F. Julio 2014**



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

***“DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE  
DERIVADOS TIOMORFOLÍNICOS CON  
PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS”***

***TESIS QUE PRESENTA:***

***I.Q. KARLA SANPEDRO MONTOYA  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS***

***DEPARTAMENTO DE QUÍMICA***

***ÁREA DE INVESTIGACIÓN***

***QUÍMICA ANALÍTICA***

***ASESOR:***

***Dr. ALBERTO ROJAS HERNÁNDEZ***

***JURADO CALIFICADOR:***

***PRESIDENTE: Dr. Andrés Hernández Arana***

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

***VOCAL: Dra. Laura Galicia Luis***

***VOCAL: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez***

***VOCAL: Dra. María Elena Páez Hernández***

***México, D.F. Julio 2014***

*Dedicado a:*

*Mi Amado Fer*

*Mi adorado Omar Alejandro*

*Mi querida familia*

## ***AGRADECIMIENTOS***

### ***Quiero agradecer infinitamente a:***

Mis amados padres (**Raúl y Pilar**) por amarme, apoyarme y tratar de entenderme. Gracias por estar a mi lado siempre.

Mis Hermanos (**Mary, Naty, Ara y Raúl**), pese a que somos diferentes, siempre tratan de que estemos unidos, apoyarnos y querernos.

Mis cuñados (**Jesús y Rene**), que aunque no somos hermanos de sangre están siempre dispuestos a apoyar a toda la familia, como si lo fueran.

Mis sobrinos (**Ari, Jesús, Alan, Rene y mi Ale**) que le dieron alegría, luz, sal y pimienta a la familia Sanpedro Montoya.

Al amor de mi vida **Omar Alejandro Reyna**, por apoyarme, amarme, comprenderme y sobre todo por darme el regalo más grande y hermoso.... **Mi Fer**.

A la Familia **Reyna Juseppe**, por su hospitalidad y comprensión.

A mis estimados y siempre queridos amigos: **Alicia, José Manuel, Pedro, Ponci, Agustín y Ulises**.

A mis amigos de Guanajuato, gracias por todas sus atenciones y por hacerme sentir querida y apoyada... Gracias muégano (**Isa, Erika, José y Leo**) los quiero.

A mi asesor **Alberto Rojas Hernández** por todo el apoyo moral y económico, comprensión, paciencia, consejos, regaños y por compartir sus grandes conocimientos. Muchas gracias.

A la **Dra. María Teresa Ramírez Silva** por todos sus consejos y alegría que la caracteriza.

A los miembros del jurado por sus grandes contribuciones y sugerencias, para que se enriqueciera este trabajo de tesis.

**PRESIDENTE: Dr. Andrés Hernández Arana**

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

**VOCAL: Dra. Laura Galicia Luis**

**VOCAL: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**

**VOCAL: Dra. María Elena Páez Hernández**

A la **Universidad Autónoma Metropolitana**. Unidad Iztapalapa (UAM-I) por ser mi segunda casa desde que empecé la Licenciatura hasta la culminación del Doctorado.

A toda el **Área de Química Analítica** por todo el apoyo brindado

A la Dra. **Annia Galano** por la colaboración realizada en todos los cálculos teóricos de este trabajo de Tesis y por su amabilidad.

Al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT** con la beca 198346

# ÍNDICE

RESUMEN .....	6
ABREVIATURAS.....	8
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	9
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES .....	13
CAPITULO II. OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
CAPITULO III. FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS INSTRUMENTALES.....	18
ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (ECZ).....	18
PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.....	19
MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ.....	21
ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE .....	25
ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO .....	26
EL FENÓMENO DE ABSORCIÓN DE LUZ POR LA MATERIA .....	26
PROPIEDADES QUE CUANTIFICAN LA ABSORCIÓN DE LUZ.....	27
ESPECTROS DE ABSORCIÓN.....	28
LEYES DE BEER Y DE ADITIVIDAD.....	29
ABSORCIÓN DE LUZ Y DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ .....	29
CAPITULO IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	31
EXPERIMENTOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	31
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	32
EXPERIMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA .....	36
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	38
DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ MEDIANTE EL MÉTODO GRÁFICO.....	39
MÉTODO GRÁFICO PARA DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	40
MÉTODO GRÁFICO PARA DATOS ELECTROFORÉTICOS .....	44
ESTIMACIÓN DE ESPECIES QUE ABSORBEN LUZ, MEDIANTE LOS PROGRAMAS TRIANG Y SIBYLA .....	46

DETERMINACIÓN DE VALORES DE pKa Y MOVILIDADES EQUIVALENTES CON DATOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.....	54
CÁLCULO DE DATOS Y ESTIMACIÓN DE LOS VALORES DE pKa's POR ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT (ACD/pKa).....	55
DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA... MATERIAL Y EQUIPO .....	55
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	56
CÁLCULO DE LOS VALORES DE pKa POR MÉTODOS DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL .....	57
ESTIMACIÓN DE VALORES DE LogP POR MÉTODOS COMPUTACIONALES QUE RELACIONAN PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS CON PARÁMETROS MOLECULARES.....	60
CAPITULO V.- PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
PRUEBAS DE ESTABILIDAD .....	62
VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE .....	65
MÉTODO GRÁFICO CON DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	67
ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE ESPECIES QUE ABSORBEN LUZ.....	69
DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ CON DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y SQUAD.....	70
DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA... COMPARACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE LOS VALORES DE CONSTANTES DE ACIDEZ DETERMINADOS EXPERIMENTALMENTE Y LOS ESTIMADOS POR EL PROGRAMA ACD/pKA.....	72
DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA .....	80
COMPARACIÓN DE LOS COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE Y ESTIMADOS CON PROGRAMAS COMERCIALES.....	82
CAPITULO VI. VALORES DE pKa CALCULADOS CON MÉTODOS DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL Y COMPARACIÓN CON LOS VALORES EXPERIMENTALES.....	84
CÁLCULO DE LOS VALORES DE pKa POR MEDIO DEL PROGRAMA GAUSSIAN 03.....	84
COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE pKa CALCULADOS CON LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.....	87
CAPITULO VII. CONCLUSIONES.....	95
CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS.....	97
CAPITULO IX. BIBLIOGRAFÍA.....	97

## RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se determinaron las constantes de acidez en solución acuosa de una familia de compuestos tiomorfolínicos, LQM324, LQM330, LQM331 y LQM334, los cuales tienen propiedades antihipertensivas y antiarrítmicas. Esto se obtuvo por medio de dos técnicas: espectroscopía UV-Visible, a temperatura  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a fuerza iónica  $I=0.15\text{ M}$ , impuesta con NaCl; y electroforesis capilar de zona (ECZ) a  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y fuerza iónica variable. Los valores de las constantes de acidez se estimaron por medio de un método gráfico y utilizando el programa computacional SQUAD.

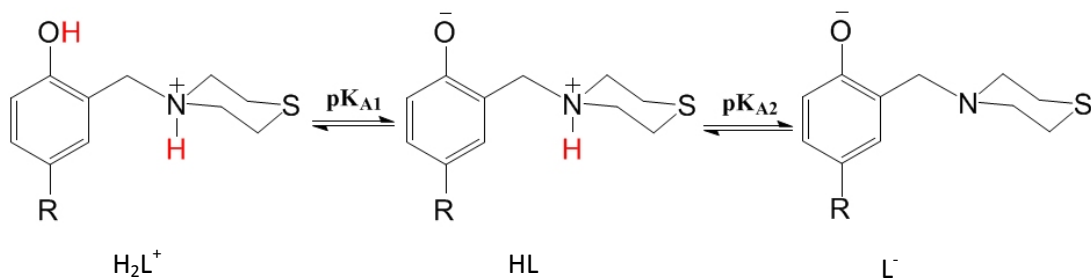
Los valores obtenidos por ambos métodos y ambas técnicas se presentan en la siguiente tabla.

COMPUESTO	TÉCNICA	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
LQM324	UV-Visible	5.509±0.043	8.284±0.358
		5.450±0.001	8.412±0.001
	ECZ	5.426 ±0.016	8.179 ±0.129
		5.296 ± 0.018	8.329 ± 0.129
LQM330	UV-Visible	7.254±0.160	9.685±0.254
		7.437±0.008	9.380±0.004
	ECZ	7.572±0.071	9.683±0.075
		7.530±0.002	9.529±0.006
LQM331	UV-Visible	8.920±0.162	10.393±0.064
		8.890±0.110	10.391±0.075
	ECZ	8.568±0.016	10.48±0.016
		8.597 ± 0.006	10.516 ± 0.003
LQM334	UV-Visible	6.541±0.335	9.354±0.086
		6.421±0.032	9.261±0.009
	ECZ	6.100±0.081	9.543±0.125
		6.195 ± 0.009	9.592 ± 0.001

Mediante cálculos teóricos se determinaron los posibles equilibrios de disociación, observando que difiere debido a si su grupo sustituyente en el grupo para del fenol es electrodonador o electroattractor.

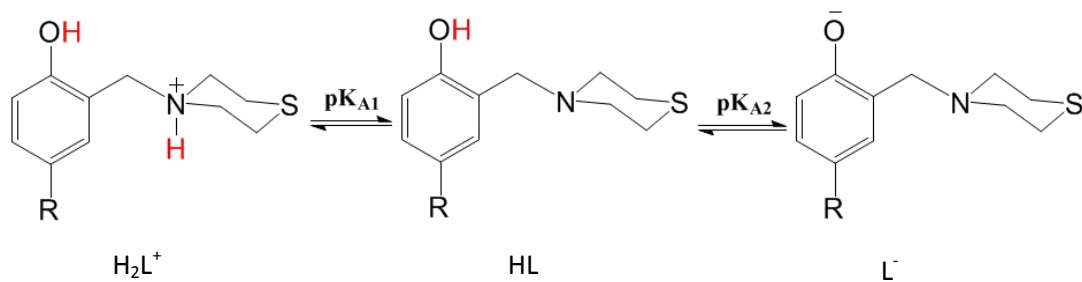


RUTA A



R= CN, NO<sub>2</sub>

RUTA B



R= H, Br

Desprotonación encontrada según los diferentes sustituyentes estudiados.

También se determinaron los coeficientes de partición de los LQM entre n-octanol y agua experimentalmente.

Compuesto	LogP
LQM324	1.591 ± 0016
LQM330	1.631 ± 0.009
LQM331	1.743 ± 0.038
LQM334	2.126 ± 0.017

Cabe mencionar que los valores de pKa de estos compuestos, no se encuentran publicados, ya que la última década no han sido sintetizados

## ABREVIATURAS

ACD	Sigla en inglés de la compañía Avanced Chemistry Development
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
Ka	Constantes de disociación del ácido
FEO	Flujo electroosmótico
SQUAD	Stability Quotients from Absorbance Data
NaOH	Hidróxido de sodio
$\Delta T$	Error en las lecturas de transmitancia
LQM324	4-nitro-2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol
LQM330	4-hidroxi-2-(4-tiomorfolin-metil)- benzonitrilo
LQM331	2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol
LQM334	4-Bromo-2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol
I	Fuerza iónica
$\epsilon$	Coefficiente de absortividad
A	Absorbancia
T	Transmitancia
$\lambda$	Longitud de onda
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
PCA	Análisis del componente principal
FA	Análisis de factores
PCM	Modelo del continuo polarizable
UAHF	Modelo de átomos unidos de Hartree-Fock

# CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## INTRODUCCIÓN

La detección, tratamiento y control de la hipertensión arterial son objetivos primordiales de salud nacional e internacional, debido a que esta enfermedad constituye una de las principales causas de mortalidad en el mundo [Velázquez 2006], en tanto que en México las enfermedades cardiovasculares han sido la principal causa de muerte en los últimos 20 años (Figura 1.1), afectando a más del 20 % de los adultos entre 45 y 65 años y casi al 50 % de las personas con más de 65 años [INEGI, 2009]. Los factores que están ligados a la hipertensión son: la obesidad, una dieta rica en sodio y baja en potasio, el consumo excesivo de alcohol, el uso de anticonceptivos orales y un estilo de vida sedentario, entre otras.

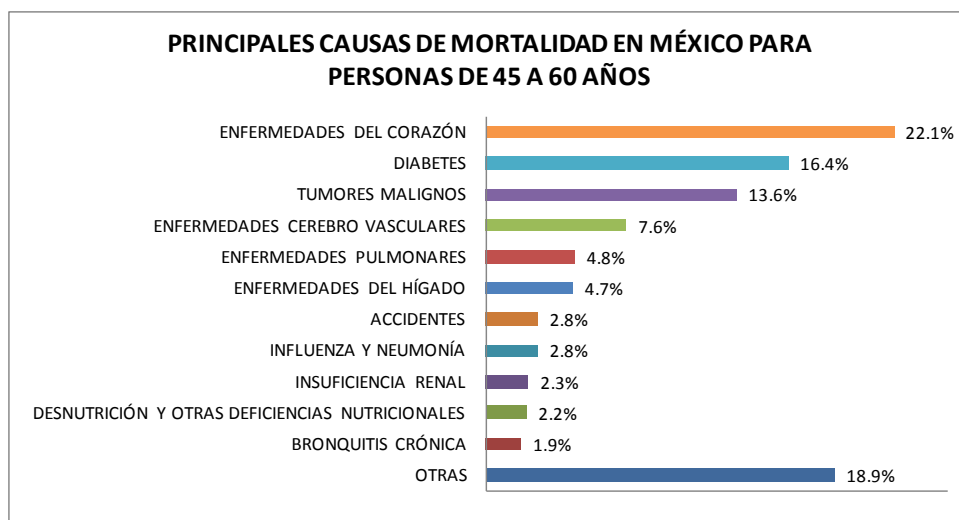


Figura 1.1. Estadística de las principales causas de mortalidad en México para personas de 45 a 60 años proporcionados por INEGI: Estadísticas Demográficas, 2009.

El riesgo de la presión arterial alta por sí sola no es muy elevado, pero en presencia de otros factores como tabaquismo, diabetes, hipercolesterolemia o con historia familiar de enfermedades cardiovasculares aumenta considerablemente el riesgo, teniendo como

resultado un infarto en el miocardio, rupturas arteriales, insuficiencia renal, etc. [Velázquez, 2007].

Actualmente existen en el mercado diferentes tipos de fármacos que se emplean para el control de la hipertensión arterial; los más comunes se mencionan a continuación.

### **Diuréticos**

Este grupo conforma la primera opción para el control de la presión arterial. Son fármacos que actúan sobre el riñón produciendo una pérdida neta de  $\text{Na}^+$  y agua, disminuyendo el volumen circulante de líquidos en todo el organismo, trayendo consigo una reducción de la concentración de calcio en las células musculares lisas de la pared vascular con su consiguiente relajación y disminución de la resistencia vascular periférica, [Martínez, 2004]. Ocasionan alteraciones metabólicas como hipopotasemia, hiperglucemia y trastornos en los lípidos sanguíneos, [Martínez, 2010]. Entre los diuréticos más utilizados se encuentran la clortalidona, la hidroclorotiazida y el ácido etacrínico, que se muestran en la Figura 1.2.



Figura 1.2: Ejemplos de diuréticos existentes en el mercado.

### **Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA)**

Este tipo de medicamento impide la formación de la angiotensina II, la hormona que provoca la contracción de los vasos sanguíneos. Los inhibidores de la ECA permiten la relajación de los vasos sanguíneos y esto ayuda a reducir la tensión arterial, entre los medicamentos que se encuentran en el mercado que utilizan este mecanismo están el Captopril y el Losartan (Figura 1.3). [Abrego 2010, Del Río 2003]

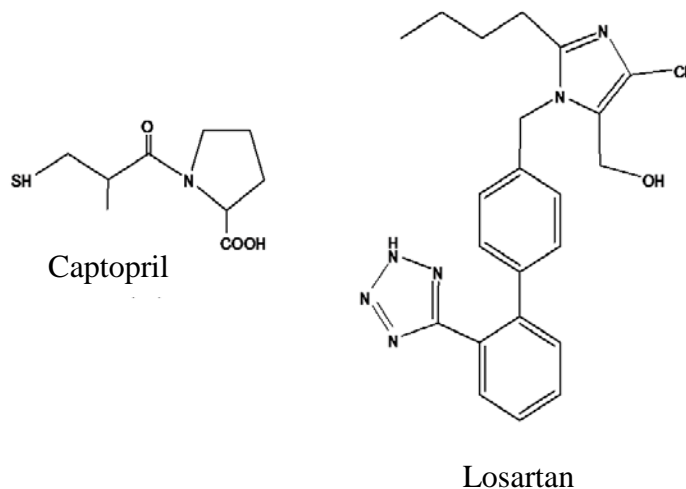


Figura 1.3: Representación química de algunos antihipertensivos presentes inhibidores de la ECA que se encuentran en el mercado.

### Bloqueadores de canales de calcio

Estos compuestos tienen gran importancia para controlar la hipertensión, la angina de pecho y otras enfermedades cardiovasculares, [Sadmann, 1999]. Su efecto cardiovascular primario es la vasodilatación arterial, esta origina una reducción de la presión arterial y un incremento del flujo coronario. Entre las clases de bloqueadores de canales de calcio se encuentran los derivados de la dihidropiridina [Massoud, 2003], como son: la amlodipina, la felodipina, la isradipina, la dibudipina, etc. En la Figura 1.4 se aprecian algunos de ellos, los cuales son ampliamente utilizados por su potente actividad vasodilatadora y la acción cardiodepresora. Sin embargo debido a su corta duración y su rápido inicio de la acción vasodilatadora, estos fármacos tienen más posibilidad de presentar efectos adversos.

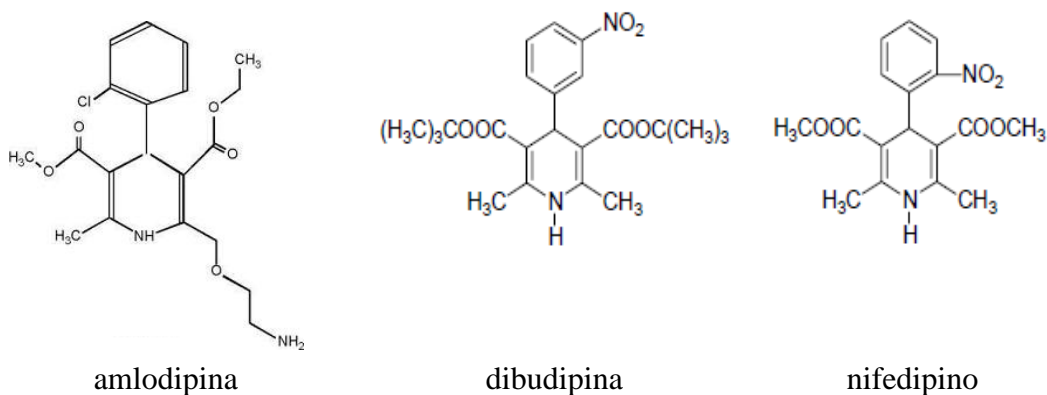


Figura 1.4: Ejemplos de bloqueadores de canales de calcio presentes en el mercado.

A continuación se presentan ejemplos de los efectos secundarios de antihipertensores que actualmente se encuentran en el mercado:

**Clortalidona:** neutropenia, leucopenia, agranulocitosis, trombocitopenia, anemia aplásica, arritmia, vasculitis necrotizante periartrosis nudosa inducida por el medicamento. Náusea, vómito y dolor abdominal. Se ha reportado un caso en donde la clortalidona produjo pancreatitis hemorrágica aguda mortal, impotencia sexual y disminución de la libido, visión borrosa, miopía, cefaleas, dolor ocular, edema periorbital e infecciones conjuntivales, puede desencadenar una erupción psoriasiforme y seudoporfiria, así como fotosensibilización. También puede producir parestesias, parálisis y debilidad muscular asociados a hipocaliemia, etc.

**Captopril:** Angioedema en las extremidades, cara, labios, membranas mucosas, lengua, glositis o laringe, edema de la cara, labios y de las extremidades, aumenta el riesgo de aparición de neutropenia o agranulocitosis, especialmente en pacientes con insuficiencia renal grave, puede producir hiperpotasemia por lo que se evitará el tratamiento conjunto con suplementos de potasio o diuréticos ahorradores de potasio. En dosis altas existen puede provocar enfermedad renal, elevaciones de urea y creatinina sérica después de la reducción de la presión sanguínea con el medicamento, tos, etc.

**Nifedipina:** Dolor de cabeza, fatiga, malestar general, constipación, náusea. En algunos casos: astenia, adinamia, dolor, palpitaciones, insomnio, nerviosismo, parestesia, somnolencia, dolor abdominal, diarrea, dispepsia, flatulencia, dolor en el pecho, entre otras.

Debido a efectos secundarios adversos, como los anteriores, es necesario el desarrollo y el conocimiento de las propiedades químicas de nuevos fármacos con actividad antihipertensiva, pretendiendo que sean más efectivos y con menos número de efectos colaterales.

## ANTECEDENTES

En 1979 un grupo de investigadores chinos dirigidos por Lianguan *et al.*, mientras investigaban propiedades antimalariales de derivados de la febrifugina, observaron que un compuesto, la changrolina era efectivo como agente antiarrítmico. [Montes 2005].

Poco tiempo después en 1983 Stout *et al.*, se interesaron en la changrolina debido a que su estructura era diferente a los fármacos antiarrítmicos que en ese tiempo se encontraban en el mercado, por ello retomando la investigación de Lianguan descubrieron que la changrolina también presentaba propiedades antimalariales, lo que indujo que dividieran su molécula en tres regiones como se presenta en la Figura 1.5.

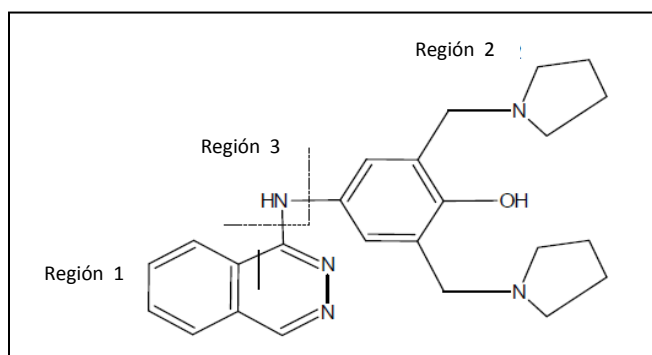


Figura 1.5: Estructura química de la Changrolina.

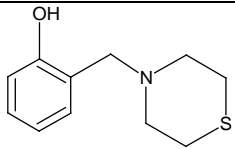
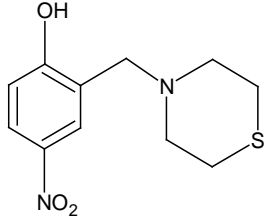
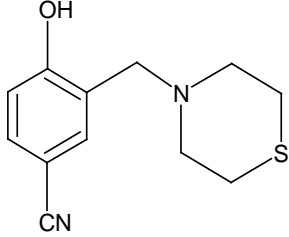
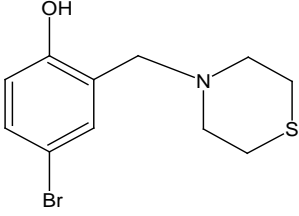
- 1) Regiones heteroatómicas que contiene la quinazolina.
- 2) Región aromática con el bis(pirrolidinilmetil)fenol.
- 3) Región enlazante entre las regiones anteriores.

Dichos investigadores modificaron cada región de la changrolina, en orden, con el objetivo de determinar cuál región de la molécula es necesaria para la actividad antiarrítmica y qué región está asociada con las propiedades antimalariales [Stout, 1983].

En el año de 1985 Stout *et al.*, descubrieron que la región 1 podía ser reemplazada por una variedad de anillos heteroatómicos sin que disminuyera la actividad antiarrítmica. En la región 2 existe una mejor actividad si se sustituye la pirrolidina por piperdinas. Finalmente, la región 3, que une las dos primeras regiones, tiene mayor actividad y una menor toxicidad cuando contenía un grupo carbonilo, incluyendo cetonas, amidas y urea, provocando la disminución de la actividad parasitológica. [Stout 1984, Stout 1985].

Con base en que existen en el mercado antihipertensivos con efectos secundarios adversos y retomando la investigación de Stout, en el 2006, el Dr. Enrique Ángeles y colaboradores, pertenecientes al Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán, UNAM, sintetizaron una nueva serie de compuestos llamados LQM, entre los ellos se encuentran cuatro derivados tiomorfolínicos con actividad antihipertensiva y antiarrítmica (los cuales se presentan en la Tabla 1.1), pretendiendo que estas moléculas presenten una mayor actividad y menores efectos colaterales.

Tabla 1.1. Compuestos de derivados tiomorfolínicos con propiedades antihipertensivas sintetizados

<i>NOMBRE</i>	<i>NOMBRE IUPAC</i>	<i>ESTRUCTURA QUÍMICA</i>
LQM331	2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol	
LQM324	4-nitro-2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol	
LQM330	4-hidroxi-2-(4-tiomorfolin-metil)-benzonitrilo	
LQM334	4-Bromo-2-(4-tiomorfolin-metil)-fenol	



Como se puede observar en las estructuras investigadas se sustituyó el anillo de tetrahidropirrol por un anillo tiomorfolínico y en la posición para del anillo aromático, se incluyeron diferentes sustituyentes: bromo, nitro y ciano. Con base en la elaboración del modelaje molecular de los derivados tiomorfolínicos encontraron que estos compuestos tienen propiedades fisicoquímicas similares a la changrolina y sus derivados. [Montes, 2005].

En el año 2007 Velázquez et al., realizaron estudios de propiedades antihipertensivas de compuestos similares a los mostrados, comparándolos con medicamentos que se encuentran en el mercado (captopril, losartan y omapatrilat), observando que los LQM tienen similar actividad que los medicamentos comerciales [Velázquez 2007].

Estos hallazgos llevaron a proponer la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas de estos compuestos tales como las constantes de acidez, ya que es sabido que las propiedades ácido-base de los fármacos son de fundamental importancia en farmacología para caracterizar la capacidad de ionización (disociación/protonación) de las moléculas pues en parte esto determina su capacidad de atravesar la membrana lipídica.

También es importante que los compuestos cumplan con las reglas de Lipinski (Lipinski,1997), las cuales son completamente empíricas y evalúan la factibilidad de que un compuesto químico presente cierta actividad biológica, una vez que es ingerido como medicamento para seres humanos. Estas reglas surgieron con base en la observación de que muchos compuestos químicos utilizados en medicamentos son moléculas relativamente pequeñas y lipofílicas.

Las reglas de Lipinski describen las propiedades moleculares que tienen importancia farmacocinética en el cuerpo humano y, en general, un fármaco activo y para consumo oral no debe violar más de una de las siguientes consideraciones:

📖 No debe contener más de cinco donadores de enlaces, por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con al menos un átomo de hidrógeno)

📖 No debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor)

📖 Debe poseer un peso molecular inferior a 500 uma.

📖 Debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua (LogP) inferior a 5

Entonces, desde 2009 se han realizado estudios para determinar algunas de las propiedades fisicoquímicas relevantes para los compuestos LQM.

Debido a ello Islas *et. al* en el año de 2009, determinaron las constantes de acidez de diferentes compuestos LQM los cuales pertenecen a derivados piperidínicos, por medio de espectroscopía UV-Visible y electroforesis capilar de zona, mostrando que ambas técnicas son confiables para su determinación [Islas, 2009]. También en este trabajo se propuso una posible relación entre el orden de desprotonación y el tipo de sustituyentes en la posición para al grupo OH de esos compuestos.

Poco tiempo después en el año 2010, Ábrego y colaboradores corroboran ambas técnicas para la determinación de las constantes de acidez del padre de la familia de estos compuestos, determinando también en ese trabajo el coeficiente de reparto del mismo compuesto entre agua y octanol [Abrego 2010].

Debido a lo anterior y con conocimiento de que ni las constantes de acidez de los compuestos tiomorfolínicos presentados en la Tabla 1, ni el coeficiente de reparto entre octanol agua han sido reportados en la literatura, la aportación de este trabajo de tesis es la determinación experimental de estos parámetros fisicoquímicos; así como analizar la posible generalización de del orden de desprotonación dependiendo del tipo de sustituyentes en la posición para del grupo OH de los compuestos de la Tabla 1.1.

## **CAPITULO II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las constantes de acidez de cuatro derivados tiomorfolínicos con propiedades antihipertensivas (LQM), en condiciones pseudofisiológicas ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $I=0.15\text{ M}$  con NaCl) utilizando la técnica de espectrofotometría UV-Visible. Y electroforesis capilar de zona (ECZ)

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 📖 Estudio de la estabilidad de cada uno de los LQM'S
- 📖 Determinación espectrofotométrica (UV-Visible) de las constantes de acidez de los LQM en medio acuoso utilizando el método gráfico y el programa computacional SQUAD.
- 📖 Calcular las constantes de acidez de los LQM por medio de electroforesis capilar de zona (ECZ), con el método gráfico y el programa computacional SQUAD
- 📖 Determinar las constantes de acidez con ACD/pKa
- 📖 Determinar el número de especies químicas que absorben el sistema utilizando los programas computacionales TRIANG y SYBILA
- 📖 Determinar el orden de desprotonación de los derivados tiomorfolínicos por medio de cálculos teóricos.
- 📖 Comparar los valores de coeficientes de partición experimentales con los estimados con programas de cómputo comerciales.
- 📖 Determinar los coeficientes de partición experimentalmente

## CAPITULO III. FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS INSTRUMENTALES

### ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (ECZ)

La técnica de electroforesis capilar de zona (ECZ) consiste en introducir en un capilar una solución amortiguadora de pH (*buffer*) y una mezcla de especies, que se separan en función de su carga y su tamaño en el medio en el que se encuentran, manifestados en su movilidad electroforética, bajo la influencia de un campo eléctrico [Castillo, 2005], como se muestra en la Figura 3.1

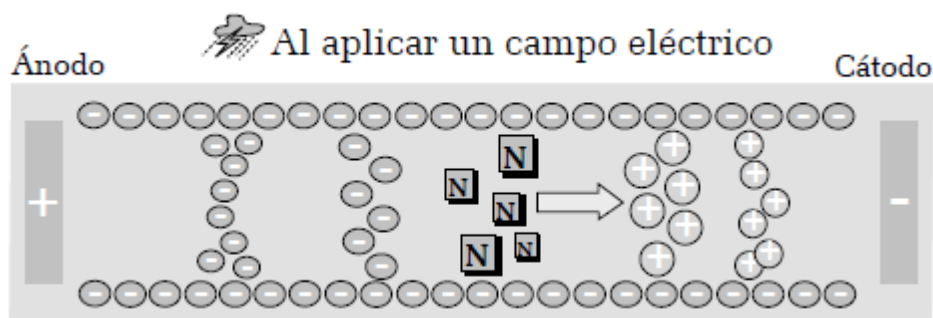


Figura 3.1: Proceso de separación electroforética. [Castillo, 2005]

La electroforesis capilar de zona (ECZ) es un método de separación muy utilizado. Su mayor área de impacto está vinculada con el análisis de biomoléculas, apoyando un sin número de áreas y permitiendo resolver una gran variedad de problemas analíticos a causa de las siguientes ventajas:

1. Puede manejar muestras impuras.
2. La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos mililitros.
3. El procedimiento para la movilidad electroforética efectiva del analíto no requiere cálculos de la solución titulante como con técnicas potenciométricas, pero requiere solo la determinación de tiempos de migración, tanto del flujo electroosmático como la del analíto.
4. Permite la determinación de pKa en solución acuosa sin dificultades, que no es el caso cromatografía en fase líquida, en qué la retención pudiera ser muy grande sin la suma de un modificador orgánico.

5. El intervalo de pH en estudio puede ser más amplio (de 2 a 12) que en HPLC en donde la fase estacionaria es dañada en zonas muy ácidas ( $\text{pH} \leq 2.5$ ) y medianamente básico ( $\text{pH} \geq 8$ ).

6. Los instrumentos son favorablemente automatizados y requieren pequeñas o ninguna modificación para altos rendimientos.

7. No es necesaria la información de la concentración de la muestra. Solo las movilidades aparentes de los analitos y del flujo electroosmótico son usadas en los cálculos de la movilidad efectiva del analito.

8. La disipación de calor en el tubo capilar es buena y, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.

9. Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta de 30 KV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.

### **PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA**

Movilidad electroforética. La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito, cuando ningún flujo electroosmótico está presente puede ser dado por la ecuación 3.1.

$$v = \mu E \quad (3.1)$$

Dónde:  $v$ =Velocidad del analito,  $\mu$ =movilidad electroforética,  $E$ = campo eléctrico

El campo eléctrico es una simple función de la aplicación de voltaje y la longitud del capilar. La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito.

De la ecuación 3.2 es evidente que especies o analito cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas pero con gran peso molecular muestran baja movilidad.

$$\mu = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (3.2)$$

Dónde:  $\mu$ =movilidad electroforética del analíto,  $q$ = Carga del analíto,  $\eta$ =Viscosidad de la solución,  $r$ = radio molecular.

Dentro del capilar se presenta un fenómeno llamado flujo electroosmótico (FEO) que es un constituyente fundamental de la electroforesis capilar. 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

Un beneficio del FEO es provocar movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo. Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo, pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo. Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones. Por otra parte si la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo electroosmótico, este hecho es utilizado experimentalmente para determinar la velocidad del FEO en un sistema dado

Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 7-8) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica.

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol,  $H^+$ ) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazadas hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dado su solvatación originando así el flujo electroosmótico.

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas.

Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base) y/o de la absorción de las especies iónicas a la superficie. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el número de grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) que pueden existir en forma aniónica ( $\text{SiO}^-$ ).

Los contraiones (en la mayoría de los casos cationes), los cuales se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de carga, forman la doble capa (Figura 3.2) y crean un potencial cerrado a la pared.

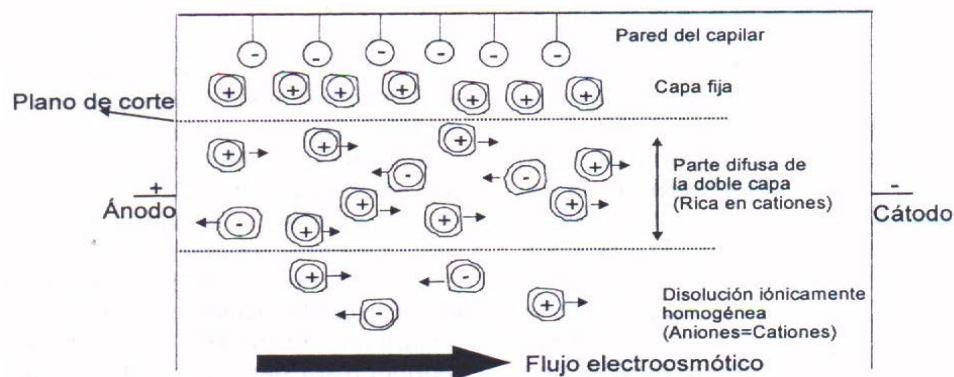


Figura 3.2: Esquema del flujo electroosmótico y formación de la doble capa dentro del capilar [Cela, 2002].

### MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ

Un concepto de suma importancia en electroforesis capilar, es la movilidad electroforética, la cual se ve afectada por la carga, la forma y el tamaño del analíto. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, el pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analíto y en el caso de moléculas grandes sobre su forma y tamaño hidrodinámico. Para calcularla es necesario conocer su tiempo de migración que es el tiempo requerido por el analíto para migrar desde el punto de introducción de la muestra hasta el punto de detección y está dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración.

La movilidad aparente es la movilidad medida en presencia de flujo electroosmótico (FEO). La cual está dada por la siguiente ecuación:

$$\mu_{ap} = \frac{LL_d}{V} \left[ \frac{1}{t_o} \right] \quad (3.3)$$

Dónde:  $\mu_{ap}$ : Movilidad electroforética aparente ( $m^2/Vs$ ), L: Longitud total del capilar (m),  $L_d$ : Longitud efectiva del capilar (al detector) (m),  $t_o$ : Tiempo de migración del flujo electroosmótico (s), E: Campo eléctrico (V/m), V: Voltaje (V)

La movilidad efectiva  $\mu_{ef}$ , es la movilidad del analíto independiente de las condiciones experimentales y puede ser calculada de la movilidad aparente midiendo independientemente el FEO, usando un marcador neutro que se mueve a una velocidad igual a la del FEO.

$$\mu_{ef} = \frac{LL_d}{V} \left[ \frac{1}{t} \right] \quad (3.4)$$

dónde:  $\mu_{ef}$ : Movilidad electroforética efectiva ( $m^2/Vs$ ), L: Longitud total del capilar (m),  $L_d$ : Longitud efectiva del capilar (al detector) (m), t: Tiempo de migración del analíto (s), E: Campo eléctrico (V/m), V: Voltaje (V).

Movilidades efectiva, aparente y del FEO se relacionan según la siguiente ecuación

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{eo} \quad (3.5)$$

Dónde:  $\mu_{ef}$ : Movilidad electroforética efectiva ( $m^2 /sV$ ),  $\mu_{ap}$ : Movilidad electroforética aparente ( $m^2 /sV$ ),  $\mu_{eo}$ : Movilidad del flujo electroosmótico ( $m^2 /sV$ )

Despejado la movilidad efectiva de la ecuación anterior y sustituyendo las ecuaciones 3.3 y 3.4 tenemos:

$$\mu_{ef} = \frac{LL_d}{V} \left[ \frac{1}{t} - \frac{1}{t_o} \right] \quad (3.6)$$

La respuesta obtenida en electroforesis capilar es una representación gráfica que lleva por nombre electroferograma, en la cual grafica la respuesta dada por el detector en función del tiempo como se muestra en la Figura 3.3



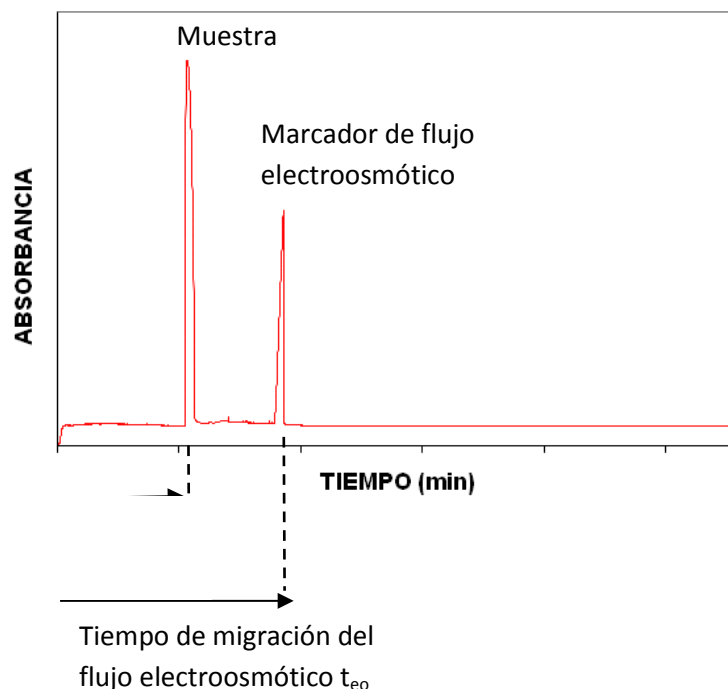


Figura 3.3: Electroferograma típico donde se pueden ver los tiempos de migración de los componentes y del marcador de flujo electroosmótico.

Aunque la electroforesis capilar es usada primordialmente como una técnica de separación y análisis químico, es también una herramienta útil para demostrar varios principios químicos y analíticos tales como la determinación de constantes de acidez [Rodríguez, 2009].

La movilidad efectiva de un analíto se puede definir como la suma de la contribución de la fracción de la movilidad de cada una de las especies del mismo analíto, expresado como sigue:

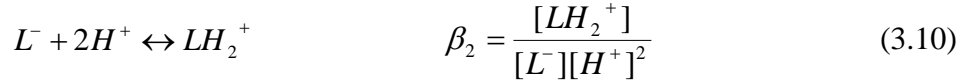
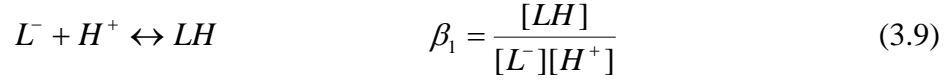
$$\mu_{ef} = \frac{1}{C_A} \sum_{i=0}^k C_i \mu_i \quad (3.7)$$

Dónde:  $C_A$  es la concentración total del analíto,  $C_i$  es la concentración de la especie “i” y  $\mu_i$  es la movilidad de la especie “i” [Henchoz, 2007].

De acuerdo a estudios anteriores [Islas, 2010], los compuestos LQM (a los cuales llamaremos L), pueden presentar dos equilibrios ácido-base, donde la concentración total del analíto es:

$$C_T = \sum_{i=0}^k C_i = [L] + [LH] + [LH_2] \quad (3.8)$$

Con los equilibrios siguientes y sus constantes de formación globales ( $\beta_n$ ).



Es por ello que la movilidad electroforética efectiva ( $\mu_{ef}$ ), es:

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{L^-} + \beta_1[H^+]\mu_{LH} + \beta_2[H^+]^2\mu_{LH_2^+}}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2} \quad (3.11)$$

Mientras que la  $\mu_{L^-}$  se refiere a la movilidad iónica efectiva (MIE) del anión,  $\mu_{LH}$  se refiere a la MIE cuando se encuentra neutra y  $\mu_{LH_2^+}$  se describe la MIE cuando se halla el compuesto como catión.

Es importante señalar que cuando se presentan estas movilidades las especies se encuentran predominantemente como catión, anión o de manera neutra, lo que significa que las otras especies también existen, pero en menor medida.

Simplificando los términos se tiene que:

$$\mu_{ef} = \mu_{L^-}f_{L^-} + \mu_{LH}f_{LH} + \mu_{LH_2^+}f_{LH_2^+} \quad (3.12)$$

Donde  $f_i$  es la fracción de la especie “i”

$$f_{L^-} = \frac{1}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2} \quad (3.13)$$

$$f_{LH} = \frac{\beta_1[H^+]}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2} \quad (3.14)$$

$$f_{LH_2^+} = \frac{\beta_2[H^+]^2}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2} \quad (3.15)$$

Con esta información es posible tener una representación de la movilidad electroforética efectiva en función del pH. (Figura 3.4).

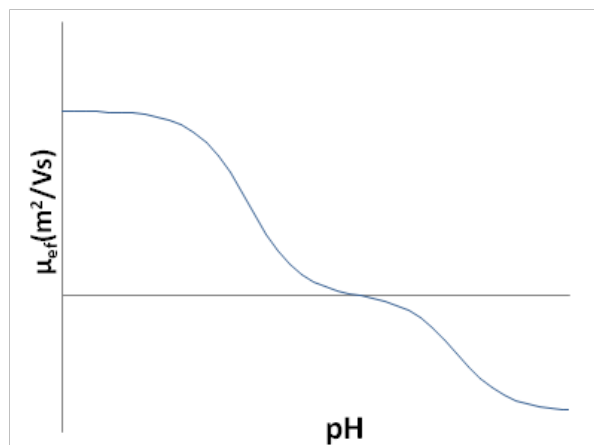


Figura 3.4: Representación básica de la movilidad electroforética efectiva como función del pH

## ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

La espectroscopía UV-Visible estudia la absorción o emisión de luz monocromática por soluciones líquidas, sólidos o gases.

La luz monocromática está formada por ondas electromagnéticas que, de acuerdo al modelo ondulatorio tienen sólo una longitud de onda ( $\lambda$ ), o una frecuencia ( $\nu$ ), cuyo producto determina la velocidad de la luz en el vacío ( $c = \lambda\nu$ ).

Sin embargo, la única forma de explicar la absorción de luz por la materia implica el modelo cuántico para la luz y la cuantización de la energía interna en las partículas que constituyen dicha materia.

Einstein, en 1905, propuso que la luz puede considerarse como formada por paquetes de energía, que llamó *quanta* y que ahora se conocen como fotones, tales que la energía por fotón ( $E_{fotón}$ ) cumple con la ecuación de Planck, de acuerdo a la ecuación 3.16.

$$E_{fotón} = h\nu \quad (3.16)$$

dónde  $h$  es una constante universal que se conoce como constante de Planck.

## ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

El espectro electromagnético es la clasificación de todas las radiaciones electromagnéticas monocromáticas, y normalmente se representa en una escala de longitud de onda, frecuencia o energía por fotón. En la Figura 3.5 se muestra el espectro electromagnético en un esquema.

## EL FENÓMENO DE ABSORCIÓN DE LUZ POR LA MATERIA

Cuando moléculas de un sistema absorben luz monocromática en la región visible o en la del UV del espectro electromagnético, alguno de sus electrones de valencia presenta una transición desde un orbital que se encuentra en el estado basal de energía ( $u_0$ ) hasta un orbital desocupado que determina un estado excitado de energía ( $u_1$ ).

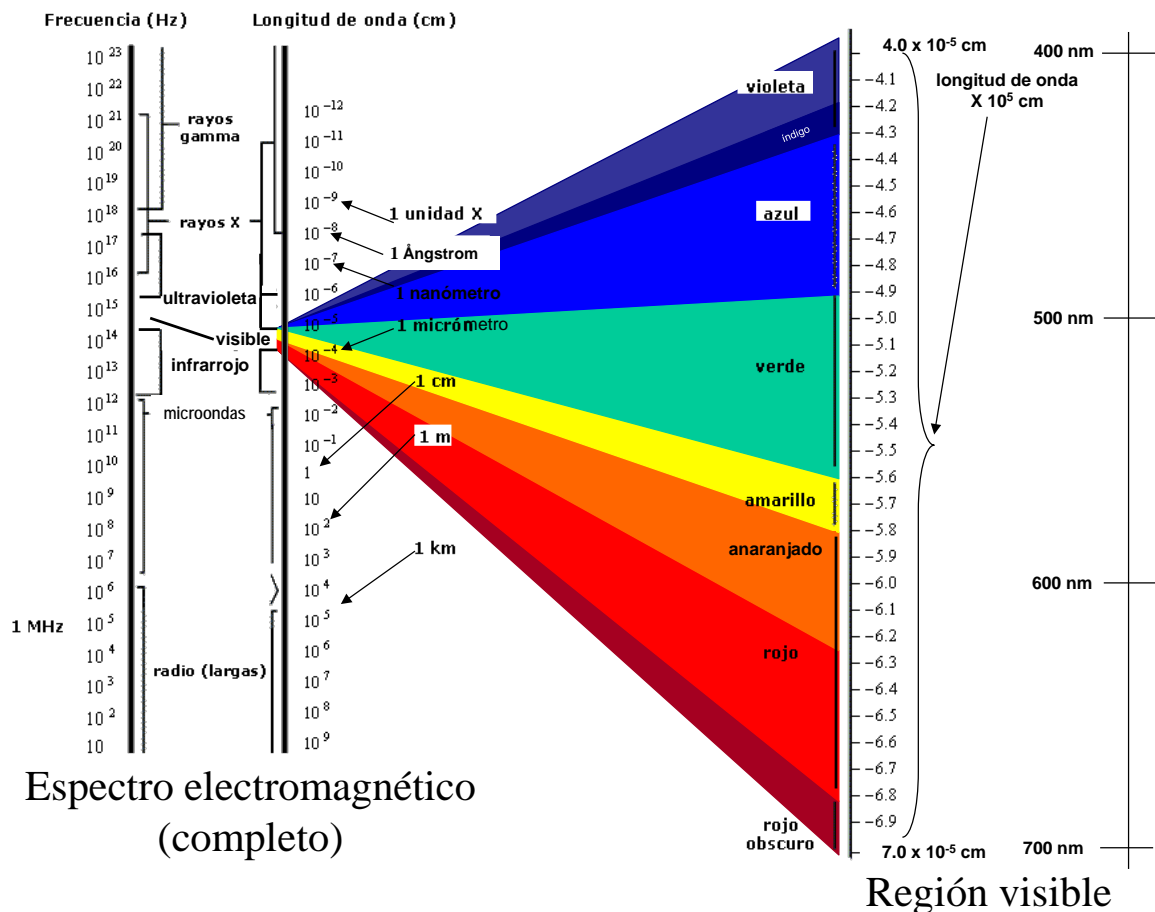


Figura 3.5. Representación del espectro electromagnético en escalas de frecuencia y de longitud de onda. La región visible (400nm a 700nm) y la región UV (200nm a 400nm) ocupan una mínima parte de la magnitud de todo el espectro electromagnético. (Adaptado de:

[http://biblioteca.redescolar.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/112/htm/sec\\_17.htm](http://biblioteca.redescolar.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/112/htm/sec_17.htm))

Para que la probabilidad de absorción de un fotón por una molécula sea alta se requiere:

📖 Que se dé una colisión entre el fotón y la molécula

📖 Que la energía del fotón corresponda con una diferencia de energías en el diagrama de niveles de energía de estado estacionario de la molécula ( $h\nu = u_1 - u_0$ )

📖 Que la colisión del fotón con la molécula satisfaga criterios geométricos en la molécula, cerca del grupo capaz de absorberlo (llamado cromóforo).

📖 Que se satisfagan condiciones adicionales establecidas por la teoría cuántica, llamadas reglas de selección.

### PROPIEDADES QUE CUANTIFICAN LA ABSORCIÓN DE LUZ

La Figura 3.6 muestra un esquema de un sistema que absorbe luz monocromática de intensidad luminosa  $I_0$  y longitud de onda  $\lambda$ .

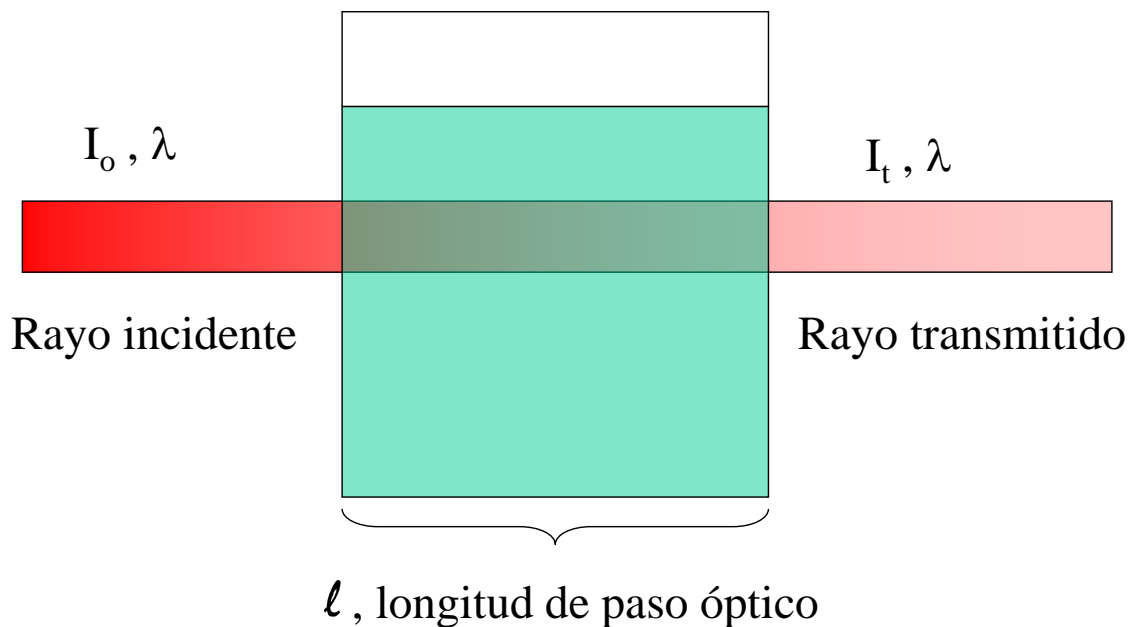


Figura 3.6. Un sistema que contiene sustancias capaces de absorber luz visible o UV, con una longitud de paso óptico  $\ell$ , transmite un rayo de luz que incide con intensidad luminosa  $I_0$  y longitud de onda  $\lambda$ , y sale con intensidad transmitida  $I_t$  y la misma longitud de onda.

Las propiedades que se pueden medir de un sistema así son, la transmitancia (T) y la absorbancia (A). En las ecuaciones 3.17 y 3.18 se dan las definiciones operacionales de ambas propiedades, así como los límites físicos para las mismas.

$$0 < T \equiv \frac{I_t}{I_o} < 1 \quad (3.17)$$

$$0 < A \equiv \log\left(\frac{I_o}{I_t}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) = -\log(T) < \infty \quad (3.18)$$

La transmitancia y la absorbancia son inversas porque mientras más absorbe luz un sistema, menos la transmite, y viceversa. En espectroscopía UV-visible es más común medir la absorbancia.

### ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La absorbancia de un sistema depende de la longitud de onda de la luz que se hace incidir sobre él. Esta relación funcional, en principio, es difícil de expresar cuantitativamente. Es por ello que se acostumbra representar esta función mediante una gráfica. En la Figura 3.7 se muestran algunos espectros de absorción, como ejemplo del tipo de gráfica que puede esperarse obtener de acuerdo a esta técnica.

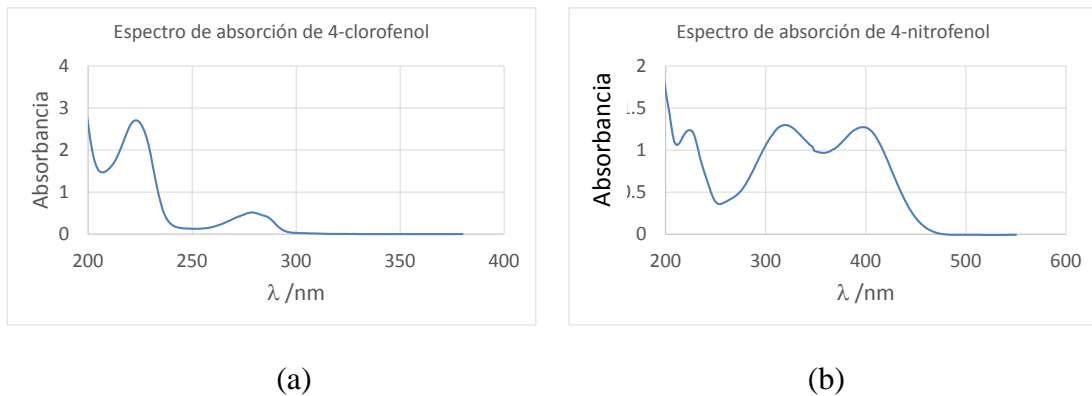


Figura 3.7. Ejemplo de espectros de absorción. a) Solución acuosa de 4-clorofenol en concentración de 40ppm. b) Solución acuosa de 4-nitrofenol en concentración de 25ppm.

## LEYES DE BEER Y DE ADITIVIDAD

Las aplicaciones de la espectroscopía UV se basan en sus leyes ideales.

La primera de ellas se conoce como Ley de Beer, y relaciona la absorbancia con la concentración de la especie que absorbe luz, en forma directamente proporcional, de acuerdo a la ecuación 3.19.

$$A^{(\lambda)} = \epsilon_X^{(\lambda)} \ell [X] \quad (3.19)$$

$A^{(\lambda)}$  representa la absorbancia (ecuación 3.18) del sistema a la longitud de onda,  $\lambda$ ;  $\ell$  es la longitud de paso óptico (Figura 3.6),  $\epsilon_X^{(\lambda)}$  se conoce como coeficiente de absorptividad de la especie que absorbe ese tipo de luz monocromática (X), y [X] su concentración.

La segunda de las leyes ideales de absorción de luz se conoce como Ley de Aditividad, y relaciona la absorbancia de un sistema que contiene una mezcla de sustancias que pueden absorber luz, con la absorbancia que cada uno de las especies de la mezcla tendría si se encontrara sola en el sistema, como se establece en la ecuación 3.20.

$$A^{(\lambda)} = A_X^{(\lambda)} + A_Y^{(\lambda)} \quad (3.20)$$

Las leyes ideales de absorción se cumplen cuando los sistemas son tan diluidos que las moléculas sólo interaccionan cuando chocan, y no a través de fuerzas electrostáticas.

## ABSORCIÓN DE LUZ Y DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ

La ecuación 3.7 es totalmente análoga a la de la combinación de las leyes de Beer y de aditividad. Es así que se puede seguir un planteamiento análogo al que se muestra entre las ecuaciones 3.8 a 3.15, pudiendo obtenerse curvas de absorbancia como función del pH que serían similares a la que se presenta en la figura 3.4, en cuanto a que tendrían una forma sigmoideal, pero que también dependen de la longitud de onda, porque –según ésta– las especies del sistema ácido-base presentan diferente absorción (de acuerdo al coeficiente de absorptividad de cada una de ellas) [Rodríguez, 2009].

En la Figura 3.8 se muestran dichas curvas sigmoideales para un sistema como el definido por las ecuaciones 3.8 a 3.10. (los marcadores representan valores experimentales

de absorbancia y las líneas, continua, segmentada o punteada, las absorbancias calculadas por un modelo como el de la ecuación 3.21).

$$A = A_{L^-} f_{L^-} + A_{LH} f_{LH} + A_{LH_2^+} f_{LH_2^+} \quad (3.21)$$

donde  $A_{L^-}$ ,  $A_{LH}$  y  $A_{LH_2^+}$  representan las absorbancias del sistema en condiciones de pH en donde  $L^-$ ,  $LH$  o  $LH_2^+$  predominarán francamente; en tanto que  $f_{L^-}$ ,  $f_{LH}$  y  $f_{LH_2^+}$  son las fracciones de las especies mostradas en las ecuaciones 3.13 a 3.15.

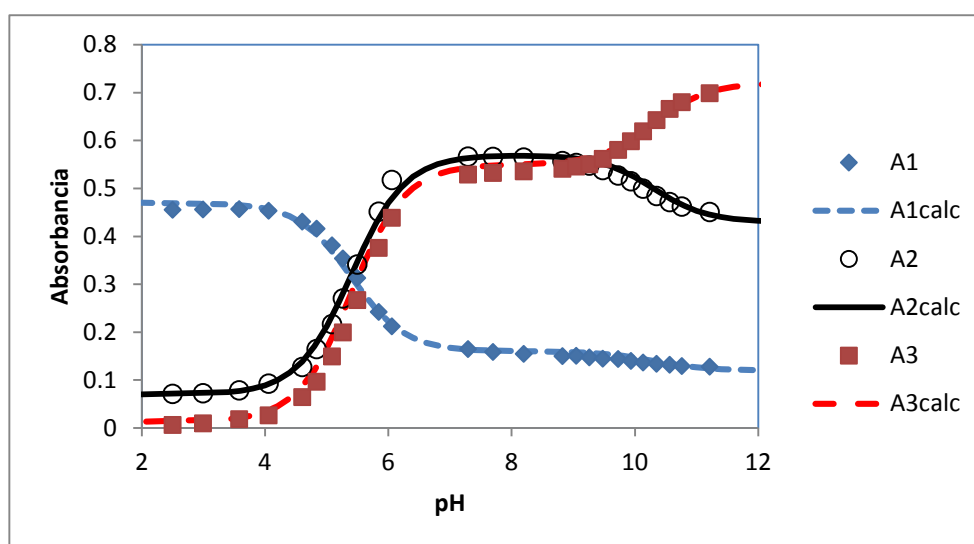


Figura 3.8. Ejemplo de curvas sigmoidales de absorbancia como función de pH para un mismo sistema bidonador como el definido por las ecuaciones 3.8 a 3.10. A1, A2 y A3 son absorbancias a las longitudes de onda  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ .

Las curvas mostradas en la figura 3.8 son diferentes porque las especies involucradas absorben luz según su longitud de onda. En el caso del sistema representado en la figura 3.8 los valores de  $pK_a$  considerados son:  $pK_{a1} \approx 5.5$  y  $pK_{a2} \approx 10.3$ , que deben corresponder a los puntos de inflexión de las sigmoides que mejor se aprecian en las curvas (si los valores de  $pK_a$  están separados lo suficiente, esto es, con una diferencia de al menos dos unidades).



## **CAPITULO IV. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS**

### **EXPERIMENTOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS**

#### **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

REACTIVOS: NaOH al 99% (Merck), HCl al 37% (Merck), NaCl al 99% (Merck), LQM324, 330, 331 y 334 los cuales fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM dirigido por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano, nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), buffer de fosfatos Radiometer Analytical SAS que de acuerdo con la IUPAC tiene un valor de  $pH= 7.000\pm 0.010$  a 25 °C.

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada con una resistividad mínima de 18 M $\Omega$ .cm y libre de  $CO_2$ . Para liberar el agua de iones se utilizó un desionizador marca MILLIPORE modelo Milli-Q Gradient.

Para obtener los espectros de absorción se utilizó el equipo espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 900, utilizando celdas de cuarzo con 1 cm de longitud de paso óptico.

Las soluciones se mantuvieron en atmósfera inerte con nitrógeno ( $N_2$ ), y para conservar la temperatura constante de  $37.0\pm 0.1$  °C, se utilizó una celda de doble camisa conectado a un baño termostatado digital LAUDA E200, en la cual se le hace recircular agua y se midió la temperatura con un termómetro de mercurio.

Las valoraciones espectrofotométricas ácido-base se llevaron a cabo con la metodología propuesta por el Laboratorio de Química Analítica de la UAM [Islas, 2008], en la cual se agrega el compuesto en la solución ácida como en la solución básica, a la misma concentración, con el objetivo de eliminar correcciones de dilución del compuesto, cuando se realicen las valoraciones espectrofotométricas ácido-base.

## SOLUCIÓN STOCK DE LQM'S

En los estudios de espectrofotometría UV-Visible se prepararon soluciones acuosas de LQM'S a la concentración de trabajo elegida de alrededor de  $2.44 \times 10^{-5} \text{M}$ . Todos los experimentos se realizaron por triplicado, a una temperatura constante de  $37 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  en una atmósfera inerte con  $\text{N}_2$ .

En una balanza analítica se pesan aproximadamente  $5.00 \pm 0.01 \text{ mg}$  del LQM, diluyéndolo con la mínima cantidad de  $\text{HCl } 0.1\text{M}$ , (debido a que los compuestos tiomorfolínicos no son solubles en agua), aforando con agua desionizada en un matraz volumétrico con capacidad de  $50 \pm 0.05 \text{ mL}$ .

## SOLUCIÓN ÁCIDA

De la solución stock se toma con una pipeta volumétrica, una alícuota de  $20 \pm 0.30 \text{ mL}$ , agregándola a un matraz volumétrico de  $250 \pm 0.24 \text{ mL}$ , el cual contiene  $2000 \pm 0.01 \text{ mg}$  de  $\text{NaCl}$ , y  $2 \pm 0.006 \text{ mL}$  de  $\text{HCl } 0.01 \text{ M}$ , para más tarde llevarlo a la marca de aforo con agua desionizada.

## SOLUCIÓN BÁSICA

Se toma de la solución stock con una pipeta volumétrica, una alícuota de  $20 \pm 0.30 \text{ mL}$ , agregándola a un matraz volumétrico de  $250 \pm 0.24 \text{ mL}$ , el cual contiene  $2000 \pm 0.01 \text{ mg}$  de  $\text{NaCl}$ , y  $2 \pm 0.01 \text{ mL}$  de  $\text{NaOH}$  de  $0.01\text{M}$ ; para posteriormente con agua desionizada aforarlo.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **ESTUDIO DE ESTABILIDAD**

Las pruebas de estabilidad de los compuestos tiomorfolínicos se realizaron con el objetivo de obtener el intervalo y las condiciones de trabajo de las valoraciones ácido-base, asimismo para determinar la concentración óptima del compuesto LQM que permite una buena lectura de absorbancia. Como ejemplo del procedimiento experimental, se describe el estudio del compuesto LQM324.

Se prepararon dos soluciones: una solución de LQM324 a una concentración alrededor de  $2.44 \times 10^{-5}$  M en medio ácido (0.01M HCl) y otra en medio básico (0.01 M NaOH), con la misma concentración de LQM324 (ambas soluciones previamente valoradas). A las soluciones se les agregó NaCl para imponer la fuerza iónica a 0.15 M, midiendo con ello su pH y obteniendo su espectro de absorción UV-Visible en función del tiempo,

La metodología anteriormente mencionada es la misma para todos los compuestos LQM'S existiendo un cambio en las concentraciones de cada compuesto, debido a que sus características, peso molecular y espectros son diferentes.

### ADQUISICIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN

1. Se montó el sistema conectando la celda termostataada de vidrio, a una temperatura de  $37 \pm 0.1$  °C y bajo una atmósfera inerte de nitrógeno para evitar variaciones en el pH debidas al CO<sub>2</sub>, posteriormente se agregan 20 mL de la solución ácida, manteniendo la agitación constante, como se muestra en la Figura 4.1.

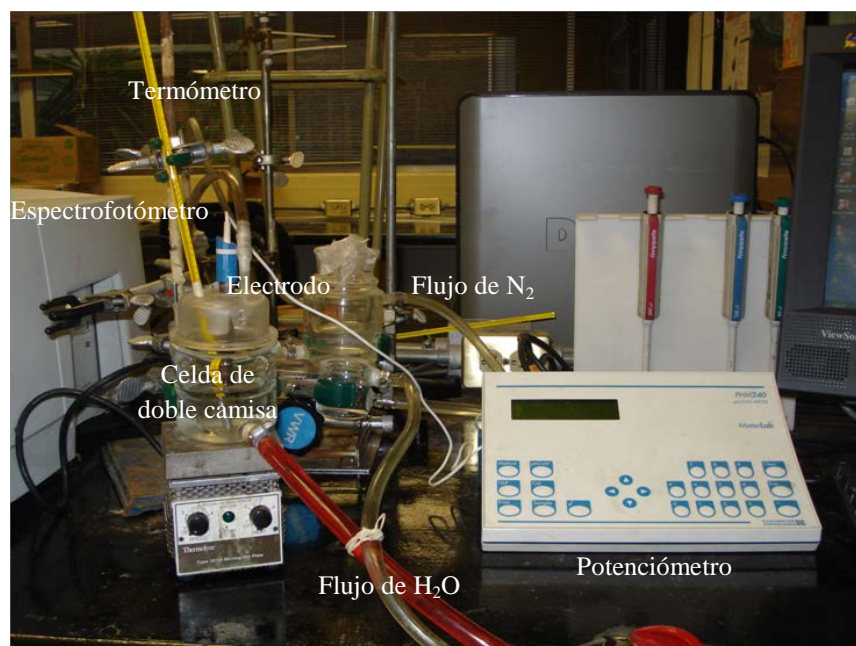


Figura 4.1. Equipo utilizado para la obtención de espectros UV-Visible.

2. Para calibrar el electrodo se utilizó un buffer de fosfatos Radiometer Analytical SAS que tiene un valor de  $\text{pH} = 7.000 \pm 0.010$  a 25 °C.

3. Se introdujo el electrodo combinado y se midió el pH inicial de la solución; cubriéndola del medio ambiente y burbujeando el sistema con  $N_2$ .

4. En la calibración del espectrofotómetro, se empleó agua desionizada como blanco, (ya que el NaOH no absorbe luz, es por ello que no afecta al espectro de absorción si se calibra solamente con  $H_2O$ ) y se elige el intervalo de trabajo del espectro de absorción correspondiente entre 200 a 700 nm.

5. Se tomó una muestra de la solución ácida en una celda de cuarzo, se lleva al espectrofotómetro, para realizar el barrido correspondiente, posteriormente se regresa la muestra al sistema.

6. Se agregó al sistema un volumen de la solución básica en cantidades necesarias para aumentar el pH del sistema en aproximadamente 0.1 a 0.2 unidades. Registrando con ello el aumento de pH, se tomó una muestra de la solución ácida en cada caso para realizar su barrido correspondiente y se continuó con el procedimiento hasta llegar a un pH neutro (pH=7).

7. Para la solución básica se siguieron los pasos del 1 al 6 de la metodología antes mencionada, agregando cantidades ahora de la solución ácida.

8. El anterior procedimiento se llevó a cabo de manera análoga, para todos los compuestos LQM'S. Una vez seguida la metodología anterior, se obtuvieron dos familias de espectros una básica y una ácida. En la Figura 4.2 se ejemplifica la familia de espectros en la zona acida para el compuesto LQM324.

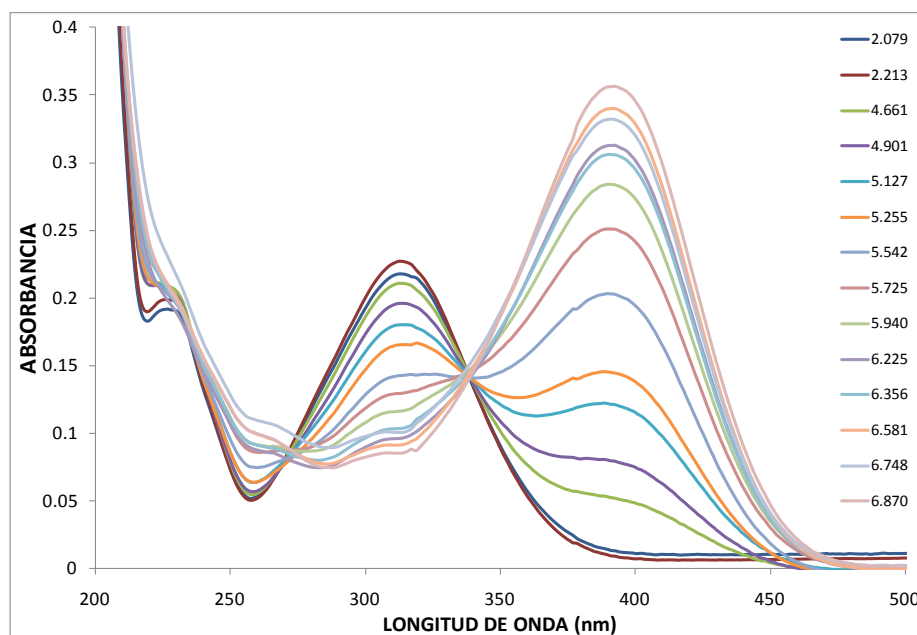


Figura 4.2: Espectro de absorción del compuesto LQM324 a  $2.44 \times 10^{-5}$ , cuyo intervalo de pH es de 2.079 a 6.870

Los valores pH de las soluciones tienen una incertidumbre de  $\Delta\text{pH} = \pm 0.001$  y fueron medidos con un electrodo combinado de vidrio con referencias internas  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(s)}$  (Radiometer analytical) cuyo intervalo de trabajo es de 0-12 unidades de pH, conectado a un potenciómetro TACUSSEL, LPH430T. Los valores de pH fueron corregidos por la eficiencia de la celda con la ecuación 4.1

$$\text{pH}_{\text{corr}} = \text{pH}_{\text{exp}} + \left[ \frac{\text{pH}_{\text{cal}} - \text{pH}_{\text{exp}}}{\text{pH}_{\text{cal}}} \right] * \text{Ef} \quad (4.1)$$

Dónde:  $\text{pH}_{\text{corr}}$  = pH corregido,  $\text{pH}_{\text{exp}}$  = pH medido experimentalmente,  $\text{pH}_{\text{cal}}$  = pH de calibración del electrodo de vidrio, Ef = Es un parámetro empírico relacionado con la eficiencia de la celda. Cuando la corrección es cero ( $\text{pH}_{\text{cal}} = \text{pH}_{\text{exp}}$ ) entonces la eficiencia de la celda es de 100%. El resultado que se obtiene con esta ecuación es prácticamente igual al de los métodos propuestos por [Wescott, 1978] y [Bates, 1973].

## **EXPERIMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA**

### **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

Para preparar las soluciones se utilizó agua desionizada con una resistividad mínima de 18 M $\Omega$ /cm. Para liberar el agua de iones se utilizó un desionizador marca MILLIPORE modelo Milli-Q Gradient.

Se emplearon los siguientes reactivos: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO a 99.6% (J.T. Baker), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 99%(J.T. Baker), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 99.22%(J.T. Baker), Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 96%(Aldrich), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 99.7%(J.T. Baker), NaOH al 99% (Merck), HCl al 37% (Merck). Los compuestos LQM fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM dirigido por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

Para medir el pH se utilizó un electrodo combinado de vidrio con referencias internas Ag/AgCl<sub>(s)</sub> (Radiometer Analytical), para mediciones en el intervalo de 0-12 unidades de pH, cuya incertidumbre de pH es de  $\pm 0.001$ , conectado a un potenciómetro TACUSSEL, LPH430T.

La calibración del electrodo se llevó a cabo con buffer de fosfatos Radiometer Analytical SAS que de acuerdo con la IUPAC tiene un valor de pH= 7.000 $\pm$ 0.010 a 25 °C.

El equipo utilizado para realizar la ECZ fue: Beckman Coulter P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD). Empleando un capilar de sílice fundida de 50  $\mu$ m de diámetro interno, 50.2 cm de longitud total y 40 cm de longitud del capilar al detector (en su lado largo). Como se muestra a continuación en la Figura 4.3.

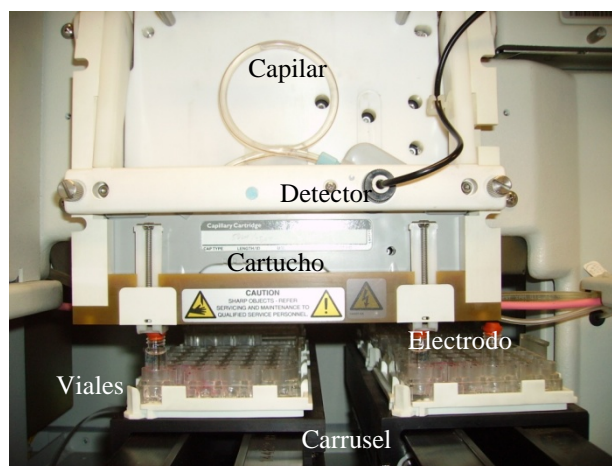


Figura 4.3. Equipo de electroforesis capilar de zona

Para mantener la temperatura de trabajo ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ ) se usó un sonicador ultrasónico Cole-Parmer 8891. Se utilizó acetona como marcador de flujo electroosmótico.

### **SOLUCIÓN DEL COMPUESTO LQM324**

En un matraz aforado de 10 mL, se agregan aproximadamente 5 mg del compuesto LQM324 vertiéndole agua desionizada hasta su marca de aforo. De la misma manera se deben preparar todas las soluciones de los compuestos tiomorfolínicos restantes.

### **SOLUCIÓN DE $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.5 M**

En un matraz aforado de 25 mL se agregan 1.70 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , agregando agua hasta su marca de aforo.

### **SOLUCIÓN DE $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.5 M**

Utilizando un matraz aforado de 25 mL se agregan 2.177g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , adicionando agua hasta su marca de aforo.

### **SOLUCIÓN DE $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0.5 M**

Colocar en matraz aforado de 25 mL 2.049 mg de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  y agua desionizada hasta aforar.

## **SOLUCIÓN DE BUFFER DE FOSFATOS (50 mM)**

Por ejemplo para obtener un pH de aproximadamente 10.3, se agregan 2475  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5M y 25 $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5M, añadiéndole agua desionizada hasta la marca de aforo. Esta solución se calentó hasta 37 °C y se tomó la lectura del pH para que al momento de la adquisición del electroferograma, se realizara a esa temperatura y con ello, los datos de electroforesis capilar de zona se puedan comprar con las obtenidas en la espectroscopía ya que se encuentran a la misma temperatura.

Cabe mencionar que las cantidades y las soluciones de los fosfatos, varían para obtener diferentes valores de pH.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR.**

El equipo de ECZ tiene un capilar de sílice fundida, así que para acondicionarlo se hace pasar una solución de NaOH 0.1 M durante 5 min a una presión de 20 psi, con el objetivo de retirar las posibles impurezas y activar los grupos silanol. Posteriormente se hace pasar una corriente de agua desionizada por 5 min con una presión de 20 psi, esto para retirar el exceso de hidróxido de sodio. Este procedimiento sólo se hace al inicio del día.

### **ADQUISICIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS**

a) Se realizan lavados con NaOH 0.1M por 1 min y 20 psi, para después realizarlo con agua desionizada por el mismo tiempo y a la misma presión.

b) Se introduce el buffer de pH adecuado por 1.5 min con una presión de 20 psi.

c) Inyectar la muestra (la solución LQM324 y 200 $\mu\text{L}$  de acetona) en 10 s con presión de 1 psi. Se utiliza la acetona debido a que es eléctricamente neutra, no reacciona con los LQM, ni con el buffer utilizado y es el marcador de flujo electroosmótico.

d) Efectuar la separación con un voltaje de 20 KV por 15 minutos



El resultado es un electroferograma en donde varía el tiempo de migración del compuesto de acuerdo al pH de la solución amortiguadora, como se ejemplifica en la Figura 4.4.

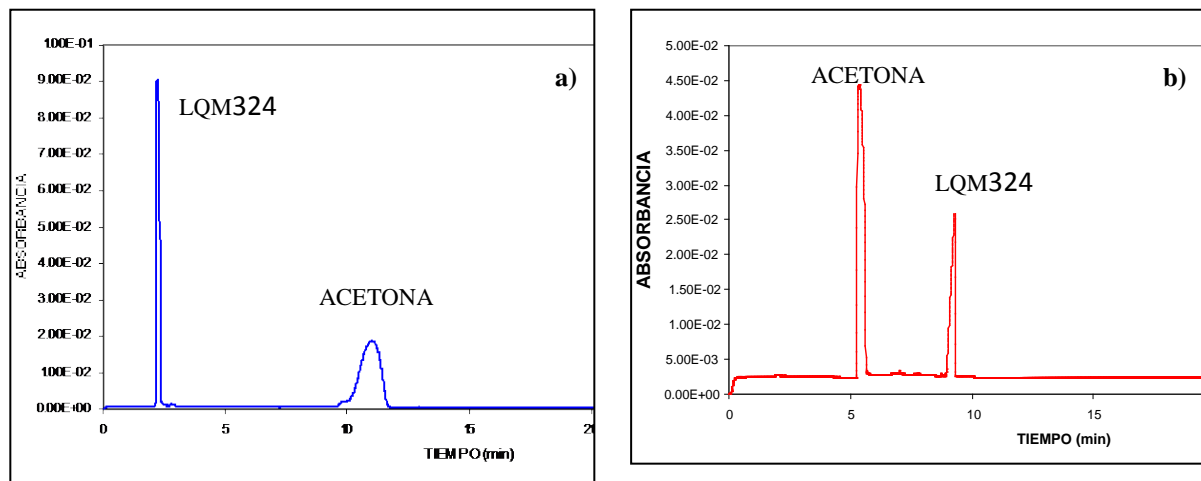


Figura 4.4. Muestra el electroferogramas registrados a 290 nm del compuesto LQM324 a un valor de a) pH de 4.55, b) pH de 10.93 para la solución amortiguadora

e) Se varía el pH de la solución amortiguadora para obtener electroferogramas suficientes para poder calcular el pKa del compuesto (cada 0.2 unidades de pH, aproximadamente)

g) Realizar el procedimiento por triplicado

f) Repetir la misma metodología para los tres LQM restantes.

En algunos casos, para los valores de pH más ácidos, se realizaron los experimentos con polaridad invertida e inyectando el LQM por el lado corto del capilar, para disminuir el tiempo de migración de la acetona.

### **DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ MEDIANTE EL MÉTODO GRÁFICO.**

El método gráfico es una herramienta útil y comúnmente utilizado para determinar el valor de las constantes de acidez en soluciones acuosas, mediante datos de absorbancia o movilidad electroforética en función del pH.

Su objetivo es obtener un valor de pKa con base en datos experimentales que corresponden con un solo equilibrio químico, que se representa como se muestra en la ecuación 4.2.



Dónde:  $HL$  : ácido monoprótico,  $L^-$  : base conjugada del ácido y  $H^+$  : ion hidronio.

### MÉTODO GRÁFICO PARA DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Para calcular el valor de la constante de acidez se grafica el valor de las absorbancias en función del pH a una longitud de onda determinada (seleccionada para un máximo de absorción). En la figura 4.5 se presenta una de las curvas obtenidas para el compuesto LQM324.

La curva mostrada en la figura 4.5 puede interpretarse si se considera que el LQM324 se comporta como un ácido monoprótico HL en ese intervalo de pH y si a la longitud de onda de 315 nm que se seleccionó,  $L^-$  absorbe más luz que HL.

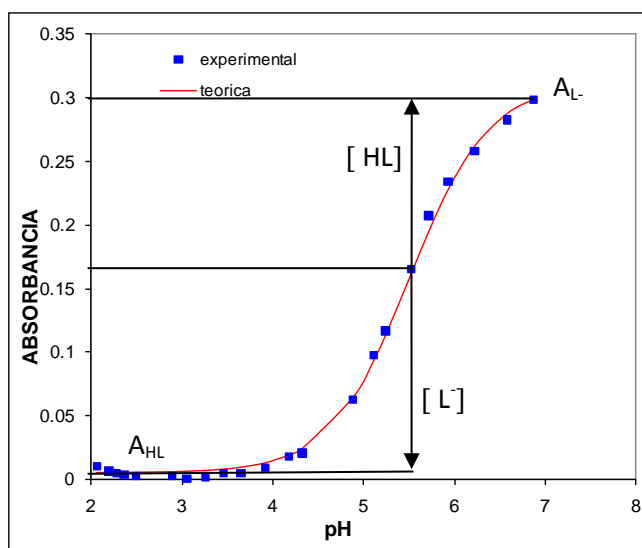


Figura 4.5: Curva de absorbancia a 315 nm en función del pH, teórica representada (línea) y experimental (marcadores), para un pH de 2 a 7 para el compuesto LQM324 a  $2.44 \times 10^{-5} M$

La constante de disociación ácida de HL está dada por la ecuación (4.3):

$$K_a = \frac{[L^-][H^+]}{[HL]} \quad (4.3)$$

Despejando y aplicando el  $-\log$  a ambos lados de la ecuación (4.3) para no alterar el resultado, y reordenando, se obtiene la ecuación (4.4), que en muchas referencias se conoce como ecuación tipo Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log \frac{[L^-]}{[HL]} \quad (4.4)$$

Considerando que la concentración total ( $C_T$ ) del compuesto L se puede considerar constante (en nuestro caso en un valor conocido), corresponde a la sumatoria de concentraciones de la forma ácida [HA] más la concentración básica  $[L^-]$

$$C_T = [HL] + [L^-] \quad (4.5)$$

Despejando  $[L^-]$  de la ecuación 4.4 y sustituyendo en la ecuación 4.5, para obtener

$$[L^-] = \frac{C_T}{1 + 10^{(pKa - pH)}} \quad (4.6)$$

Sustituyendo la ecuación (4.6) en la ecuación (4.5), se obtiene el valor de  $[HL]$  al despejarlo de la ecuación (4.5).

Aunado a lo anterior, si se utilizan las leyes de Beer (3.19) y la ley de aditividad combinadas, puede escribirse la ecuación (4.7).

$$A^{(\lambda)} = A_{HL}^{(\lambda)} + A_{L^-}^{(\lambda)} = \varepsilon_{HL}^{(\lambda)}(1 \text{ cm})[HL] + \varepsilon_{L^-}^{(\lambda)}(1 \text{ cm})[L^-] \quad (4.7)$$

Con base en lo anterior mediante una hoja de cálculo (ejemplo Tabla 4.1), se obtiene de manera iterativa el valor de pKa, la cual termina cuando el comportamiento de la curva, es casi igual a la curva experimental, como se mostró en la Figura 4.5 para el compuesto LQM324, el cual tiene una concentración es de  $2.44 \times 10^{-5} \text{ M}$  y el valor obtenido de pKa es de 5.5 y la longitud de paso óptico de la celda es de 1cm.

Tabla 4.1. Muestra un ejemplo (LQM324) de la hoja de cálculo utilizada para determinar el pKa, mediante un método gráfico de ajuste en donde  $C_T = 2.44 \times 10^{-5} M$  y los coeficientes de absorptividad se han estimado como  $\epsilon_{HL} = 12756 \text{ cm}^{-1} M^{-1}$  y  $\epsilon_{L^-} = 207 \text{ cm}^{-1} M^{-1}$ .

pH	Absorbancia experimental	$[L^-]$	$[HL]$	Absorbancia calculada
2.282	0.00505	$1.5 \times 10^{-8}$	$2.4428 \times 10^{-5}$	0.0052336
2.365	0.00341	$1.8 \times 10^{-8}$	$2.4425 \times 10^{-5}$	0.0052727
2.497	0.00259	$2.4 \times 10^{-8}$	$2.4418 \times 10^{-5}$	0.0053524
2.893	0.00285	$6.0 \times 10^{-8}$	$2.4382 \times 10^{-5}$	0.0058044
3.052	0.00064	$8.7 \times 10^{-8}$	$2.4356 \times 10^{-5}$	0.0061376
3.258	0.00199	$1.4 \times 10^{-7}$	$2.4303 \times 10^{-5}$	0.0067950
3.456	0.00499	$2.2 \times 10^{-7}$	$2.4224 \times 10^{-5}$	0.0077951
3.649	0.00454	$3.4 \times 10^{-7}$	$2.4103 \times 10^{-5}$	0.0093108
3.913	0.00922	$6.2 \times 10^{-7}$	$2.3826 \times 10^{-5}$	0.0127869
4.175	0.01812	$1.1 \times 10^{-6}$	$2.3338 \times 10^{-5}$	0.0189059
4.324	0.02071	$1.5 \times 10^{-6}$	$2.2915 \times 10^{-5}$	0.0242232
4.882	0.06302	$4.7 \times 10^{-6}$	$1.9696 \times 10^{-5}$	0.0646148
5.11	0.09744	$7.1 \times 10^{-6}$	$1.7367 \times 10^{-5}$	0.0938374
5.238	0.11679	$8.6 \times 10^{-6}$	$1.5800 \times 10^{-5}$	0.1135100
5.527	0.16511	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.1842 \times 10^{-5}$	0.1631847
5.712	0.20728	$1.5 \times 10^{-5}$	$9.2963 \times 10^{-6}$	0.1951264
5.929	0.23412	$1.8 \times 10^{-5}$	$6.6324 \times 10^{-6}$	0.2285566
6.216	0.25857	$2.1 \times 10^{-5}$	$3.9424 \times 10^{-6}$	0.2623146
6.576	0.28283	$2.3 \times 10^{-5}$	$1.8930 \times 10^{-6}$	0.2880338
6.869	0.29901	$2.3 \times 10^{-5}$	$1.0022 \times 10^{-6}$	0.2992120
Ecuación utilizada		(4.6)	despejado de (4.5)	(4.7)

Otra forma de obtener de manera gráfica el pKa es mediante un cambio de variable para obtener una función lineal utilizando la ecuación tipo de Henderson-Hasselbach (4.4).

Así, de acuerdo a la ecuación 3.21, pero para sistemas monodonadores:

$$A = f_{LH}A_{LH} + f_{L^-}A_{L^-} = \frac{[HL]}{C_T}A_{LH} + \frac{[L^-]}{C_T}A_{L^-} \quad (4.8)$$

Nombrando  $X = \frac{[HL]}{C_T}$ , entonces  $1 - X = \frac{[L^-]}{C_T}$ . Sustituyendo en la ecuación (4.8), teniendo como resultado:

$$A = XA_{LH} + (1 - X)A_{L^-} \quad (4.9)$$

Despejando a X de la ecuación 4.9

$$A - A_{L^-} = XA_{LH} - XA_{L^-}$$

$$A - A_{L^-} = X(A_{LH} - A_{L^-})$$

$$X = \frac{A - A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}} \quad (4.10)$$

Se sustituye en la ecuación (4.4) el valor de X y (1-X), teniendo el siguiente resultado:

$$\text{pH} = \log \frac{1-X}{X} + \text{pKa} \quad (4.11)$$

Sustituyendo (4.10) en (4.11)

$$\text{pH} = \log \frac{1 - \frac{A - A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}}}{\frac{A - A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}}} + \text{pKa}$$

Factorizando:

$$\text{pH} = \log \frac{\frac{A_{LH} - A_{L^-} - A + A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}}}{\frac{A - A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}}} + \text{pKa}$$

Eliminando

$$\text{pH} = \log \frac{\frac{A_{LH} - A}{A_{LH} - A_{L^-}}}{\frac{A - A_{L^-}}{A_{LH} - A_{L^-}}} + \text{pKa}$$

Para obtener una ecuación que solo depende de las absorbancias y que tiene el comportamiento de una línea recta

$$\text{pH} = \log \frac{A_{LH} - A}{A - A_{L^-}} + \text{pKa} \quad (4.12)$$

Dónde:

$$\underbrace{\phantom{y}} = \underbrace{\mathbf{m}} \quad \underbrace{\phantom{x}} \quad \underbrace{\phantom{+}} \quad \underbrace{\mathbf{b}}$$

Por lo tanto si se grafica el pH que está en función del término  $\log \frac{A_{LH} - A}{A - A_{L^-}}$ , su pendiente es igual a la unidad, la ordenada al origen pKa y la línea debe atravesar el eje de

las abscisas en donde  $\text{pH} = -\text{pKa}$  lo que significa que  $[\text{L}^-] = [\text{HL}]$  y por lo tanto,

$$\log \frac{A_{\text{LH}} - A}{A - A_{\text{L}^-}} = 0$$

A continuación en la figura 4.6, se muestra un ejemplo (compuesto LQM324), donde al realizar la regresión lineal se obtiene el valor de la ordenada al origen que representa el valor de  $\text{pKa} = 5.509 \pm 0.043$  y el valor de su pendiente es cercano a la unidad. Donde los valores de  $A_{\text{LH}} = 0.00505$  y  $A_{\text{L}^-} = 0.29901$ .

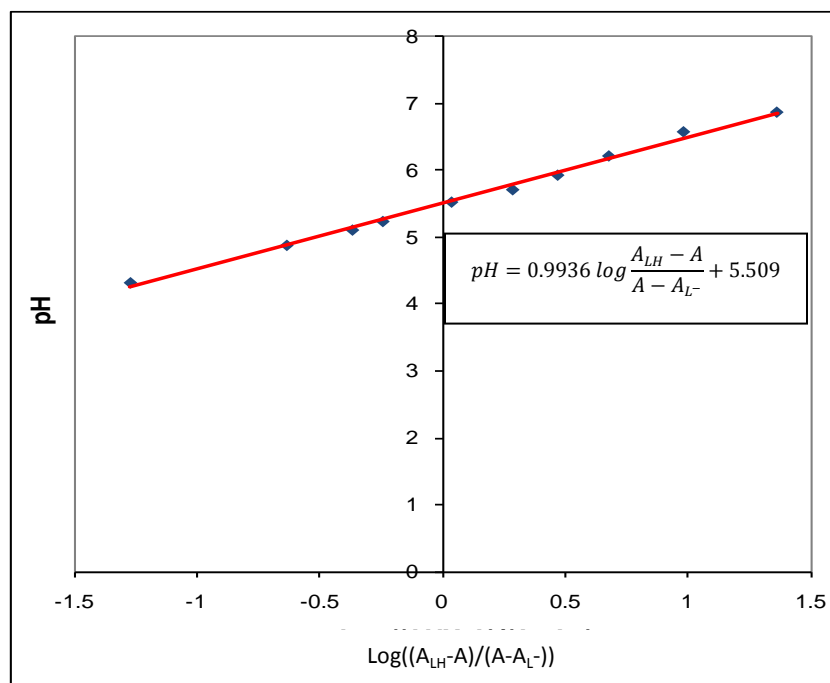


Figura 4.6: Curva linealizada y regresión lineal para obtener el valor de  $\text{pKa}$  de LQM324 a  $2.44 \times 10^{-5} \text{M}$

## MÉTODO GRÁFICO PARA DATOS ELECTROFORÉTICOS

Una de las principales ventajas de utilizar ECZ es que aunque el compuesto tenga un cierto nivel de impurezas no interfieren para la determinación de los valores de  $\text{pKa}$ , porque solo depende del tiempo de migración de la sustancia que se está estudiando [Rodríguez, 2009].

Al graficar los datos de movilidad electroforética efectiva (los cuales son obtenidos de los electroferogramas) como función del  $\text{pH}$ , el comportamiento en general describe las zonas donde el analito se encuentra predominantemente como anión (movilidades negativas) o como catión (movilidades positivas). En estas zonas la movilidad permanece

aproximadamente constante hasta que las fracciones de las especies se empiezan a igualar y entonces se observa un cambio marcado como se muestra en la Figura 4.7, para el compuesto LQM324

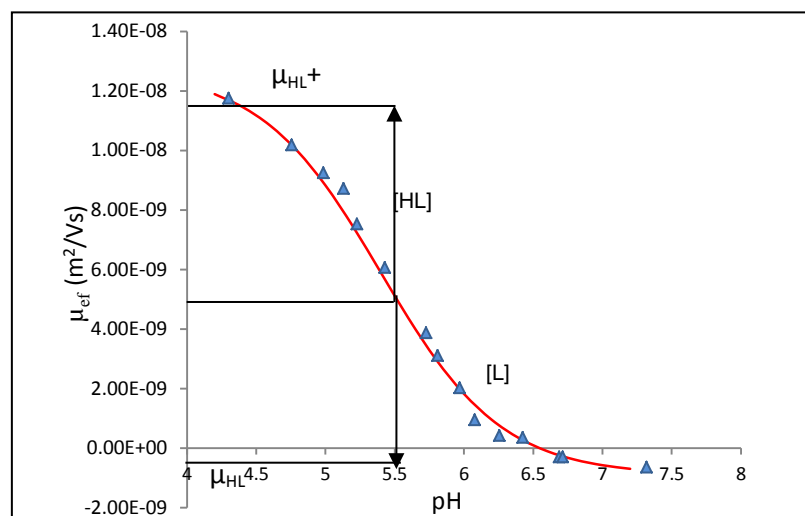


Figura 4.7: Curvas de movilidad efectiva en función del pH, teórica y experimentalmente, para un intervalo de pH de 4.0 a 7.2 para el compuesto LQM324, representando únicamente un equilibrio ácido-base

En la gráfica:  $\mu_{HL^+}$  = Movilidad iónica efectiva de  $HL^+$ , del catión,  $\mu_L$  = Movilidad iónica efectiva de L, la especie neutra,  $\mu$  = Movilidad efectiva de la muestra

Debido al comportamiento de la Figura anterior se tiene que si  $pH \ll pK_{a1}$ , se puede decir que sólo existe la especie catiónica, obteniendo así el valor de su movilidad efectiva para el catión. Por el contrario si  $pH \gg pK_{a2}$  (no mostrado en la figura 4.7), puede considerarse que solamente existe la especie aniónica, conociendo con ello el valor de la movilidad efectiva del anión.

Dado que la forma matemática de las ecuaciones (3.12) y (3.21) es la misma, se puede hacer un desarrollo similar al mostrado para los datos espectrofotométricos para los datos de movilidad efectiva; con lo que se obtiene la ecuación (4.13) –análoga a la ecuación (4.4)– y, por lo tanto, se puede realizar una regresión lineal parecida a la de los datos espectrofotométricos

$$pH = \log \frac{\mu_{HL^+} - \mu}{\mu - \mu_L} + pKa \quad (4.13)$$

dónde:

$$\underbrace{\phantom{y}}_{\mathbf{y}} = \underbrace{\mathbf{m}}_{\mathbf{m}} \underbrace{\mathbf{x}}_{\mathbf{x}} + \underbrace{\mathbf{b}}_{\mathbf{b}}$$

Obteniendo un gráfico como el de Figura 4.8, con un  $pK_a=5.426 \pm 0.075$

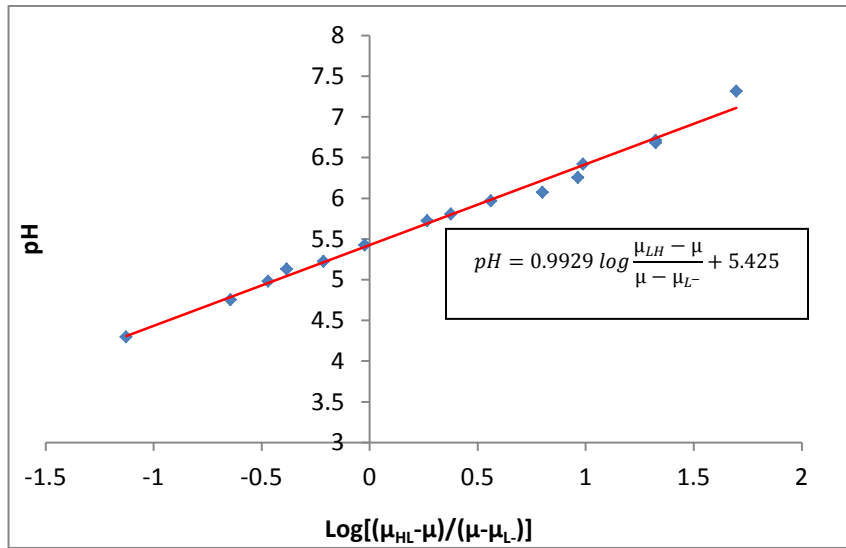


Figura 4.8: Regresión lineal para obtener el valor de  $pK_a$  de LQM324 para un intervalo de pH de 4.0 a 7.2

## ESTIMACIÓN DE ESPECIES QUE ABSORBEN LUZ, MEDIANTE LOS PROGRAMAS TRIANG Y SIBYLA

### TRIANG

El programa TRIANG está escrito en lenguaje FORTRAN [Hartley, 1980]. Estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en el sistema a partir de los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda y diferente composición química del sistema, considerando el error en las lecturas de transmitancia ( $\Delta T$ ).

Considerando que se cumple la ley de Beer y la ley de aditividad, para el sistema de estudio, TRIANG establece la existencia de una especie química absorbente comparando entre valores de absorbancia y errores asociados a la misma.

Se calculan los elementos de una matriz de error, considerando el valor de  $\Delta T$ , la ecuación del error en la absorbancia y la teoría de la propagación del error. Después se busca la diagonalización a cero de dicha matriz comparando los elementos de la diagonal con la matriz de absorbancia (P): si elemento diagonal de la matriz del error  $E_{jj}$  multiplicado por tres es menor que el elemento  $P_{jj} \neq 0$ , el número de especies que absorben en el sistema se estima como la suma de los elementos  $P'_{jj}$  diferentes de cero.



Tomando en cuenta que el error en las lecturas de transmitancia es igual a un medio de la diferencia entre el cuadrado del error instrumental y el cuadrado del error volumétrico, entonces para datos espectrofotométricos obtenidos experimentalmente el valor de  $\Delta T$  debe encontrarse en el intervalo de  $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$ .

El procedimiento a utilizar TRIANG es el siguiente:

Se abre el programa y pide la siguiente información: Nombre del archivo de entrada, Nombre del archivo de salida, (TRIANG lo creará para colocar los resultados) y el  $\Delta T$  a utilizar como se muestra en la Figura 4.9



Figura 4.9 Caratula del programa TRIANG, para el compuesto LQM331.

El archivo entrante contiene datos de absorbancia en función del pH. El intervalo de longitudes de onda, así como los valores de pH, se seleccionan por contener la mayor información espectral posible con los cambios significativos, como son los puntos isobésticos los cuales se muestra en la Figura 4.10. Por el lenguaje del programa no se menciona, ni el valor de pH ni la longitud de onda en la cual se tiene el valor de la absorbancia.

Se adiciona número de columnas (pH) y de filas (absorbancia), que se requieren para el cálculo.

Obteniendo un archivo de salida mostrando en la Figura 4.11, en donde se obtiene la matriz de absorbancia, matriz de errores, matriz reducida de absorbancias, matriz de propagación de error, los cuales conllevan al número más probable de especies químicas

que absorben radiación electromagnética a partir de las diferentes longitudes de onda alimentadas y al error utilizado.

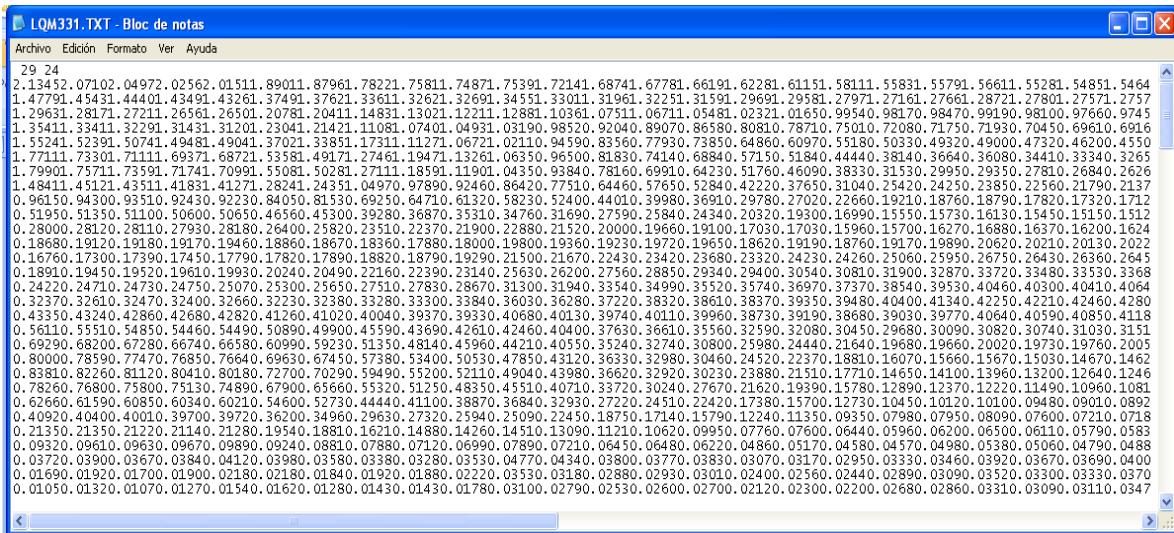


Figura 4.10 Datos de absorbancia para diferentes valores de pH y a diferentes longitudes de onda, para el compuesto LQM331

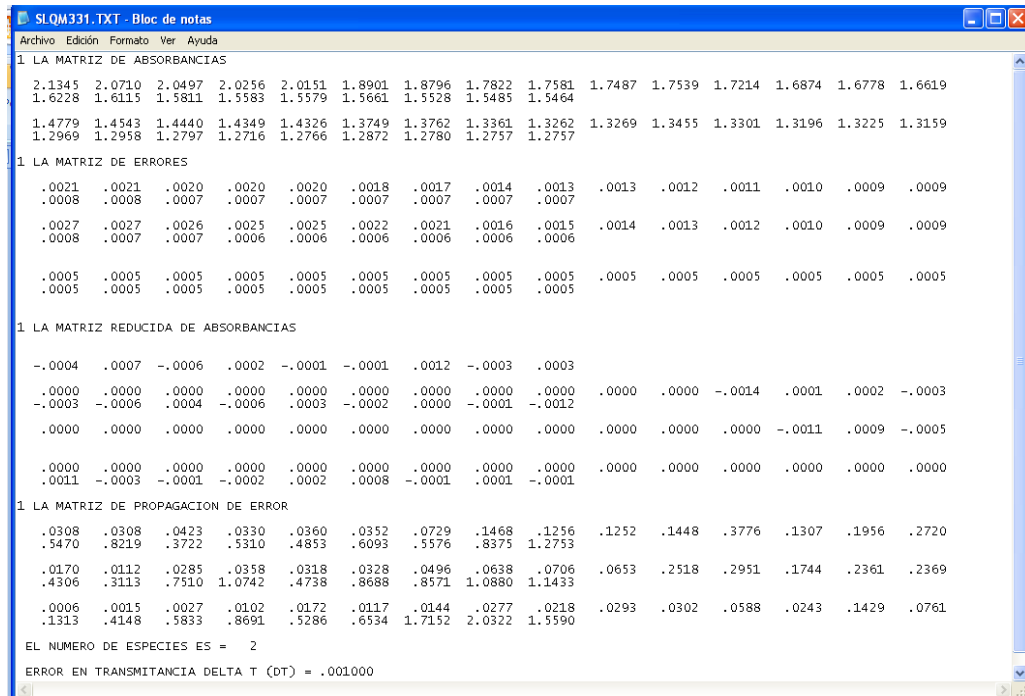


Figura 4.10 Resultados de TRIANG a partir de datos de absorbancia para el compuesto LQM331

Se realizaron corridas a diferentes valores de  $\Delta T$  con los mismos datos de absorbancias en todo el intervalo experimental ( $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$ ), se repita mayor número es la

solución. En la Tabla 4.2 para el ejemplo se observa que se presenta con mayor frecuencia es el número tres, para el compuesto LQM331. Por lo tanto se acepta que hay tres especies presentes en el sistema que absorben luz en forma diferente.

Esta información será de mucha ayuda al momento de proponer modelos para SQUAD, buscando el que mejor se adecúe a lo observado experimentalmente y que sean capaces de reproducir dichos resultados [Gómez, 2006].

Tabla 4.2. Resultados del programa TRIANG para estimar el número de especies que absorben luz, en forma diferente, para soluciones que contienen LQM331 a diferentes valores de pH.

$\Delta T$	Número de especies que absorben
0.001	2
0.002	3
0.003	3
0.004	3
0.005	3
0.006	3
0.007	3
0.008	3
0.009	2
0.01	2

## SIBYLA

Es un programa escrito en lenguaje Basic, que permite estimar el número de componentes en un sistema químico [Havel, 1990]

Para tal efecto se utiliza el análisis de factores FA, por sus siglas en inglés, o el análisis del componente principal (PCA) que son técnicas de estadística multivariante.

Las técnicas de PCA y FA se refieren al análisis de una matriz de datos **A** de  $m \times n$ , donde **A**, podría ser el conjunto de espectros de absorbancia, o cualquier otra observación, para cada valor de  $n$  (variable) de pH. Cada espectro puede ser entonces representado

como un punto en un espacio multidimensional. Tanto FA como PCDA, se ocupan de encontrar un sub-espacio dimensional  $p$  ( $p < n$ ) en el que el espectro pueda ser aproximadamente representado. La técnica provee tal subespacio donde se tiene el mejor ajuste por mínimos cuadrados para los datos cuando estos se proyectan en él. La meta principal es encontrar el valor más bajo de  $p$  de la matriz  $\mathbf{A}^T \mathbf{A}$  con los mayores eigenvalores correspondientes son tomados como vectores base y son llamados componentes principales (de aquí el nombre para PCA).

Por otra parte, PCA y FA sirven para propósitos sutilmente diferentes; mientras FA intenta expresar las observaciones como combinaciones lineales de nuevas variables, pequeñas en número, denominadas factores, PCA se utiliza únicamente para encontrar los factores candidatos y para determinar su número.

Partiendo de que el rango de una matriz de absorbancias se relaciona con el número de componentes del sistema, según ha sido demostrado en otros trabajos, entonces, suponiendo que se tiene una matriz  $\mathbf{A}$  de valores de absorbancia para  $n_w$  longitudes de onda de  $n_s$  muestras, donde se tiene  $n_c$  componentes que absorben en el intervalo elegido, la matriz puede escribirse como (4.14) donde  $\mathbf{E}$  es la matriz de absorptividades molares  $n_w \times n_c$  y  $\mathbf{C}$  es la matriz de concentraciones  $n_w \times n_s$ .

$$\mathbf{A} = \mathbf{E}\mathbf{C} \quad (4.14)$$

Además se puede decir para el rango de  $\mathbf{A}$  :

$$\text{Rango}(\mathbf{A}) = \min[\text{rango}(\mathbf{E}), \text{rango}(\mathbf{C})] \leq \min(n_w, n_c, n_s) \quad (4.15)$$

Entonces, se garantiza que  $n_w$  y  $n_s$ , sean iguales o mayores que  $n_c$ , se tiene que:

$$\text{Rango}(\mathbf{A}) \leq n_c \quad (4.16)$$

Y dado que el rango de la matriz es el orden del mayor determinante diferente de cero formado a partir de  $\mathbf{A}$ , o igual al número de columnas (o filas) linealmente independientes de  $\mathbf{A}$ , uno de los objetivos consiste en encontrar dicho determinante. Para el determinante existe el método descrito por Wallace y Katz [Wallace, 1964], que

involucra diagonalizaciones tanto de la matriz **A** como de la matriz error. Dicha aproximación es la que se utiliza también en el programa TRIANG.

Finalmente se menciona que en el caso de SIBYLA con FA, se utilizan varios criterios para estimar el rango, en particular el propuesto por [Kamkare J., 1970] que involucra los residuales de la desviación estándar de las absorbancias.

La manera de ingresar los datos es muy similar a TRIANG, obteniendo el número de especies que absorben, corroborando la información obtenida de TRIANG.

Para una mejor estimación de las constantes de equilibrio, se han creado programas computacionales para sistemas multirreaccionantes y multicomponentes. Estos programas varían de acuerdo al algoritmo matemático que emplean y a la información experimental que se les alimenta. Tienen la ventaja de realizar un estudio estadístico de la información resultante lo cual nos permite evaluar la calidad de los resultados obtenidos, además de poder estimar constantes de equilibrio en sistemas poco o nada cualitativos y en algunos casos, de especies polinucleares. Entre estos programas se encuentra SQUAD.

### **SQUAD (Stability QUotients from Absorbance Data)**

Es un programa creado por Leggett escrito en lenguaje FORTRAN. Está diseñado para refinar constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto, empleando la aproximación de mínimos de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferentes composiciones químicas del sistema. El modelo químico puede ser dependiente o independiente del pH.

Para cada valor de absorbancia

$$A_{i,k} = \sum_{j=1}^j [Especies]_{i,j} l \varepsilon_{i,k} \quad (4.17)$$

Donde  $[Especies]_{i,j}$  es la concentración de la especie  $j$ -ésima en la solución  $i$ -ésima (espectro),  $l$  es la longitud de paso óptico de la celda y  $\varepsilon_{i,k}$  es la absortividad molar de la  $j$ -ésima especie en la  $k$ -ésima longitud de onda.

El refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los residuos de absorbancia cuadráticos, por mínimos cuadrados no lineales, empleando el algoritmo de Gauss-Newton.

$$U = \sum_{i=1}^L \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2 \quad (4.18)$$

dónde: L= todas las soluciones. NW= todas las longitudes de onda,  $A_{i,k}^T$  = Absorbancia calculada por SQUAD en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.  $A_{i,k}^E$  = Absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

Para conocer los valores de absorbancia, SQUAD necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absortividad molar por especie y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo 0.001 unidades. Que el criterio anterior se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de constantes, debido a que se puede caer en el caso de una convergencia en un mínimo relativo.

SQUAD emplea distintos parámetros estadísticos para determinar si el modelo químico propuesto puede explicar la información experimental.

El parámetro de correlación; la desviación estándar sobre los datos de absorbancia ( $\sigma_{\text{datos}}$ ); la desviación estándar sobre las constantes ( $\sigma_{\text{const}}$ ); la desviación estándar total sobre las constantes ( $\sigma_{\text{Tot}}$ ); la suma de cuadrados de las absorbancias calculadas (U) y la desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar ( $\sigma_{\text{coef}}$ ), son todos los parámetros estadísticos [Leggett, 1985].

A continuación se muestra el archivo de entrada de SQUAD en el cual se requiere los siguientes datos: a) El número de equilibrios ácido-base presentes en el intervalo de pH, con sus respectivos valores de las constantes de equilibrio global, b) Las longitudes de onda del principio y al final del espectro y el intervalo de nanómetros para el que se va a presentar la información de absorbancia, donde se consideró que existe la mayor información espectral del sistema acerca del comportamiento ácido-base del compuesto c)

La concentración a la cual se encuentra el compuesto, d) Longitud de la celda y e) el valor de las absorbancias correspondientes a pH. Esta información representa hasta 23 espectros en función del pH.

Con ello SQUAD calcula entre otras cosas los valores de los coeficientes de absortividad y las constantes de equilibrio global.

```

Archivo Edición Formato Ver Ayuda
DICTIONARY:
LIG1=SAL; PROT=H; HYDX=OH:
END:
SPECIES:
SAL(1)H(1); 5.000; VB; VE:
SAL(1)H(2); 13.000; VB; VE:
END:
OTHER:
SAL; VE:
END:
DATA:
240.0      380.0      5.0

LOGB
PRIN
CARD
NNLS
PLOT 1
CRT
100
1.0
SPECTRA:
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 2.497      1.0
0.1386      0.1062      0.0743      0.0539      0.0525      0.0637      0.0812      0.1015
0.1224      0.1428      0.1627      0.1827      0.2020      0.2177      0.2272      0.2285
0.2182      0.2031      0.1822      0.1582      0.1332      0.1088      0.0870      0.0674|
0.0509      0.0373      0.0265      0.0183      0.0131
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 3.456      1.0
0.1389      0.1056      0.0730      0.0521      0.0502      0.0613      0.0787      0.0986
0.1198      0.1403      0.1606      0.1811      0.2003      0.2162      0.2258      0.2271
0.2209      0.2059      0.1852      0.1609      0.1365      0.1118      0.0903      0.0708
0.0548      0.0414      0.0310      0.0232      0.0165
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 3.913      1.0
0.1373      0.1041      0.0712      0.0505      0.0485      0.0593      0.0764      0.0961
0.1165      0.1368      0.1568      0.1772      0.1963      0.2121      0.2216      0.2227
0.2188      0.2041      0.1838      0.1602      0.1363      0.1123      0.0914      0.0727
0.0571      0.0445      0.0344      0.0272      0.0211
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 4.324      1.0
0.1415      0.1089      0.0768      0.0558      0.0538      0.0636      0.0796      0.0979
0.1172      0.1362      0.1556      0.1752      0.1941      0.2092      0.2183      0.2197
0.2129      0.1996      0.1805      0.1588      0.1365      0.1147      0.0956      0.0788
0.0650      0.0542      0.0459      0.0397      0.0341
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 4.641      1.0
0.1410      0.1095      0.0785      0.0582      0.0557      0.0650      0.0794      0.0960
0.1134      0.1311      0.1494      0.1683      0.1860      0.2006      0.2093      0.2106
0.2045      0.1929      0.1760      0.1567      0.1370      0.1179      0.1017      0.0875
0.0768      0.0683      0.0625      0.0583      0.0563
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 4.882      1.0
0.1400      0.1098      0.0802      0.0605      0.0577      0.0654      0.0778      0.0920
0.1073      0.1228      0.1394      0.1568      0.1735      0.1867      0.1947      0.1961
0.1923      0.1825      0.1689      0.1529      0.1370      0.1217      0.1091      0.0987
0.0915      0.0866      0.0837      0.0825      0.0813
0.00000000 0.00000000 0.00002444 0.00000000 5.238      1.0
0.1393      0.1121      0.0854      0.0672      0.0637      0.0689      0.0765      0.0853

```

Figura 4.11 Archivo típico de entrada del programa SQUAD del compuesto LQM324

## DETERMINACIÓN DE VALORES DE pKa Y MOVILIDADES EQUIVALENTES CON DATOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

Existen varias propiedades fisicoquímicas (o respuestas a una perturbación R) que en algunas ocasiones controladas, tiene un comportamiento lineal con las concentraciones de las especies que se producen. Esta linealidad puede ser descrita por la ecuación (4.19).

$$R_1 + R_2 + \dots + R_n = K_1 C_1 + K_2 C_2 + \dots + K_n C_n \quad (4.19)$$

Donde R es la respuesta general del sistema,  $R_i$ ,  $C_i$  y  $K_i$  son la contribución a la respuesta general, la concentración y el factor respuesta (el cual es independiente de las concentraciones de las especies y respuestas) de la especie i-ésima, respectivamente.

Si las especies están relacionadas a través de equilibrios químicos rápidos, la respuesta general puede ser entendida como una media ponderada del aporte de todas las especies presentes, equivalentes a las fracciones de las especies. [Rodríguez, 2009]

Por ejemplo en espectroscopía se tiene la ecuación de aditividad (3.21) en donde se muestra que la suma de absorbancia de cada especie o la suma de los coeficiente de la multiplicada por el ancho de la celda y por la concentración de cada especie, da como resultado la absorbancia total de la mezcla.

El mismo caso se presenta en ECZ, en la cual la suma de las movilidades electroforéticas efectivas de cada una de las especies eléctricamente cargada se obtiene la movilidad de la mezcla (ecuación (3.13)).

$$\mu = f_{L^-} \mu_{L^-} + f_{HL} \mu_{HL} + f_{H_2L^+} \mu_{H_2L^+} = \frac{[L^-]}{C_T} \mu_{L^-} + \mu_{HL} \frac{[HL]}{C_T} + \mu_{H_2L^+} \frac{[H_2L^+]}{C_T} \quad (4.20)$$

Dónde:  $\mu$  es la movilidad de la mezcla,  $\mu_{L^-}$  = movilidad correspondiente a la especie aniónica,  $\mu_{LH}$  = movilidad correspondiente a la especie eléctricamente neutra y  $\mu_{H_2L^+}$  = movilidad correspondiente a la especie catiónica.



## **CÁLCULO DE DATOS Y ESTIMACIÓN DE LOS VALORES DE pKa's POR ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT (ACD/pKa).**

Se han desarrollado métodos para la determinación de constantes de equilibrio mediante cálculos semiempíricos que parten de la simulación de un comportamiento o tendencia para una serie de compuestos, obtenida originalmente de información experimental. En la actualidad se dispone comercialmente del programa ACD/pKa, el cual realiza un análisis estadístico profundo, calculando predicciones precisas, basándose en la modelización de los parámetros químicos y biológicos, fundamentándose en la predicción de las propiedades moleculares y la medición del grado de disociación del compuesto en solución. Cuenta con la información de 14000 estructuras y dos bases de datos de referencia, 31000 valores de pKa experimentales, los cuales son de aproximadamente 16000 compuestos en soluciones acuosas y 2000 de compuestos en soluciones no acuosas. Realizando el cálculo en condiciones de 25 °C y fuerza iónica de cero en soluciones acuosas para cada grupo.

Calcula los valores de pKa, comparando los segmentos, estructuras o grupos semejantes para una molécula dada, con su base de datos. [Sierra, 2002]

## **DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA**

El coeficiente de partición de un compuesto es la porción de concentración de un solvente en una fase orgánica y en una fase acuosa cuando el sistema está en equilibrio y el logaritmo del coeficiente de partición entre octanol y agua es a menudo usado como una medida para la hidrofobicidad del compuesto. El valor del LogP es uno de los parámetros comúnmente utilizados en fisicoquímica de fármacos, y sirve para tener una expectativa de la bioactividad y absorción del diseño de la molécula y el análisis de la relación cuantitativa de la estructura-actividad. Esto puede ser utilizado para predecir la permeabilidad de la biomembrana, la transportación y la bioacumulación en el organismo del compuesto químico.

El coeficiente de partición experimental se calcula en función de la fracción de extracción, la cual se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$E_{LQM_O} = \frac{[LQM]_O}{[LQM]_{O,INICIAL}} \quad (4.21)$$

dónde:  $E_{LQM_O}$  = fracción de extracción,  $[LQM]_O$  = Concentración del compuesto LQM después de la extracción en la fase orgánica,  $[LQM]_{O, INICIAL}$  = Concentración del compuesto LQM antes de la extracción ( fase orgánica).

Y el coeficiente de partición dependiente de la fracción de extracción

$$\text{LogP} = \text{Log} \left[ \frac{1}{r} \left( \frac{E_{LQM_O}}{1-E_{LQM_O}} \right) \right] \quad (4.22)$$

dónde LogP es el logaritmo del coeficiente de partición,  $r$  es el cociente de las cantidades de fase

## MATERIAL Y EQUIPO

📖 Agua desionizada	📖 Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda
📖 n-octanol	900
📖 LQM324	📖 Embudo de separación
LQM330	📖 Electrodo combinado de vidrio con
LQM331	referencias internas Ag/AgCl <sub>(s)</sub> conectado a un
LQM334	potenciómetro TACUSSEL, LPH430T.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.- Curva de calibración: se preparan cinco soluciones octanólicas de diferente concentración, para preparar una curva de calibración espectrofotométrica a la longitud de cualquiera de los máximos del espectro de absorción de cada uno de los compuestos de LQM.

2.- Extracción líquido-líquido: Se presaturan los volúmenes totales de octanol y agua desionizada que se usarían durante todos los experimentos. Se mezclan 10 mL de una solución octanólica del LQM de concentración intermedia de acuerdo a la curva de

calibración correspondiente, con 90 mL de agua desionizada, agitando vigorosamente para equilibrar ambas fases. Las extracciones de cada compuesto se hacen por triplicado.

3.- Determinación de LogP: Al separar la fase acuosa se leyó la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción del compuesto LQM. La concentración de equilibrio del LQM en la fase octanólica se obtuvo por interpolación en la curva de calibración. La concentración del equilibrio del LQM en la fase acuosa se obtuvo por diferencia de la cantidad de sustancia inicial del LQM en el sistema de extracción menos la cantidad de sustancia de dicho compuesto en la fase octanólica, dividiendo entre el volumen de la fase acuosa.

### **CÁLCULO DE LOS VALORES DE pKa POR MÉTODOS DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL**

Los cálculos de los valores de pKa de los LQM estudiados en este trabajo de tesis se realizaron con el paquete computacional Gaussian 03 [Frisch, 2004]. Donde primero se modelaron los puntos estacionarios en la fase gas (al vacío), y los cálculos de los efectos del solvente se incluyeron a posteriori por un cálculo de un punto simple, utilizando un modelo del continuo polarizable (PCM), específicamente el formalismo de la ecuación integral (IEF-PCM), [Cances, 1997, Mennucci, 1997a, Mennucci, 1997b y Tomasi, 1997], utilizando agua como disolvente ( $\epsilon = 78.39$ ). En los cálculos de PCM, la elección de la cavidad del soluto es importante porque las energías y las propiedades calculadas dependen fuertemente del tamaño de la cavidad. En el presente trabajo de tesis, la cavidad ha sido construida sistemáticamente por el modelo de átomos unidos de Hartree-Fock (UAHF), [Barone, 1997]. El cuál es el método recomendado para la predicción de energías libres de solvatación, [Frisch, 2001].

Las energías libres de Gibbs relativas en solución, se calculan usando la ley de Hess y ciclos termodinámicos, incluyendo específicamente las energías libre de Gibbs de Solvatación ( $\Delta G_s$ ).

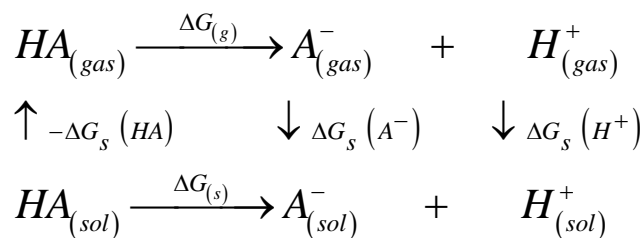


Figura 4.12. Ciclo termodinámico para el cálculo de los valores de pKa.

La energía libre de Gibbs de reacción en solución ( $\Delta G_{sol}$ ), se puede obtener como la suma de la energía libre de Gibbs de reacción al vacío ( $\Delta G_{gas}$ ) y la diferencia en las energías libres de solvatación ( $\Delta\Delta G_s$ ) ecuación 4.23.

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{gas} + \Delta\Delta G_s \quad (4.23)$$

dónde:  $\Delta\Delta G_s$  y  $\Delta G_{gas}$ , son calculadas como:

$$\Delta\Delta G_s = \Delta G_s(A^-) + \Delta G_s(H^+) - \Delta G_s(HA) \quad (4.24)$$

$$\Delta G_{gas} = \Delta G_{gas}(A^-) + \Delta G_{gas}(H^+) - \Delta G_{gas}(HA) \quad (4.25)$$

En todos los casos el estado de referencia es 1 M. Para los ciclos que implican protones, se han obtenido valores de los  $\Delta G_{gas}(H^+)$  y  $\Delta G_s(H^+)$  de datos experimentales. Esta idea es basada sobre el enfoque de que los métodos computacionales reproducen pobremente la energía libre de solvatación del protón y que se ha utilizado con éxito por diferentes autores.[Brown, 2006 y Llano,2002]

Se ha utilizado  $\Delta G_{gas}(H^+) = -6,28 \text{ kcal/mol} = -26,28 \text{ kJ/mol}$  y  $\Delta G_s(H^+) = -264,61 \text{ kcal/mol} = -1107,13 \text{ kJ/mol}$ . Este procedimiento ha sido previamente utilizado con gran éxito en el cálculo de los valores pKa. [Liptak, 2001, Liptak, 2002, Palascak, 2004, Murlowska, 2005 y Brown, 2006].

Las energías libres de Gibbs acuosas para las reacciones de desprotonación son a su vez utilizados para calcular la constante de equilibrio ( $K_a$ ), que está dada por la ecuación 4.

$$K_a = e^{-\Delta G_{sol}/RT} \quad (4.26)$$

Y usando la definición de pKa.

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (4.27)$$

Diferentes niveles de la teoría han sido probados, dentro de este esquema, para LQM331 (R= H). Los resultados se muestran en la Tabla 4.3.

Para elegir un nivel de la teoría en el cálculo de  $\Delta G_s$ ,  $\Delta G_{gas}$  se calculó la mayor precisión posible (CBS-QB3). Como se mostró en la Tabla 4.3, cuando las energías de solvatación se obtienen utilizando el funcional B3LYP en lugar del funcional HF surge un error grande para el segundo pKa. Este es un hallazgo lógico ya que el método UAHF se ha optimizado para HF/6-31G (d). [Barone, 1997]. Debido al tamaño de los sistemas estudiados en este trabajo, una alternativa computacionalmente menos costosa fue probada para calcular  $\Delta g_{gas}$ : B3LYP/6-311++G (d, p). A pesar de que el error en el primer pKa es mayor que en el cálculo de  $\Delta g_{gas}$  con CBS-QB3, el error en el segundo es menor, lo que lleva al menor error promedio entre todos los métodos probados.

Tabla 4.3. Desviación de los valores de pKa calculados con base en los valores experimentales para el sistema LQM331 y diferentes métodos de cálculo.


$\Delta G_{gas}$	$\Delta G_{gas}$	pKa <sub>1</sub> (SE)*	pKa <sub>2</sub> (SE)*	MUE <sup>+</sup>
CBS-QB3	PCM/HF/6-31+G(d,p)	10.28(1.39)	11.57 (1.18)	1.29
CBS-QB3	PCM/HF/6-311++G(d,p)	10.19 (1.30)	11.51 (1.12)	1.21
CBS-QB3	CPCM/HF/6-31+G(d,p)	10.38 (1.49)	11.50 (1.11)	1.30
CBS-QB3	CPCM/HF/6-311++G(d,p)	10.28 (1.39)	11.44 (1.05)	1.22
CBS-QB3	CPCM/B3LYP/6-311++G(d,p)	9.84 (0.95)	14.91 (4.52)	2.74
B3LYP/6-311++G(d,p)	CPCM/HF/6-311++G(d,p)	10.49 (1.60)	10.54(0.15)	0.88


\*Error con signo, SE por sus siglas en inglés + Error promedio sin signo, MUE SE por sus siglas en inglés


Con base en estos resultados los valores de pKa para todos los demás compuestos se calcularon usando el último enfoque, es decir, la geometría s y los cálculos de frecuencia, se realizaron en el el nivel de la teoría B3LYP/6-311++G (d, p), seguido de cálculos CPCM de punto simple con el nivel HF/6-311++G (d,p), seguido de cálculos CTCP de un solo punto en el plano HF/6-311++G (d, p) para obtener los valores de  $\Delta G_s$ .

## ESTIMACIÓN DE VALORES DE LogP POR MÉTODOS COMPUTACIONALES QUE RELACIONAN PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS CON PARÁMETROS MOLECULARES

Una forma de estimar el coeficiente de partición es por medio de programas computacionales, como los que se describen a continuación.


 **ACD/LogP** proporciona una estimación del valor del coeficiente de partición octanol-agua para una amplia gama de compuestos neutros normales, a 25°C. Los cálculos se proporcionan con intervalos de confianza del 95 %, por medio de la revisión del factor de bioconcentración y el coeficiente de absorción. El algoritmo que utiliza para calcular el LogP de un compuesto es por la suma de sus fragmentos (Valores de LogP de fragmentos individuales se obtienen experimentalmente y/o determinados estadísticamente) y por medio de la regla de los 5 parámetros.

 **Virtual Computational Chemistry Laboratory:** Este programa proporciona la predicción interactiva de LogP de compuestos para el diseño de fármacos y estudios ambientales de la química. Mediante el programa ALOGPS 2.1, la estimación de LogP entre Octanol/agua se desarrolló con una base de datos de 12,908 moléculas. Además de los ALOGPS 2.1 LogP y logW también muestra los valores calculados con Pharma Algoritmos LogP, los registros de Actelion LogP y el pKa, así como los registros de LogP Molinspiration, KOWWIN LogP, ALOGP (Viswanadhan et al, 1989), MLOGP (Moriguchi et al, 1992) implementado en el software DragonX, XLOGP2 y programas XLOGP3 y calculadora ChemAxon LogP.

 **Molinspiration cheminformatics:** es una organización de investigación independiente centrada en el desarrollo y aplicación de técnicas quimioinformática moderna, especialmente en relación con Internet. Este software calcula lo que él llama miLogP. El método para la predicción de LogP Molinspiration (miLogP2.2 noviembre de 2005). se basa en contribuciones de los grupos. Éstos han sido obtenidos mediante el ajuste de LogP y LogP experimentales, los cuales forman una base de datos de más de doce mil, en su mayoría moléculas como fármacos. De esta manera se han obtenido, los valores de hidrofobicidad para 35 pequeños fragmentos básicos, así como los valores de 185 fragmentos de mayor tamaño, que caracteriza la contribución de enlace de hidrógeno

intramolecular a las interacciones LogP y carga. La metodología de Molinspiration para el cálculo LogP es muy robusto y es capaz de procesar prácticamente todas las moléculas orgánicas y moléculas organometálicas.

El 50.5% de las moléculas LogP se predice con un error  $<0.25$ , el 80.2% con un error  $<0.5$  y el 96,5% con un error  $<1.0$ . Sólo el 3,5% de las estructuras LogP se prevé con el error  $> 1.0$ . Los parámetros estadísticos que figuran por encima de rango, por ende Molinspiration miLogP como uno de los mejores métodos disponibles para la predicción LogP.

 **SRC:** Es una empresa cuya finalidad es la predicción de perfiles químicos, la cual ha desarrollado muchas nuevas metodologías para satisfacer las necesidades actuales. El programa KowWin realiza estimaciones del coeficiente de partición octanol-agua (LogP) de productos químicos usando la contribución de fragmentos de átomos.

## CAPITULO V.- PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### PRUEBAS DE ESTABILIDAD

El estudio de estabilidad sobre los cuatro compuestos se llevarón a cabo por medio de un análisis espectrofotométrico de sus soluciones acuosas (básica y ácida) en función del tiempo. Cabe señalar que al compuesto no se le protegió de la luz, ni del aire, ni se amortiguó el pH debido a posibles interacciones con el sistema de estudio.

En la figura 5.1 se muestra el comportamiento espectral del compuesto LQM324 a distintos tiempos, tiene como objetivo obtener el intervalo de trabajo (ya que se mide tanto los espectros de absorción como el pH a la misma temperatura a diferentes tiempos), en el cual se realizarán valoraciones ácido-base, sin que se descomponga el compuesto tanto en solución ácida como básica.

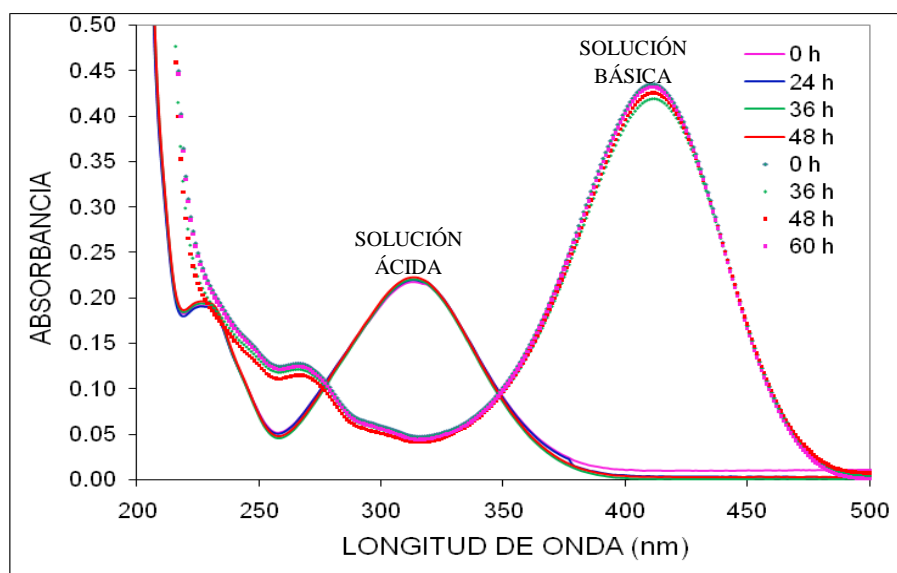


Figura 5.1: Espectro de absorción del LQM324 a diferentes tiempos para: solución ácida  $2.65 \times 10^{-5} \text{M}$  (Líneas continuas) y solución básica  $2.21 \times 10^{-5} \text{M}$  (marcadores).

En los espectros anteriores se observa poca variación en la absorbancia en función del tiempo. Para una mejor perspectiva se realizan los gráficos mostrados a continuación en donde se seleccionan tres longitudes de onda y se gráfica su absorbancia en función del tiempo, primeramente para la solución ácida en la Figura 5.2 y posteriormente para la solución básica (Figura 5.3), Estas pruebas se realizaron para todos los compuestos LQM.



## SOLUCIONES ÁCIDAS

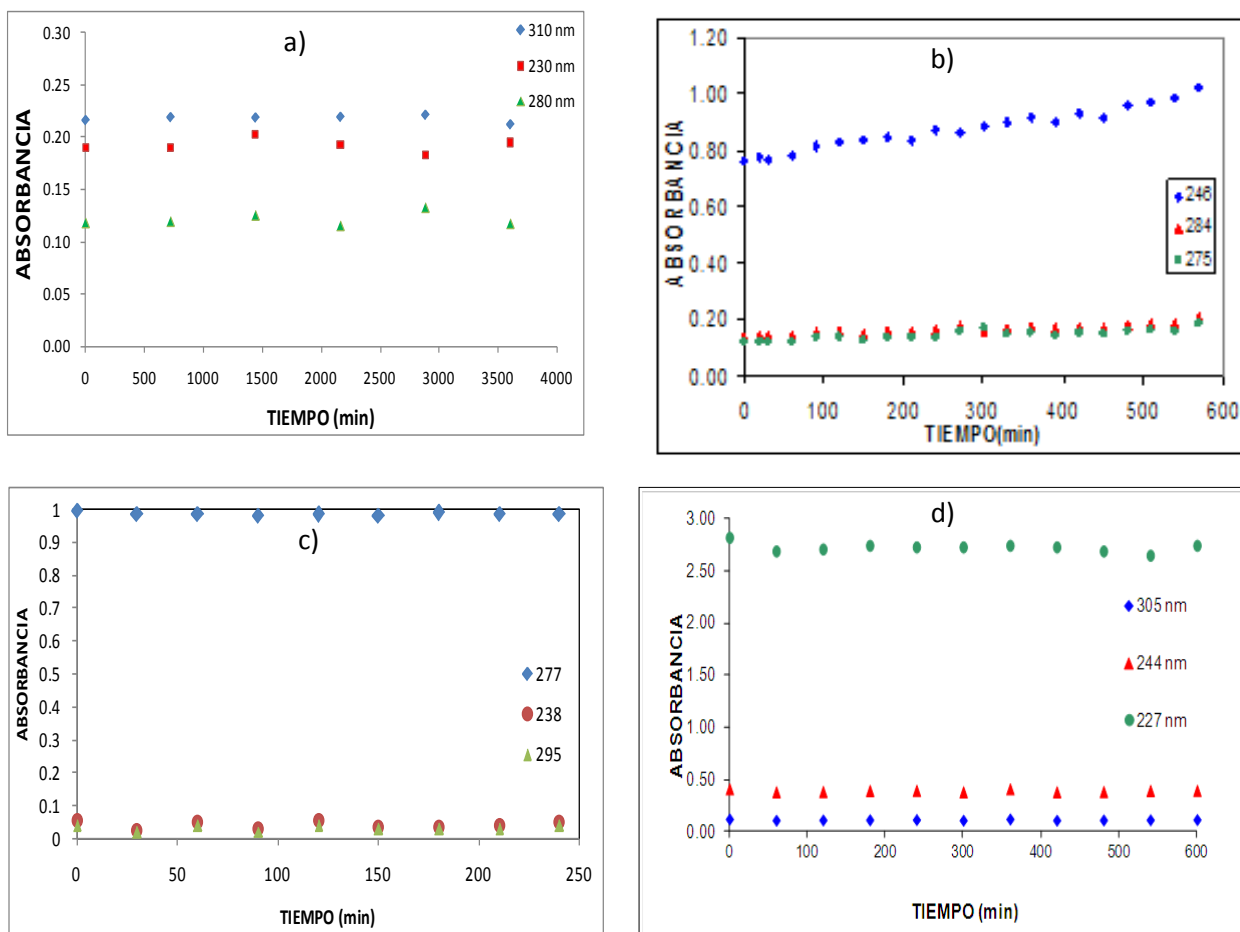


Figura 5.2. Absorbancia dependiente del tiempo de las soluciones ácidas de los compuestos LQM: a) LQM324 a  $2.65 \times 10^{-5} \text{M}$ , b) LQM330 a  $4.52 \times 10^{-5} \text{M}$ , c) LQM331 a  $1.9 \times 10^{-5} \text{M}$  y d) LQM334 a  $8.45 \times 10^{-5} \text{M}$

Los compuestos LQM324 y LQM331, presentan una mayor estabilidad comparada con LQM330 Y LQM334. Se observa que en el compuesto que contiene al grupo Br, se precipita lentamente después de algunas horas.

## SOLUCIONES BÁSICAS

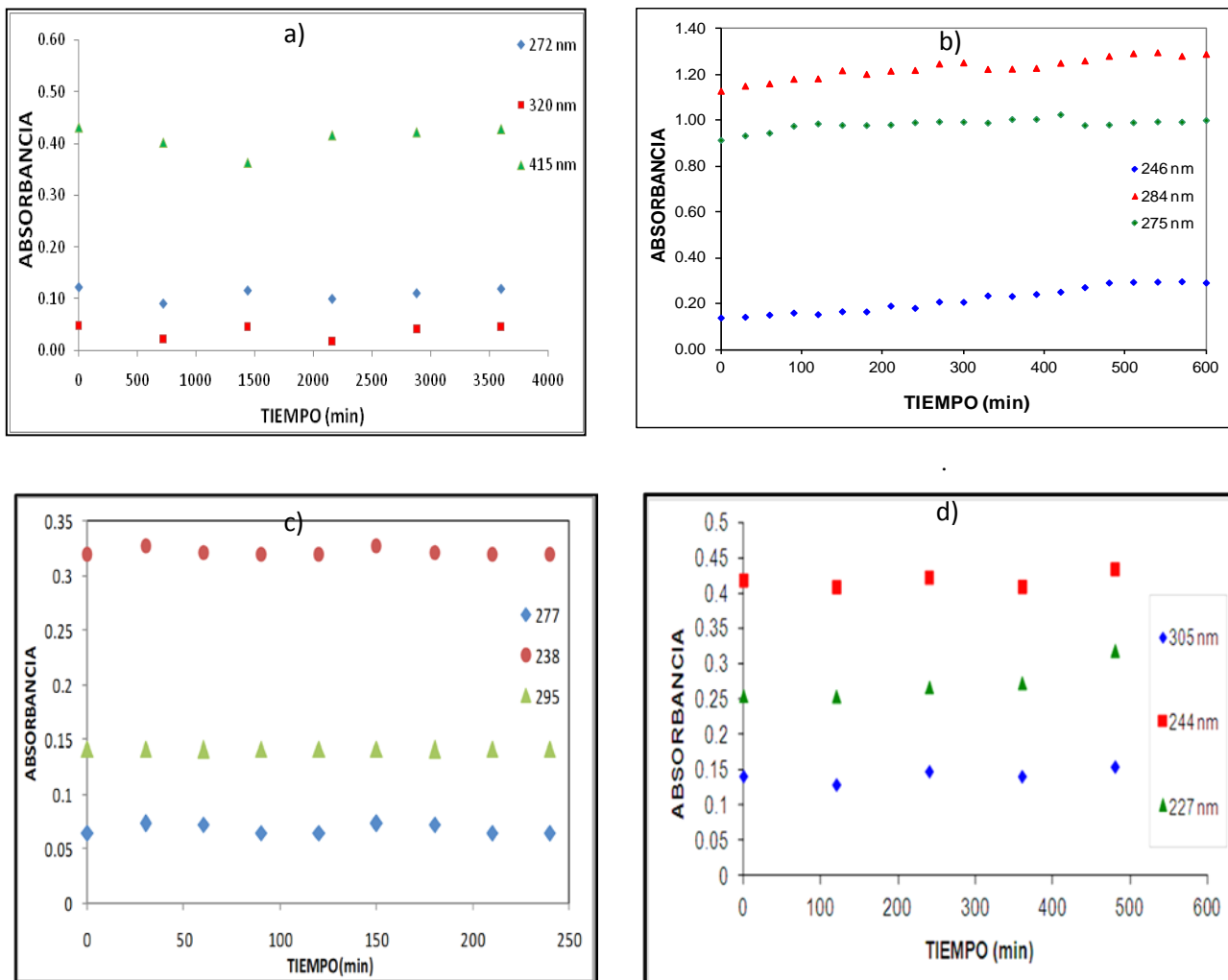


Figura 5.3 Prueba de estabilidad de los compuestos LQM para las soluciones básicas: a) LQM324 a  $2.21 \times 10^{-5} \text{M}$ , b) LQM330 a  $4.89 \times 10^{-5} \text{M}$ , c) LQM331 a  $1.03 \times 10^{-5} \text{M}$  y d) LQM334 a  $6.78 \times 10^{-5} \text{M}$ .

Para realizar los experimentos se tomaron en cuenta los intervalos de tiempo en el cual las soluciones son estables y en otros casos se utilizaron soluciones frescas

Las pocas variaciones de las absorbancias tanto en la solución ácida y básica, se le atribuyen a que el pH no se amortiguó, mostrando que no tienen un cambio tan radical al exponerlos a la luz y el aire.

## VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE

Una vez obtenidas las concentraciones de trabajo y el conocimiento de que las soluciones tanto ácidas como básicas no se descomponen (al menos en el tiempo de experimentación), se realizan las valoraciones espectrofotométricas. Primero se llevan a cabo utilizando como titulante la solución básica, para incrementar con ello el pH y después se parte de una solución básica y se titula con la solución ácida.

A continuación, en la Figura 5.4 se muestran los conjuntos de espectros más representativos de los cuatro compuestos LQM. Para el compuesto LQM324, se observa que es el único que tiene respuesta en el intervalo del visible, debido a que existe una resonancia entre los electrones del anillo del fenol y el grupo nitró, que proporciona el color amarillo al compuesto.

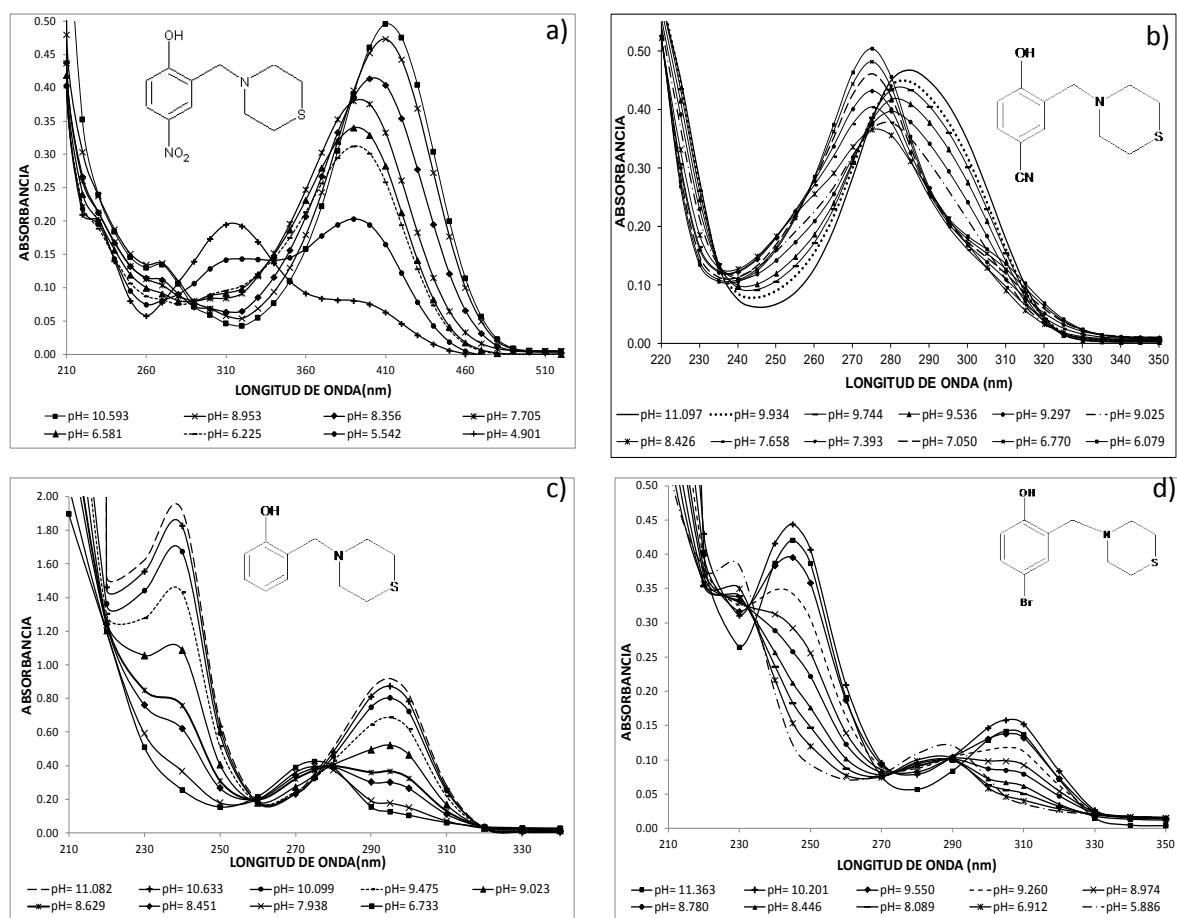
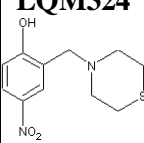
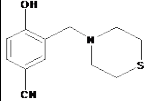
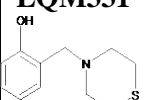
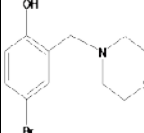


Figura 5.4: Espectros de absorción de los compuestos LQM a) LQM324 a  $2.44 \times 10^{-5}$  M, b) LQM330 a  $4.61 \times 10^{-5}$  M, c) LQM331 a  $4.78 \times 10^{-5}$  M, d) LQM334  $3.85 \times 10^{-5}$  M

En la Tabla 5.1, se presenta un resumen de los aspectos más relevantes que se observan en la figura 5.4.

Tabla 5.1: Resumen de comportamiento espectral de los LQM

LQM	Intervalo de pH	Absorbancia Máxima	Comportamiento	Puntos Isobésticos
<b>LQM324</b> 	2.079 -11.311	271 nm 315 nm 392 nm 413 nm	<b>Aumento de pH</b> *Hiperocrómico en 392 nm *Hipocrómico en 315 nm *Hipocrómico en 413 nm *Hipsocrómico hasta 390 nm	272 nm 290 nm 340 nm 388 nm
<b>LQM330</b> 	2.079-11.097	247 nm 274 nm 284 nm	<b>Aumento de pH</b> *Hiperocrómico en 275 nm *Hiperocrómico en 284 nm, en un intervalo de pH 6.0 a 8.5 *Hipsocrómico hasta 274 nm en un intervalo de pH 8.4 a 11.0 *Hipocrómico en 247 nm	254 nm 258 nm 272 nm 320 nm
<b>LQM331</b> 	6.612-11.082	238 nm 295 nm	<b>Aumento de pH</b> *Hiperocrómico en 238 nm y 295 nm *Hipocrómico en 277 nm	279 nm 259 nm
<b>LQM334</b> 	5.752-11.124	227 nm 245 nm 288 nm 305 nm	<b>Aumento de pH</b> *Hiperocrómico en 227 nm y 288 nm *Hipocrómico en 245 nm y 305 nm	232 nm 256 nm 292 nm

Como puede observarse, existen puntos isobésticos en la familia de espectros de absorción, lo que indica que al menos existe un equilibrio ácido-base en cada uno de los sistemas. Por lo tanto, en el intervalo de pH de los experimentos correspondientes a la Figura 5.4 y a la Tabla 4.1, existe al menos un valor de pKa.

De estos datos se seleccionan las longitudes de onda más representativas de los espectros, (por ejemplo, en donde se presentan mayores valores de absorbancia) de cada una de las familias de espectros de la Figura 5.4. Se espera el comportamiento de curvas de

absorbancia como función del pH de tipo sigmoide para cada valor de pKa presente en el sistema, evidencia de que existe un equilibrio ácido-base.

Los cambios de absorbancia con respecto al pH, a partir de los resultados espectrales obtenidos, para diferentes longitudes de onda se muestran en la Figura 5.5.

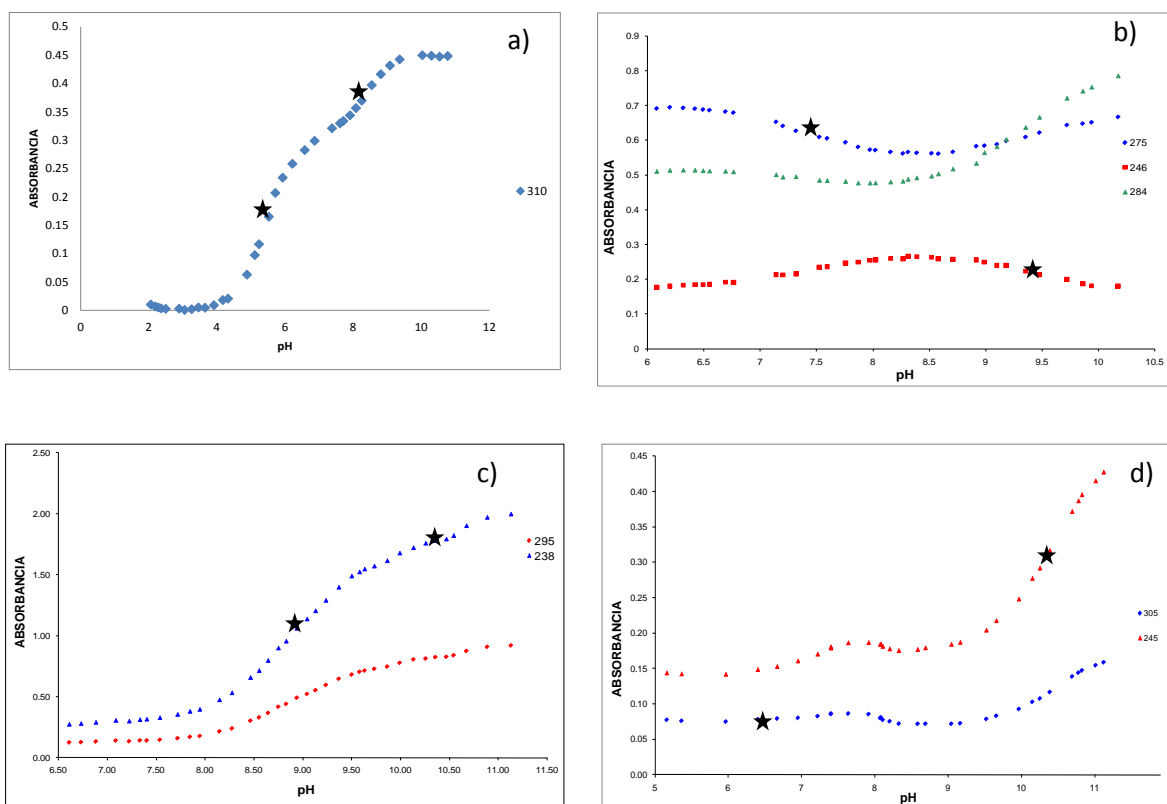


Figura 5.5: Absorbancia vs pH a partir de los compuestos LQM a diferentes longitudes de onda: a) LQM324 a  $2.44 \times 10^{-5}$  M, en 310 nm. b) LQM330 a  $4.53 \times 10^{-5}$  M, en 275 nm, 246 nm y 284 nm. c) LQM331 a  $9.689 \times 10^{-5}$  M, 238 nm, 295 nm. d) LQM334 a  $3.85 \times 10^{-5}$  M, en 305 nm y 245 nm

En las curvas de la Figura 5.5 se hacen evidentes dos tendencias sigmoide para cada uno de los compuestos (en unos casos es más evidente que en otros), lo que indica la presencia de dos equilibrios ácido-base. Los marcadores de estrella en las imágenes, representa los posibles valores de pKa, basados en la forma de las gráficas.

## MÉTODO GRÁFICO CON DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Se realiza el cálculo de pKa por el método gráfico, obteniendo resultados como los que se muestran en la Figura 5.6, la cual pertenece al LQM324.

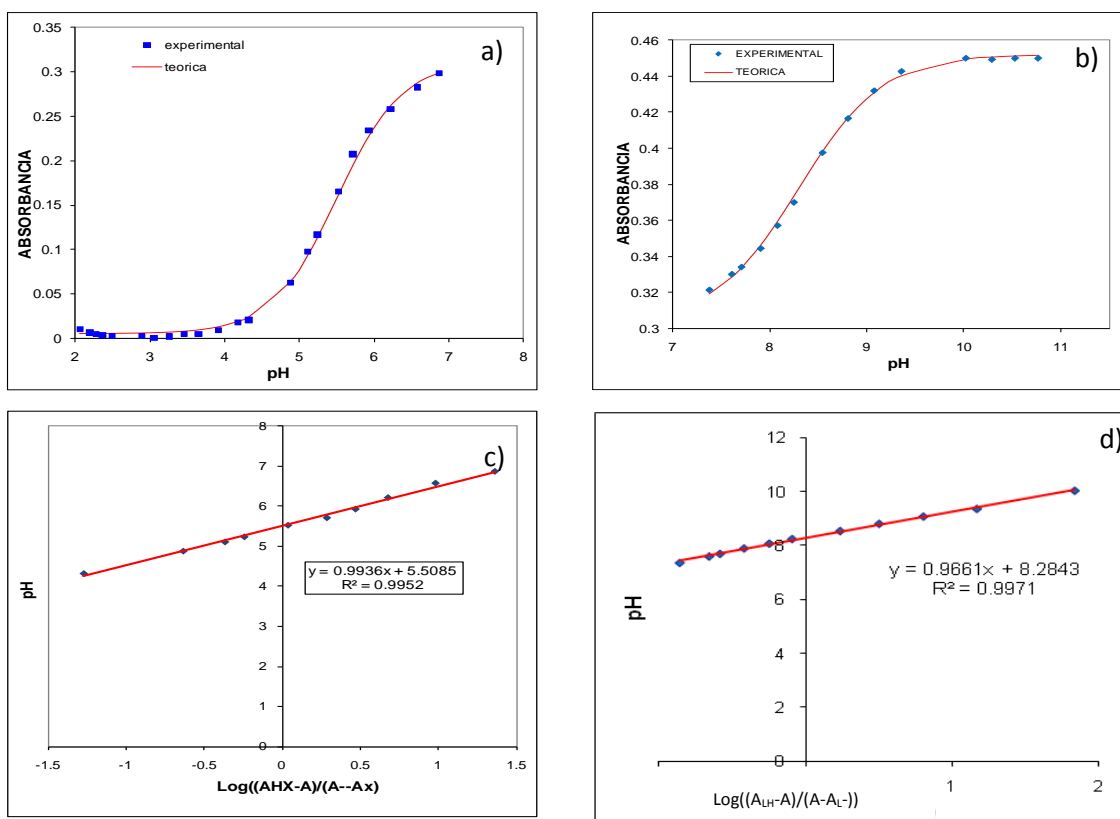


Figura 5.6: Método gráfico del compuesto LQM324. Absorbancia vs pH teórica (lineal) y experimental (marcadores), para intervalos de pH: a) 2 a 7 y b) pH de 7 a 10.7, con sus respectivas regresiones lineales c) y d)

De igual manera se obtienen los valores de pKa de los cuatro LQM mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 5.2: Valores de pKa. Calculados por el método gráfico.

COMPUESTO	PENDIENTE	ORDENADA AL ORIGEN (pKa)
LQM324	0.993±0.056	5.509±0.043
	0.966±0.043	8.284±0.358
LQM330	1.063±0.197	7.254±0.160
	0.998±0.052	9.685±0.254
LQM331	1.002±0.018	8.920±0.162
	1.003±0.056	10.393±0.064
LQM334	0.978±0.418	6.541±0.335
	1.023±0.129	9.354±0.086

Todas las pendientes son estadísticamente la unidad indicando que es un buen ajuste entre los valores teóricos y experimentales, encontrando dos valores de pKa para cada uno de los cuatro LQM en el intervalo de pH estudiado.

### ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE ESPECIES QUE ABSORBEN LUZ

El método gráfico muestra que existen tres especies que absorben luz, o que se encuentran presentes en cada uno de los LQM; es por ello que antes de utilizar el Programa computacional SQUAD, se determina el número de especies que existen, para lo cual se utilizan TRIANG y SYBILA.

En la tabla 5.3 se presentan los resultados de TRIANG en los cuales, se propone un error de las lecturas de absorbancia, teniendo como resultado el número de especies que absorben luz, esto se basa a que a medida que se va incrementando el error, el número de especies cambia y el número de especies que más se repite, es el número correcto de especies presentes.

Tabla 5.3: Número de especies presentes para cada uno de los LQM mediante el programa TRIANG de acuerdo a los resultados experimentales.

$\Delta T$	LQM324	LQM330	LQM331	LQM334
0.001	5	5	2	5
0.002	5	5	3	4
0.003	5	5	3	3
0.004	4	4	3	3
0.005	3	4	3	3
0.006	3	3	3	3
0.007	3	3	3	3
0.008	3	3	3	3
0.009	3	3	3	2

Teniendo como resultado que el número de especies que más se repite es tres, lo que se puede proponer que la molécula tiene dos desprotonaciones esto se corrobora con el

resultado de SIBYLA, en el cual en todos los LQM mostró tres especies presentes en el sistema, con una desviación estándar de 0.002.

Con base en este resultado y en el del método gráfico, se utiliza SQUAD proponiendo el modelo de uno y de dos equilibrios, en donde el refinamiento con dos equilibrios tendría que ser el mejor, debido a que en el existen tres especies presentes en el sistema, como los estudios anteriores han demostrado.

### **DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ CON DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y SQUAD**

Los datos experimentales se alimentan para el refinamiento de las constantes de acidez. Así se introdujeron 23 espectros de absorción a diferentes valores de pH con intervalos de longitud de onda de  $\lambda=5$  nm, indicándose el intervalo de pH estudiado para cada uno de los compuestos LQM, Se tomaron los modelos de uno y de dos equilibrios ácido-base para que mediante criterios estadísticos se concluya cuantas constantes de equilibrio global ( $\text{Log } \beta$ ) existen para cada uno de los modelos en ese intervalo de pH con sus respectivos parámetros (Tabla 5.4).

SQUAD, calcula varios parámetros estadísticos para que se tome la decisión de cuál de los dos sistemas es el más factible. Al observar la Tabla 5.4 observamos que la desviación total para cada constante en el sistema de dos equilibrios es menor en los compuestos LQM, con excepción al 330 y 334. Sin embargo en todos los casos la suma de los cuadrados y la desviación estándar total es menor. Esto, aunado a lo descrito con TRIANG Y SIBYLA y a la estructura molecular de los compuestos.

Ahora en la Tabla 5.5 se muestran los valores de pKa, para los compuestos LQM, por medio del método gráfico y SQUAD, para poderlos comparar.



Tabla 5.4: Constantes de formación para los compuestos LQM determinadas para diferentes modelos químicos con el programa SQUAD.  $\sigma_{const}$ = desviación estándar total sobre las constantes; U= Suma de los cuadrados de las absorancias calculadas.

<b>LQM324</b>					
<b>Modelo</b>	<b>Intervalo de pH</b>	<b>Log <math>\beta</math></b>	<b>pKa</b>	<b><math>\sigma_{Total}</math></b>	<b>U</b>
1 EQUILIBRIO $H_2(LQM324)^+ \leftrightarrow H(LQM324)$	2.079 a 10.665	5.464	5.464±0.006	6.38x10 <sup>-3</sup>	3.82x10 <sup>-2</sup>
2 EQUILIBRIOS $H_2(LQM324)^+ \leftrightarrow H(LQM324)$		8.412	8.412±0.001	4.82x10 <sup>-3</sup>	2.18x10 <sup>-2</sup>
$H(LQM324) \leftrightarrow (LQM324)^-$		13.862	5.450±0.001		
<b>LQM330</b>					
1 EQUILIBRIO	6.079-11.097	9.388	9.388±0.025	1.71x10 <sup>-2</sup>	2.44x10 <sup>-1</sup>
2 EQUILIBRIOS		9.380	9.380±0.004	2.19x10 <sup>-3</sup>	8.31x10 <sup>-3</sup>
		16.820	7.437±0.008		
<b>LQM331</b>					
1 EQUILIBRIO	7.086-10.886	8.945	8.945±0.004	1.23x10 <sup>-2</sup>	9.6x10 <sup>-2</sup>
2 EQUILIBRIOS		10.391	10.391±0.075	7.34x10 <sup>-3</sup>	3.37x10 <sup>-2</sup>
		19.281	8.890±0.009		
<b>LQM334</b>					
1 EQUILIBRIO	5.800-10.200	9.283	9.283±0.015	9.04x10 <sup>-3</sup>	7.02x10 <sup>-2</sup>
2 EQUILIBRIOS		9.261	9.261±0.009	4.55x10 <sup>-3</sup>	1.91x10 <sup>-2</sup>
		16.099	6.421±0.032		

Se observa que el modelo para dos equilibrios es el óptimo. La diferencia entre los valores de pKa de ambos métodos, es menor al 2%, mientras que para el pKa de LQM330 es menor de 3.3 %, lo que significa que hay una buena aproximación entre ambos métodos.

Tabla 5.5. pKa de los compuestos LQM por medio del método gráfico comparado con SQUAD con espectrofotometría UV-Visible

NOMBRE	MÉTODO GRÁFICO		SQUAD	
	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
LQM324	5.509±0.043	8.284±0.358	5.450±0.001	8.412±0.001
LQM330	7.254±0.160	9.685±0.254	7.437±0.008	9.380±0.004
LQM331	8.920±0.162	10.393±0.064	8.890±0.110	10.391±0.075
LQM334	6.541±0.335	9.354±0.086	6.421±0.0317	9.261±0.009

### DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

Para corroborar los valores de pKa, también se obtuvieron mediante ECZ para ambos métodos, el método gráfico y por SQUAD

Se llevaron a cabo experimentos para calcular, las movilidades electroforéticas por triplicado y con valores de pH no mayores a 0.2 unidades, obteniendo curvas sigmoideas (Figura 5.7), lo cual indica que al menos hay un equilibrio ácido-base, esto para cada uno de los compuestos LQM. Las movilidades electroforéticas efectivas se presenta en la Figura 5.7, de cada uno de los compuestos LQM, en función del pH. Muestra La información obtenida de este estudio indica que existen tres especies: aniónica (movilidades electroforéticas son negativas), catiónica (movilidades electroforéticas positivas) y neutra (movilidades electroforéticas de cero), las cuales prevalecen en distintos intervalos de pH. Por lo tanto se utilizan los métodos gráfico y SQUAD para obtener los valores de pKa.

Todos los compuestos muestran el comportamiento esperado; especies doblemente protonadas, corresponden a un mono catión, mientras que la especie totalmente desprotonada corresponde a un monoanión. No obstante es de destacar, que las especies eléctricamente neutras (o sea las monoprotonadas) (HL) para los LQM324 y LQM334 alcanzan una fracción máxima ( $f_{HL}$ ) de 0.95 en un pH de 6.5 y 7.9, respectivamente. Por otro lado los compuestos LQM330 y LQM331, solo alcanzan un valor máximo alrededor de 0.82 en un pH de 8.5 y 9.6, respectivamente. En otras palabras las especies neutras

predominan para los derivados nitro y bromo, pero las especies que predominan en los derivados ciano e hidrógeno son las especies catiónicas.

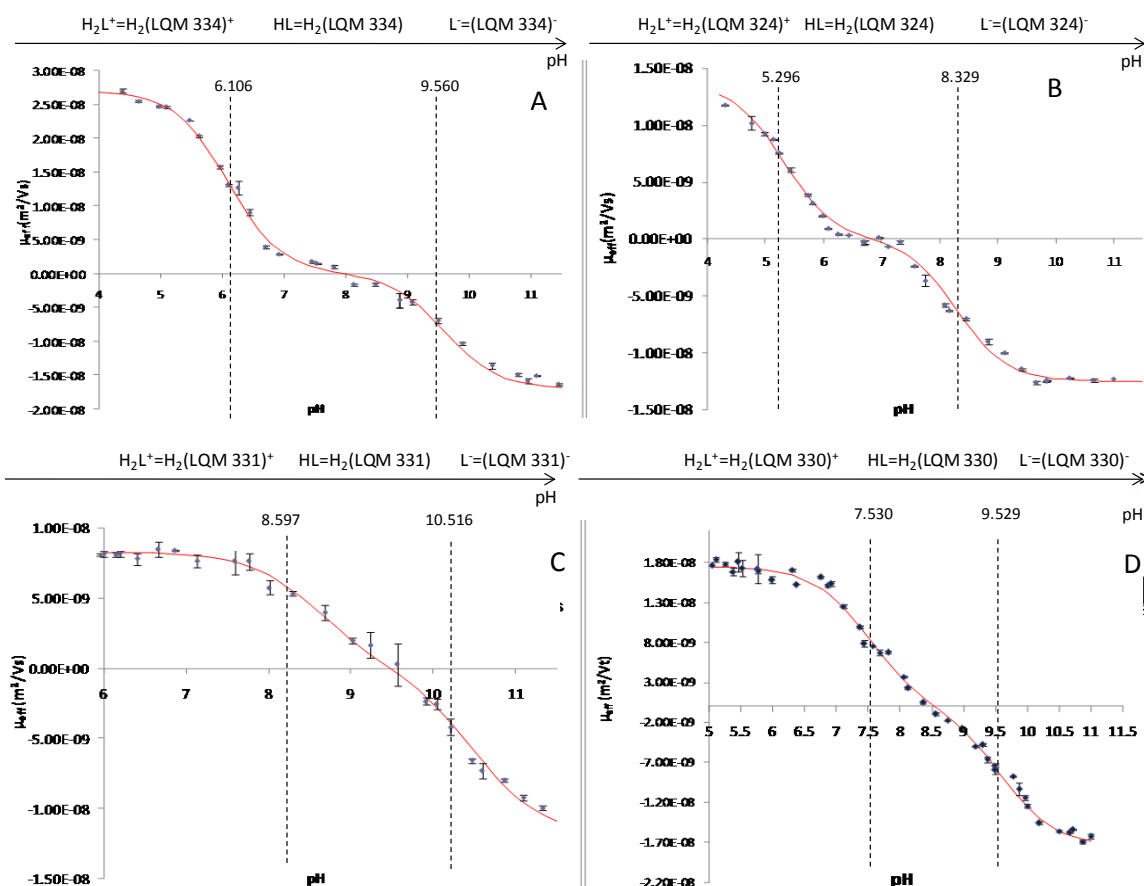


Figura 5.7: Curvas de la movilidad electroforética efectiva en función del pH, obtenidas a 37 °C y fuerza iónica 0.05 M, los marcadores representan el comportamiento experimental, mientras que la curva sólida representa el ajuste teórico mediante el programa SQUAD. En la parte de arriba de cada figura se muestra el correspondiente diagrama de zona de predominio de las especies, el cual es representado a los compuestos A) LQM334, B) LQM324, C) LQM331 y D) LQM330

## DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ CON EL PROGRAMA COMPUTACIONAL SQUAD

A pesar de que el programa computacional SQUAD fue diseñado primordialmente para determinar los valores de constantes de acidez usando datos de absorbancia para equilibrios en solución en función del pH [Leggett, 1985], se ha demostrado que es una excelente herramienta para determinar dichas constantes con datos de movilidad en función del pH [Rodríguez, 2009], debido a que el tiempo de migración depende tanto de la carga, peso y del pH del medio.

Los datos obtenidos por ECZ a diferentes valores de pH, se alimentan a SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez. Formando dos grupos de datos: 1.-Desde la especie catiónica hasta la neutra y 2.- De la especie neutra hasta la aniónica. Ambos constan de 24 valores de movilidad en función del pH, los cuales se consideró que poseen mayor información relevante sobre las movilidades de las especies presentes en el sistema (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Resultados obtenidos a partir de SQUAD, basándose en datos experimentales de movilidad en función del pH. \* Movilidad electroforética de la especie catiónica ( $H_2L^+$ ), + Movilidades electroforéticas de la especie aniónica ( $L^-$ ). Dónde:  $\sigma_{const}$ = desviación estándar total sobre las constantes; U= Suma de los cuadrados de las absorbancias calculadas.

	Intervalo de pH	$pK_a \pm \sigma_{const}$	U	$\sigma_{datos}$	Movilidad electroforética efectiva ( $\mu$ )* $10^8$ ( $m^2V^{-1}s^{-1}$ )
LQM324	4.0 -7.2	5.296 $\pm$ 0.018	2.838X10 <sup>-2</sup>	3.128X10 <sup>-2</sup>	1.367 $\pm$ 0.015*
	7.4-12.0	8.329 $\pm$ 0.129	2.189X10 <sup>-5</sup>	6.975X10 <sup>-4</sup>	-1.250 $\pm$ 0.115 <sup>+</sup>
LQM330	5.05-8.125	7.530 $\pm$ 0.002	2.347X10 <sup>-4</sup>	1.0772X10 <sup>-2</sup>	1.750 $\pm$ 0.001*
	8.563-11.0	9.529 $\pm$ 0.019	3.3650X10 <sup>-3</sup>	2.4533X10 <sup>-3</sup>	-1.737 $\pm$ 0.006 <sup>+</sup>
LQM331	7.000-10.2	8.597 $\pm$ 0.006	5.651X10 <sup>-4</sup>	3.625X10 <sup>-3</sup>	0.831 $\pm$ 0.014*
	10.2-12.6	10.516 $\pm$ 0.003	4.229X10 <sup>-4</sup>	4.288X10 <sup>-3</sup>	-1.203 $\pm$ 0.002 <sup>+</sup>
LQM334	4.789-8.201	6.195 $\pm$ 0.009	4.277X10 <sup>-2</sup>	3.154X10 <sup>-2</sup>	2.305 $\pm$ 0.014*
	8.201-11.633	9.592 $\pm$ 0.001	2.786X10 <sup>-4</sup>	2.998X10 <sup>-3</sup>	-1.919 $\pm$ 0.115 <sup>+</sup>

Movilidad electroforética, correspondiente a la especie catiónica\*, + especie aniónica

Debe tomarse en cuenta que los compuestos son monocatiónicos y que las movilidades iónicas efectiva positivas representan la especie predominantemente catiónica ( $H_2L^+$ ) la cual representa la especie ácida, mientras que en las movilidades iónicas efectivas negativas ( $L^-$ ), la especie predominante es la especie ácida que se presenta en forma aniónica. La movilidad iónica efectiva es cero cuando la molécula se encuentra neutra (HL). Para pH menores que  $pK_{a1}$  la especie que predomina es la catiónica, mientras que para pH cuyos valores se encuentran entre los dos  $pK_a$ 's se encuentra de forma neutra y cuando la especie predominante es la aniónica el pH es mayor que el  $pK_{a2}$ . Cuando tengo valores de movilidades iónicas efectivas (MIE) positivas se tiene un catión, por lo tanto los cuatro LQM se presentan especies aniónica, catiónicas y neutras

## DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ MEDIANTE EL MÉTODO GRÁFICO. POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

Tomando los mismos intervalos de pH que se utilizaron para SQUAD se el método gráfico se calculan los valores de pKa, para cada uno de los compuestos. (Figura 5.8).

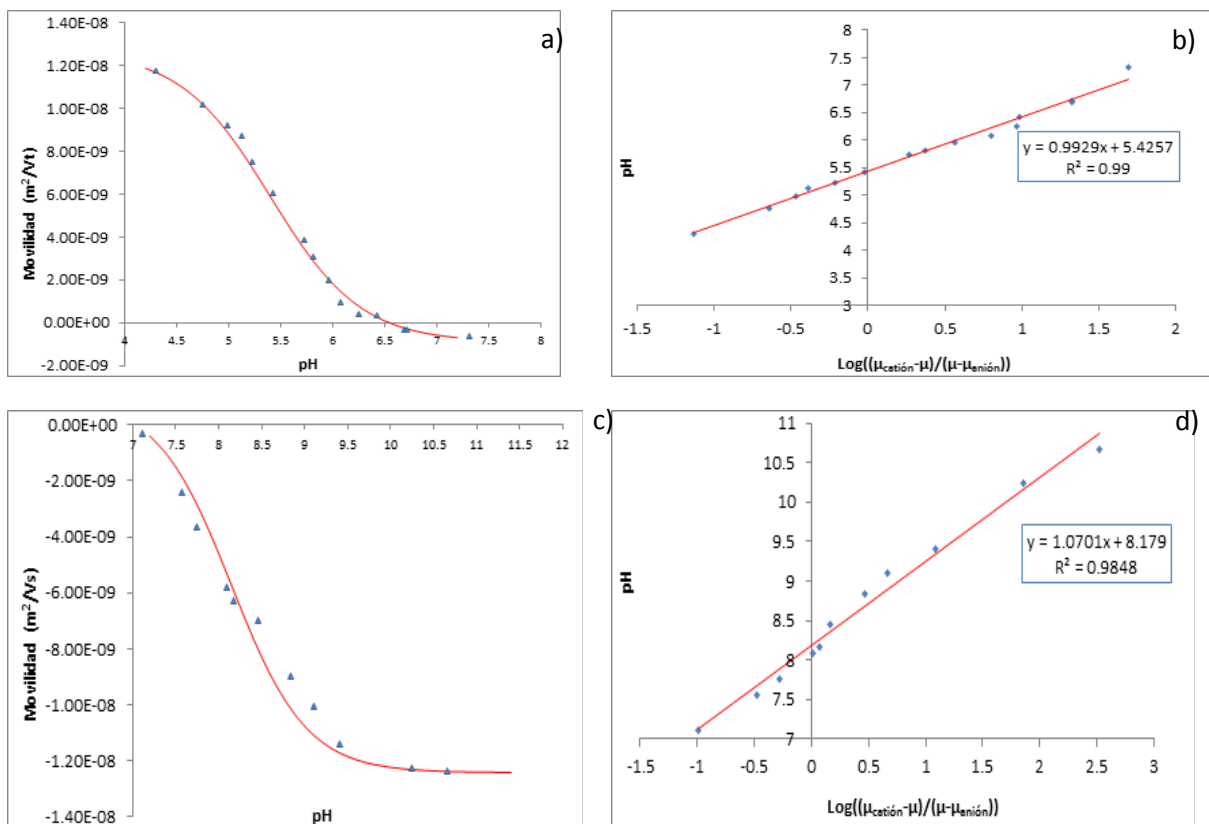


Figura 5.8: Método gráfico del compuesto LQM324. Movilidad electroforética efectiva vs pH; teórica (lineal) y experimental (marcadores), para intervalos de pH: a) 4.0 a 7.2 y c) pH de 7.4 a 12, con sus respectivas regresiones lineales b) y d)

Todas las  $R^2$  de las ecuaciones regresiones lineales son aproximadamente uno, lo que significa que es buen ajuste a una línea recta y por lo tanto el valor de pKa es una buena aproximación. (Tabla 5.7). También se muestra una comparación entre los resultados obtenidos por el método gráfico y por SQUAD

Tabla 5.7. pKa calculados por el método gráfico, cuando se utilizan movilidades electroforéticas efectivas.

COMPUESTO	PENDIENTE	ORDENADA AL ORIGEN
		(pKa)
LQM324	0.988±0.037	5.426±0.016
	0.990±0.009	8.179±0.129
LQM330	0.987 ±0.068	7.572±0.071
	0.994 ±0.076	9.683±0.075
LQM331	0.988±0.037	8.568±0.016
	0.990±0.009	10.480±0.016
LQM334	1.092 ±0.082	6.100±0.081
	1.053 ±0.131	9.543±0.125

Tabla 5.8. pKa de los compuestos LQM por medio del método gráfico comparado con SQUAD con Electroforesis capilar de zona

NOMBRE	MÉTODO GRÁFICO		SQUAD	
	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
<b>LQM324</b>	5.426±0.016	8.179±0.129	5.296±0.018	8.329±0.129
<b>LQM330</b>	7.572±0.071	9.683±0.075	7.530±0.002	9.529±0.019
<b>LQM331</b>	8.568±0.016	10.480±0.016	8.597±0.006	10.516±0.003
<b>LQM334</b>	6.106±0.081	9.543±0.125	6.195±0.009	9.592±0.001

### COMPARACIÓN DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE LOS VALORES DE CONSTANTES DE ACIDEZ DETERMINADOS EXPERIMENTALMENTE Y LOS ESTIMADOS POR EL PROGRAMA ACD/pKa

Se realizaron las estimaciones de pKa's por ACD/pKa (Tabla 5.9). Este software es una herramienta muy útil debido a que calcula el pKa comparando los segmentos, estructuras o grupos semejantes para una molécula dada con su base de datos. Al igual de los métodos anteriores los resultados muestran que la molécula se desprotona en dos ocasiones, teniendo con ello dos valores de pKa.

Tabla 5.9, valores de los pKa calculados mediante ACD/pKa a 25 °C y fuerza iónica de cero

<b>NOMBRE</b>	<b>ACD/pKa</b>	
	<b>pKa<sub>1</sub></b>	<b>pKa<sub>2</sub></b>
<b>LQM324</b>	5.4±0.6	7.5±0.5
<b>LQM330</b>	6.0±0.6	8.1±0.4
<b>LQM331</b>	8.5±0.4	11.6±0.4
<b>LQM334</b>	6.1±0.6	9.5±0.4

Comparando los valores de pKa mediante las dos técnicas experimentales (método gráfico y SQUAD), se presenta en la Tabla 5.10.

Es conveniente señalar que probablemente los valores experimentales de pKa, obtenidos espectrofotométricamente, podrían ser más precisos que los determinados por ECZ debido a que la imposición de la fuerza iónica sería mejor (con NaCl en el primer caso y buffer de fosfatos en la segunda). De hecho, las diferencias observadas en los valores de pKa es de hasta 0.33 entre los dos métodos, lo que podría atribuirse principalmente a la diferentes valores de fuerza iónica impuestas en ambos casos.

En cuanto a ACD/pKa, que puede usarse para calcular pKa's cuyos valores estan bastante cercanos con los datos experimentales, sin embargo en algunos casos difieren por casi 1.6 unidades, el programa en algunos sistemas es confiable, estas diferencias se le atribuyen a que ACD estima los pKa a condiciones diferentes a las experimentales (fuerza iónica de cero y temperatura de 25 °C), esto se puede observar mejor en la Figura 5.9.

La comparación de los valores de pKa mediante las dos técnicas experimentales y por el método gráfico y SQUAD se presentan en la Tabla 5.10.

Es conveniente señalar que probablemente los valores experimentales de pKa, obtenidos espectrofotométricamente, podrían ser más precisos que los determinados por ECZ debido a que la imposición de la fuerza iónica sería mejor (con NaCl en el primer caso y buffer de fosfatos en la segunda). De hecho, las diferencias observadas en los valores de pKa es de hasta 0.33 entre los dos métodos, lo que podría atribuirse principalmente a la diferentes valores de fuerza iónica impuestas en ambos casos.

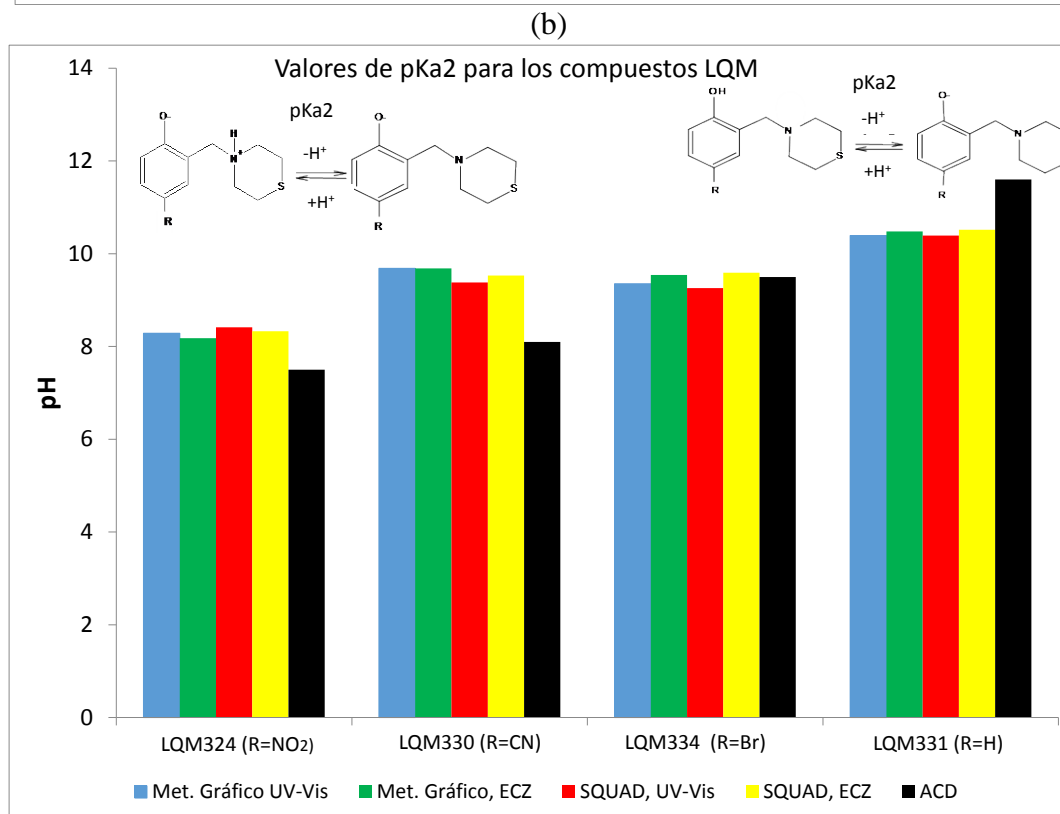
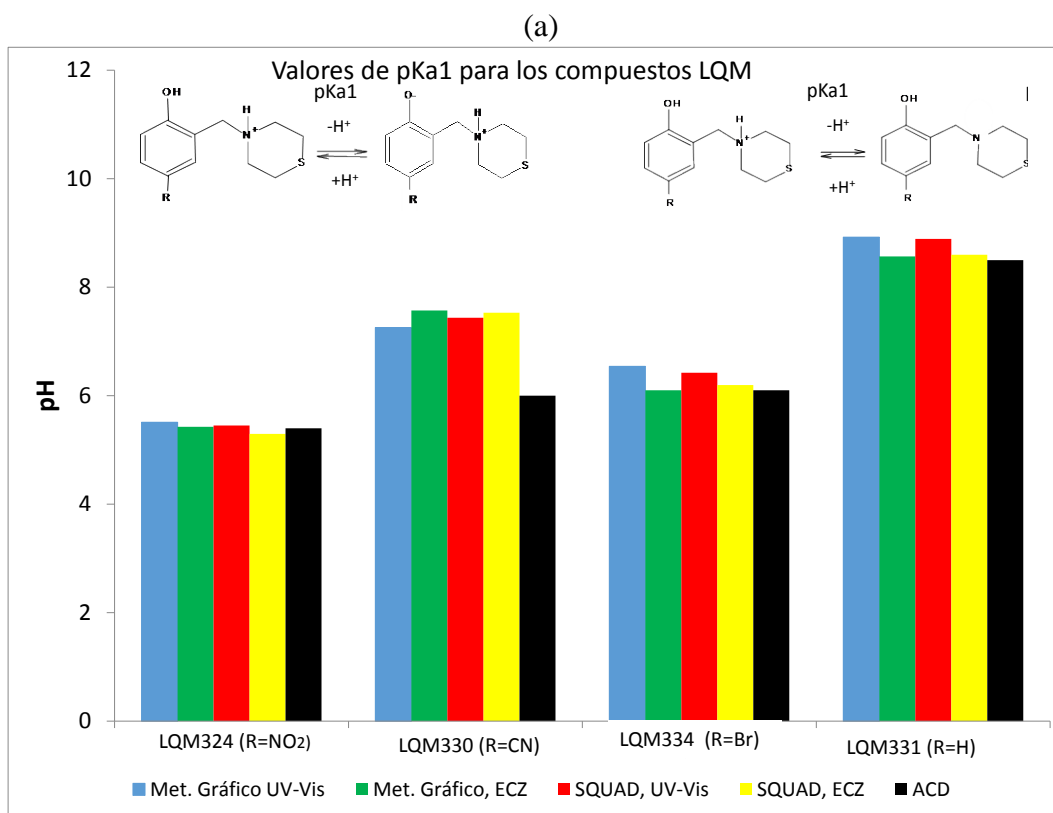


Figura 5.9: Comparación de los valores de pKa, para todos los compuestos tiomorfolínicos.  
 a) Valores de pKa<sub>1</sub>. b) Valores de pKa<sub>2</sub>.



Tabla 5.10. Resumen de los valores de pKa, calculados por UV-Visible y ECZ, ACD/pKa, mediante SQUAD Y el método gráfico

COMPUESTO	TÉCNICA	MÉTODO	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
LQM324	UV-Visible	GRÁFICO	5.509±0.043	8.284±0.358
		SQUAD	5.450±0.001	8.412±0.001
	ECZ	GRÁFICO	5.426 ±0.016	8.179 ±0.129
		SQUAD	5.296 ± 0.018	8.329 ± 0.129
	ACD/pKa	CLASSIC	5.4±0.6	7.5±0.6
LQM330	UV-Visible	GRÁFICO	7.254±0.160	9.685±0.254
		SQUAD	7.437±0.008	9.380±0.004
	ECZ	GRÁFICO	7.572±0.071	9.683±0.075
		SQUAD	7.530±0.002	9.529±0.006
	ACD/pKa	CLASSIC	6.0±0.6	8.1±0.4
LQM331	UV-Visible	GRÁFICO	8.920±0.162	10.393±0.064
		SQUAD	8.890±0.110	10.391±0.075
	ECZ	GRÁFICO	8.568±0.016	10.48±0.016
		SQUAD	8.597 ± 0.006	10.516 ± 0.003
	ACD/pKa	CLASSIC	8.5±0.4	11.6±0.4
LQM334	UV-Visible	GRÁFICO	6.541±0.335	9.354±0.086
		SQUAD	6.421±0.032	9.261±0.009
	ECZ	GRÁFICO	6.100±0.081	9.543±0.125
		SQUAD	6.195 ± 0.009	9.592 ± 0.001
	ACD/pKa	CLASSIC	6.1±0.6	9.5±0.4

## DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA

En la Tabla 5.11 se muestran las ecuaciones de las regresiones lineales de las curvas de calibración (Absorbancia vs  $[LQM]_o$ ), mostrando las longitudes de onda en donde se encuentran los mayores valores de absorbancia en los espectros de absorción, mostrando que estadísticamente se representa perfectamente como una línea recta debido al dato estadístico de  $R^2$ .

Tabla 5.11: Ecuaciones obtenidas por regresión lineal, de las curvas de calibración, donde  $[LQM]_o$  está dada en  $mg/dm^3$  y representa las concentraciones del correspondiente LQM en la fase octanólica. También se presentan los valores de LogP obtenidos para cada compuesto entre n-octanol y agua.

Compuesto	$\lambda$ /nm	Ecuación de regresión lineal	LogP
LQM324	315	$55.49 \pm 1.34 \times 10^{-3} [LQM324]_o + (-0.018 \pm 0.024)$ con $R^2=0.9989$	$1.591 \pm 0.016$
LQM330	354	$76.85 \pm 4.25 \times 10^{-3} [LQM330]_o + (-0.015 \pm 0.045)$ con $R^2=0.9963$	$1.631 \pm 0.009$
LQM331	275	$12.95 \pm 0.1 \times 10^{-3} [LQM331]_o + (-0.0068 \pm 0.0061)$ con $R^2=0.9999$	$1.743 \pm 0.038$
LQM334	287	$0.72 \pm 0.05 \times 10^{-3} [LQM334]_o + (0.007 \pm 0.0011)$ con $R^2=0.9917$	$2.126 \pm 0.017$

La curva de calibración se utilizó para obtener la concentración del correspondiente LQM en la fase orgánica por medio de interpolación la absorbancia medida.

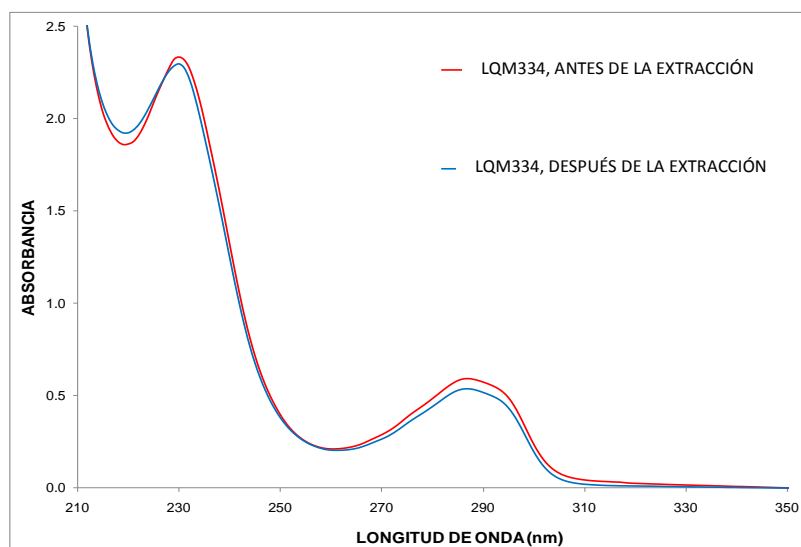


Figura 5.10: Muestra los espectros de absorción del compuesto LQM334 antes y después de la extracción, esto presentado en la fase orgánica.

Las ecuaciones de la regresión lineal de las curvas de calibración de todos los compuestos LQM estudiados en el presente trabajo se presentan en la Tabla 5.11.

Una vez obtenida la curva de calibración, se realizaron las extracciones líquido-líquido, tomando los espectros de ambas fases, que se muestran en la Figura 5.10, observando que después de la extracción, la mayoría del compuesto se encuentra en la fase orgánica, lo que significa que el compuesto LQM334 es más afín a la fase orgánica (n-octanol), como se muestra en la Figura 5.11.

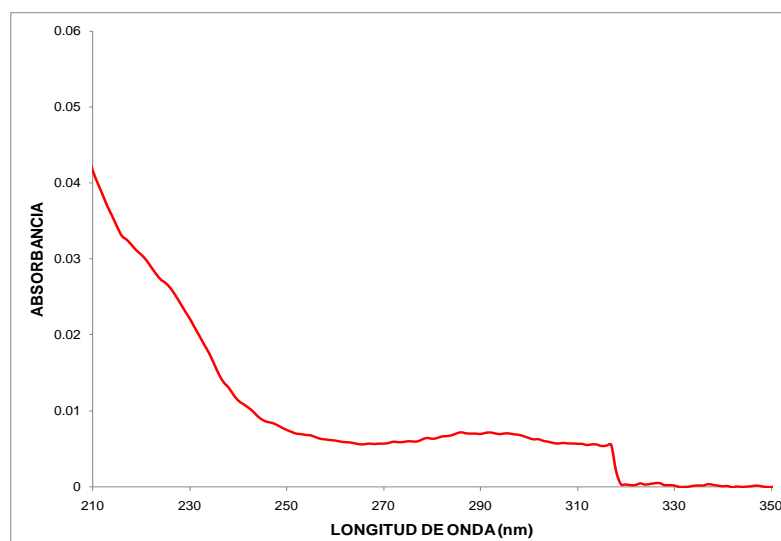


Figura 5.11: Muestra el espectro de absorción del compuesto LQM334 en la fase acuosa después de la extracción. Debe observarse que la forma del espectro obtenido en agua es muy similar a la del compuesto disuelto en n-octanol.

Los valores de LogP fueron obtenidos aplicando la ecuación 4.22 para las condiciones experimentales descritas en el Capítulo IV de este trabajo de tesis. Dichos valores se muestran también en la tabla 5.11. Los compuestos LQM cumplen con la regla de Lipinski, relacionada con el valor del coeficiente de partición ( $0 < \text{LogP} < 3$ ) y son buenos candidatos para actuar como principios activos en fármacos orales en el organismo.

### **COMPARACIÓN DE LOS COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE LOS LQM ENTRE n-OCTANOL Y AGUA OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE Y ESTIMADOS CON PROGRAMAS COMERCIALES**

La comparación de los valores de LogP de los compuestos LQM estudiados en este trabajo obtenidos experimentalmente y los estimados con diferentes programas comerciales se muestra en la Tabla 5.12 y en la Figura 5.12. Como se puede ver hay una gran diferencia entre los valores de los diferentes programas. Puede observarse que los programas ACDLogP y ALOGPS 2.1, fallan por más de 0.15 unidades de LogP en dos de los cuatro LQM estudiados, mientras que el programa SRC lo hace en tres de los cuatro casos. El programa miLogP falla por más de 0.15 LogP unidades en todos los LQM estudiados. En otras palabras, los diferentes métodos predictivos rinden resultados significativamente diferentes para el mismo compuesto. Por otro lado, parece que el compuesto LQM con sustituyente bromo es el que origina mayor solubilidad y afinidad a la fase de n-octanol, como ocurre con los compuestos antihipertensivos con sustituyentes cloruro (por ejemplo, losartán y felodipino), dando valores mayores de LogP que el de los otros sustituyentes.

Tabla 5.12: Representa los valores de LogP tanto experimentales como teóricos, por los diferentes programas mencionados con anterioridad [6].

COMPUESTOS	EXPERIMENTAL	TEÓRICOS			
		ACD/LogP	ALogPS2.1	miLogP	KowWin SRC
LQM324	1.591 ± 0016	1.53	1.77	2.00	2.13
LQM330	1.631 ± 0.009	1.56	1.67	1.80	1.83
LQM331	1.743 ± 0.038	1.45	1.78	1.07	1.73
LQM334	2.126 ± 0.017	2.45	2.58	2.85	2.62

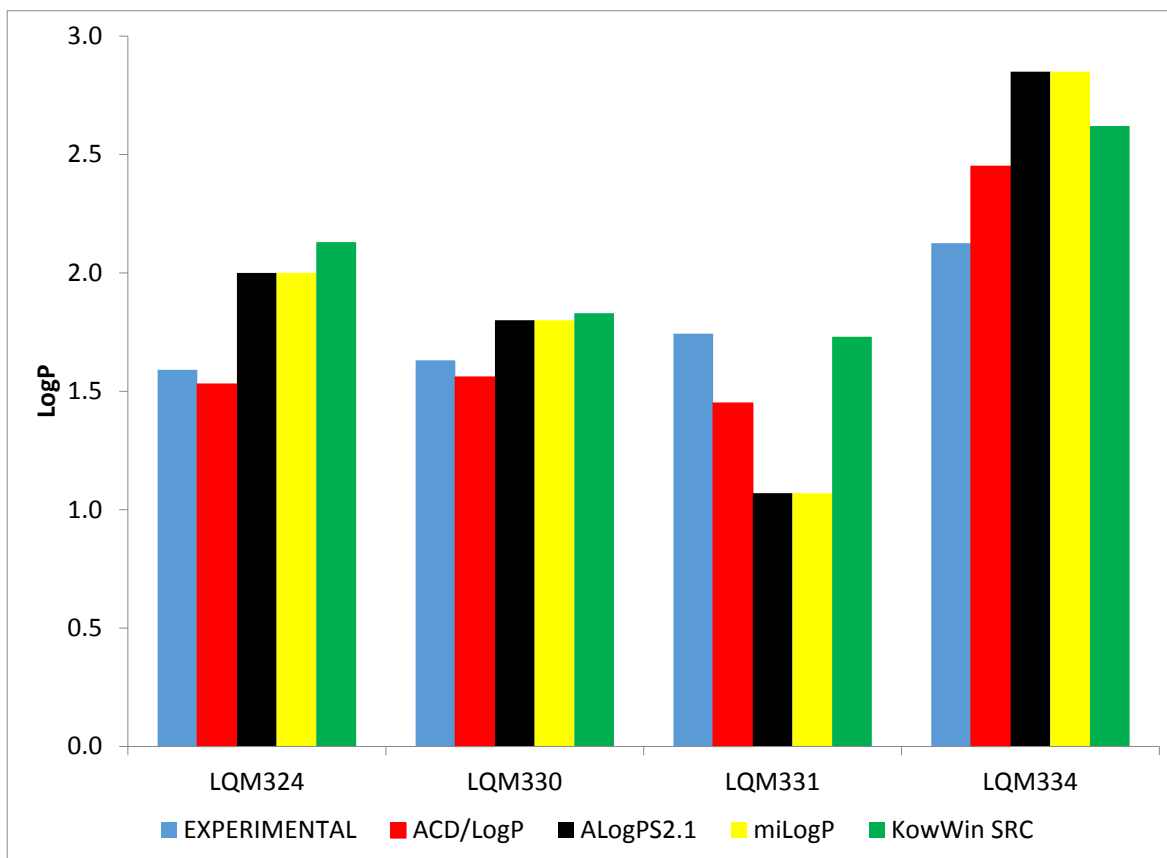


Figura 5.12: Datos de LogP entre n-octanol y agua obtenidos experimentalmente y estimados con programas comerciales

## CAPITULO VI. VALORES DE pKa CALCULADOS CON MÉTODOS DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL Y COMPARACIÓN CON LOS VALORES EXPERIMENTALES

### CÁLCULO DE LOS VALORES DE pKa POR MEDIO DEL PROGRAMA GAUSSIAN 03

Una vez que ya se tienen cuántos y cuáles son los valores de pKa de los compuestos estudiados, es necesario conocer el orden de desprotonación y en qué parte de la molécula se van a llevar a cabo dichas desprotonaciones. La manera experimental para hacerlo podría ser con resonancia magnética nuclear, pero debido a la pequeña cantidad de los LQM se realizó mediante cálculos teóricos de la Química Computacional.

#### **El estudio teórico de los mecanismos de desprotonación.**

Las superficies de densidad LUMO (orbital ocupado de mayor energía, por sus siglas en inglés) obtenidos para las especies  $H_2L^+$  se muestran en la Figura 6.1. De acuerdo con este criterio, el sitio con más alto carácter ácido, depende del sustituyente en la posición *para* del fenol. Para las especies con sustituyentes nitro y ciano, el OH fenólico muestra mayor contribución a la densidad del LUMO que los sitios amino, es decir, se espera que el H fenólico sea el más ácido y por lo tanto es el que se desprotona primero y el que provoca el primer pKa.

En los sustituyentes para H y Br, los grupos amino contribuyen a las densidades LUMO en una mayor proporción que el OH fenólico, es decir, se espera que los sitios más ácidos sean aquellos en el grupo tiomorfolínico. Sin embargo, esto es sólo un criterio cualitativo, y se necesita un estudio más detallado sobre la base de energías libres de Gibbs para establecer, con un mayor grado de certeza, el mecanismo de desprotonación.

Las energías libres de Gibbs para todos los posibles procesos de desprotonación se han calculado a 298.15 K. La Tabla 6.1 muestra los valores  $\Delta G_{sol}$ , correspondientes a las diferentes vías consideradas para la primera desprotonación. Estos valores de energía concuerdan con las predicciones basadas en la distribución de la densidad LUMO.

Para las especies con grupos  $\text{NO}_2$  y  $\text{CN}$  en los sitios *para* de los fenoles, el proceso más viable es la que implica el OH en el grupo fenol, es decir, el primer pKa debe estar asociado con la acidez de este sitio. Para todos los otros sustituyentes, las vías de participación de grupos amino conducen a procesos más favorables, es decir, menos endergónicos.

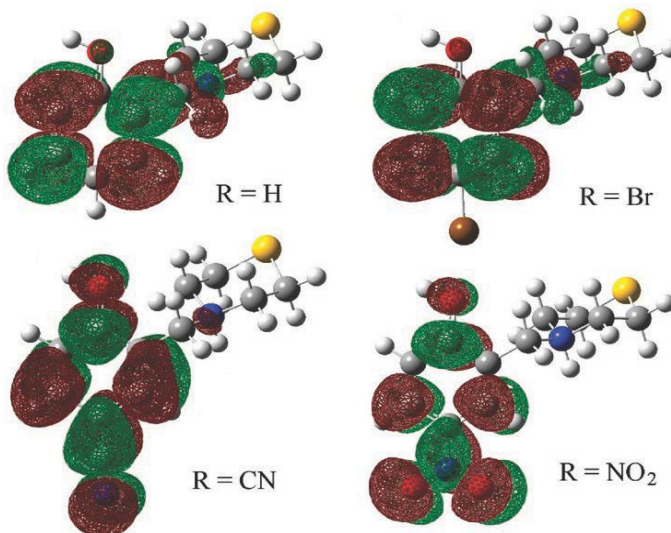


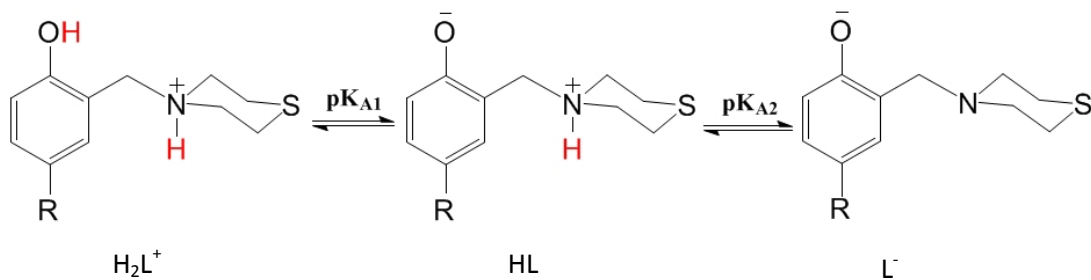
Figura 6.1: Superficies de densidad LUMO calculado con valor de isodensidad de 0.02 ua.

Tabla 6.1: Energías libres de Gibbs de reacción (kcal/mol) para todas las desprotonaciones por todas las vías posibles presentadas a 298.15K

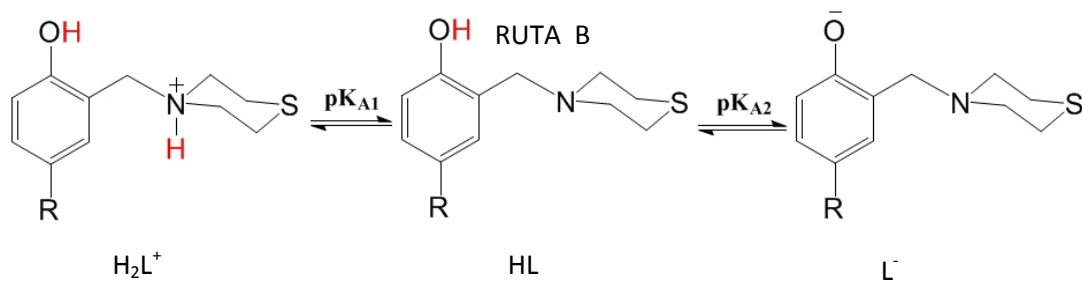
Sistema	Sitios ácidos	
	-OH	-NH <sup>+</sup>
R= H	87.32	59.87
R= Br	84.52	41.30
R= CN	50.33	51.46
R= NO <sub>2</sub>	39.71	51.38

Una vez identificado el camino más viable para la primera desprotonación de los sistemas  $\text{H}_2\text{L}^+$ , las rutas de desprotonación son completamente específicas considerando que solo hay dos procesos de desprotonación. En consecuencia, la ruta A se propone como la más viable si  $\text{R}=\text{CN}$  o  $\text{NO}_2$  y la ruta B si  $\text{R}=\text{Br}$  o  $\text{H}$ . (Ver Esquema 6.1)

RUTA A



R= CN, NO<sub>2</sub>



R= H, Br

Esquema 6.1: Desprotonación encontrada según los diferentes sustituyentes estudiados.

Los valores de pKa calculados con ayuda de la Química Computacional se reportan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2: Valores de pKa calculados de acuerdo al esquema de desprotonación

Sistema	pKa1	pKa2
R= H	10.49	10.54
R= Br	7.24	10.05
R= CN	8.82	9.40
R= NO <sub>2</sub>	6.96	8.60



## COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE pKa CALCULADOS CON LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE

Los valores calculados (Tabla 6.2) reproducen las tendencias experimentales observadas por medio de los datos espectrofotométricos y los determinados por ECZ (Tabla 5.10), con un error sistemático de aproximadamente 1 unidad para los valores de pKa<sub>1</sub>, (y mejor aún para los valores de pKa<sub>2</sub>) que también están en línea con la intuición química. Por ejemplo, la presencia del grupo nitro en el posición para del fenol aumenta significativamente la acidez protón fenólico, que se explica por el alto carácter electrón atractor de este sustituyente. Por otra parte, los valores de pKa disminuyen cuando este sustituyente está presente, lo que sugiere que también influye en la acidez de los protones en los átomos de N del grupo tiomorfolínico a pesar de la presencia de un metileno el cual es el grupo entre la tiomorfolina y el anillo fenólico. (Figura 6.2.)

Las desviaciones de los valores de pKa calculados a partir de los datos experimentales con las técnicas espectrofotométricas y electroforesis capilar de zona, se reportan en la Tabla 6.3 (sin tener en cuenta el valor de pKa<sub>1</sub> del compuesto LQM331), en términos de errores promedio con signo (MSE, por sus siglas en inglés), errores promedio sin signo (MUE), y los errores de la raíz media cuadrática (RMSE). Dado que la exactitud del cálculo por Química Computacional con Gaussian 03, generalmente se acepta como de 1 kcal/mol= 4.184 kJ/mol, para los más altos niveles de la teoría, esto implicaría un error de aproximadamente 0.73 unidades de pKa, en T= 298.15 K. Es por ello que se puede afirmar que los presentes cálculos reproducen los valores experimentales dentro del error esperado.

Tabla 6.3: Errores promedio con signo (MSE), errores promedio sin signo (MUE) y los errores de raíz media cuadrática (RMSE) para los valores de pKa calculados con respecto a los estimados con las técnicas espectrofotométrica y de electroforesis capilar de zona.

	Espectroscopía UV-Visible	Electroforesis Capilar de Zona
MSE	0.607	0.578
MUE	0.607	0.610
RMSE	0.676	0.721

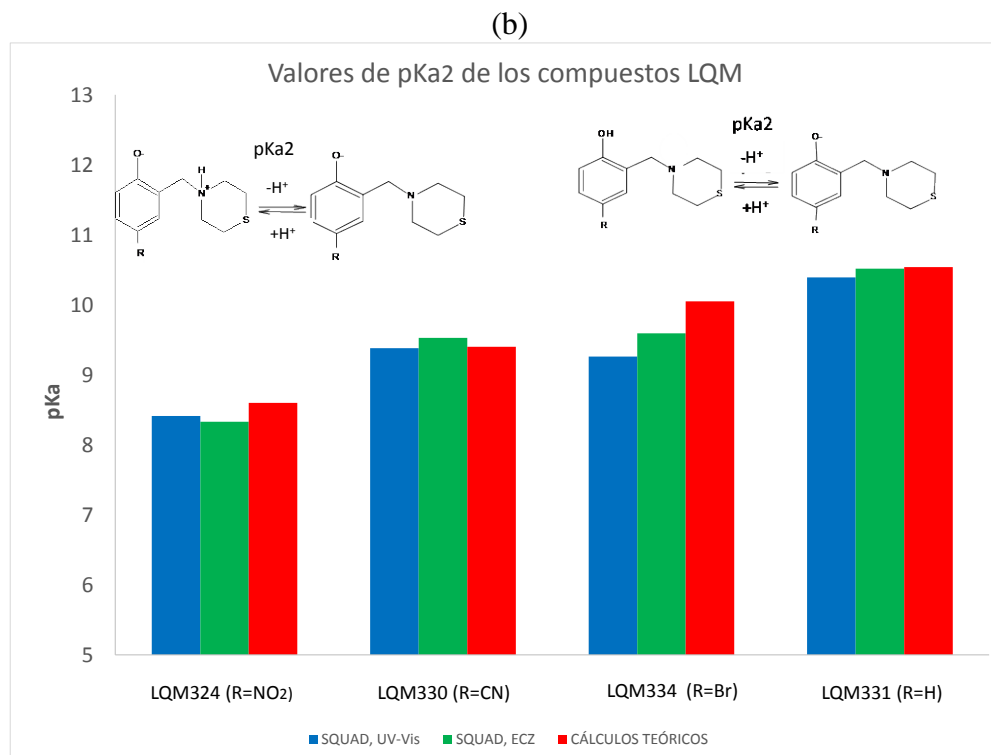
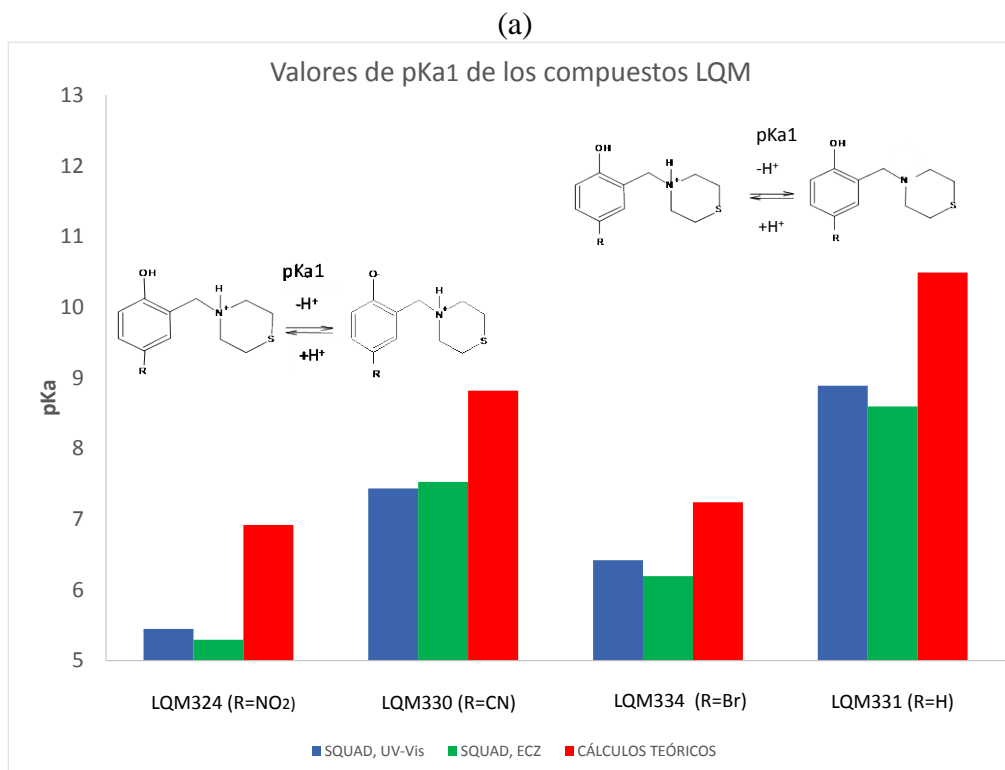


Figura 6.2: Comparación de los valores de pKa experimentales con los calculados por Gaussian 03, para todos los compuestos timorfolínicos estudiados en este trabajo de tesis.  
a) Valores de pKa1. b) Valores de pKa2.

En resumen, a partir de los cálculos teóricos, puede ser propuesto que la naturaleza del sustituyente *para-* en el grupo fenol influye no sólo a la acidez de los diferentes protones (fenólico y tiomorfolínico) en  $H_2L^+$ , sino también la ruta de los procesos de desprotonación sucesivos.

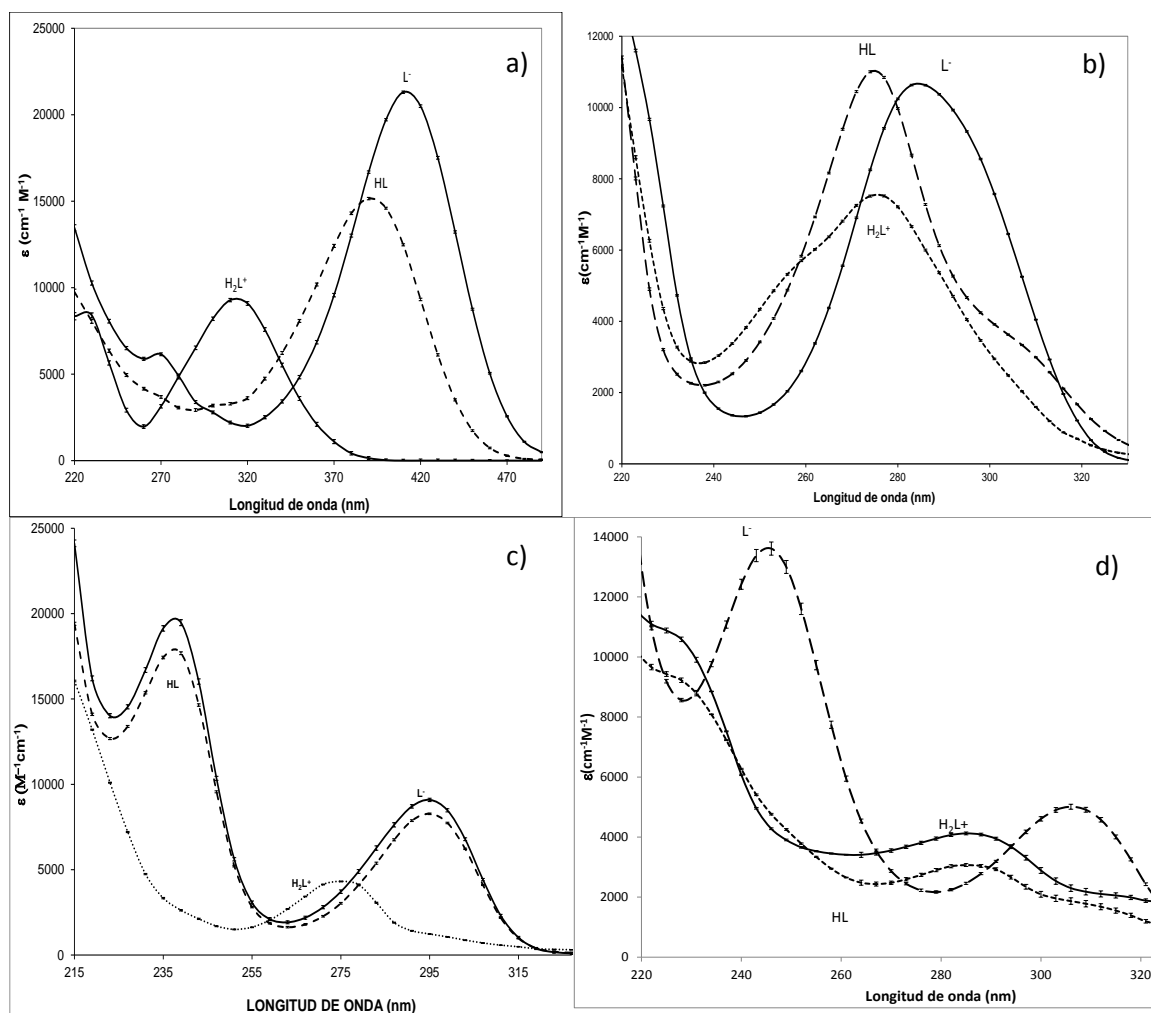
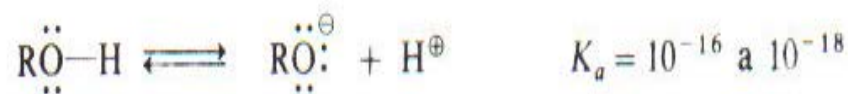


Figura 6.3: Coeficientes de absorptividad de los compuestos LQM refinados por el programa computacional SQUAD, mediante la técnica de UV-Visible, a  $T=37^\circ C$  y  $I=0.15M$ . a) LQM324, b) LQM330, c) LQM331 y d) LQM334

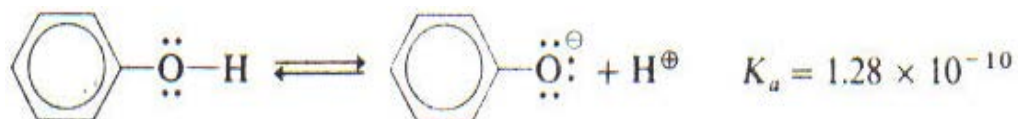
Por último, la naturaleza del carácter zwitteriónico de las especies neutras también podrían estar relacionadas con las diferencias en la magnitud de los coeficientes de la absorptividad molar de LQM331 y LQM334, que son muy similares, y las especies neutras molecularmente son no zwitteriónicas en ambos casos. Las diferencias son mayores con el conjunto de absorptividades molares de las especies de LQM330 y LQM324, donde las especies neutras parecen ser zwitteriónicas. (Figura 6.3.)

Estos podrían ser atribuidos a la capacidad electroattractora del sustituyente en la posición *para*- con respecto al grupo fenol, la cual es mayor para -NO<sub>2</sub> que para -CN que para -Br. Hay un corrimiento batocrómico para las longitudes de onda de absorción máxima para LQM324, como se esperaba. Sin embargo, las diferencias en magnitud de los coeficientes de absorptividad molar son difíciles de explicar porque ellos también están relacionadas con las diferencias de energía de los orbitales moleculares implicados en la transición electrónica, en cada caso (las cuales podrían ser diferentes).

Aunado a lo anterior, los fenoles y los alcoholes experimentan reacciones semejantes que comprenden la ruptura del enlace oxígeno-hidrógeno del grupo -OH. Mientras que la mayoría de los alcoholes alifáticos son ácidos bastantes débiles, los fenoles son más ácidos. De hecho, una solución acuosa del fenol es ácida al papel tornasol



Ion alcóxido

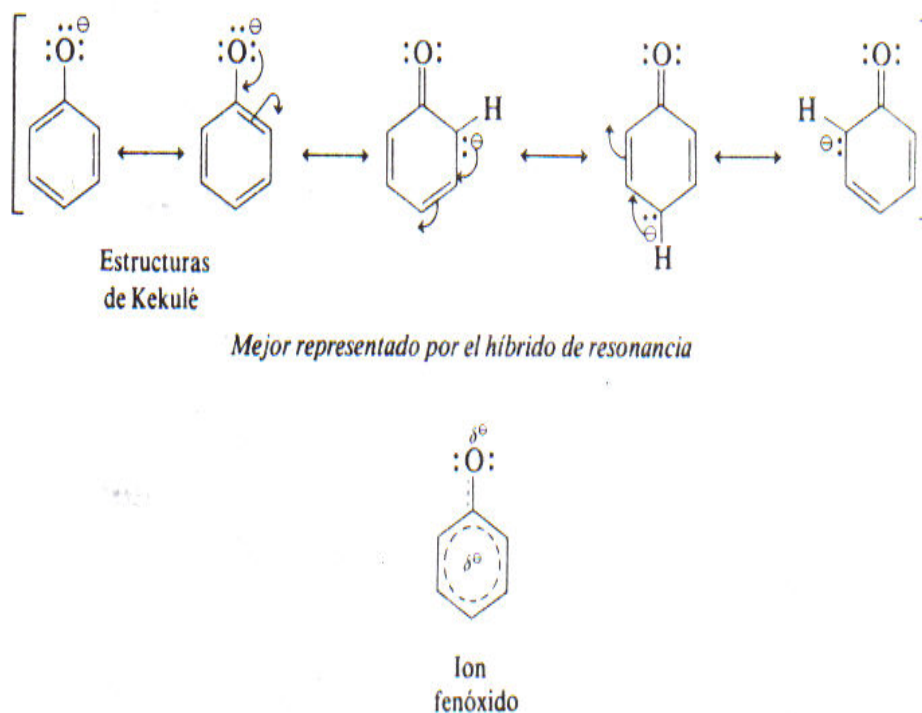


Ion  
fenóxido

Dos factores pueden ser los causantes de la creciente acidez de los fenoles respecto a los alcoholes. El primero es la relativa estabilidad de los aniones, las bases conjugadas que se forman en la ionización, Pero quizá la razón más importante es el efecto de la solvatación

La acidez de los alcoholes respecto al agua se atribuye a la donación electrónica por los grupos sustituyentes alquilo, que desestabilizan el anión alcóxido formado en la reacción. Ampliando esta consideración, examine el efecto electrónico del anión fenóxido C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sup>-</sup> que se forma al disociarse el fenol. Se pueden dibujar varias estructuras de

resonancia para el ión fenóxido, las cuales muestran la forma como se distribuye la carga negativa en los átomos de carbono del anillo:



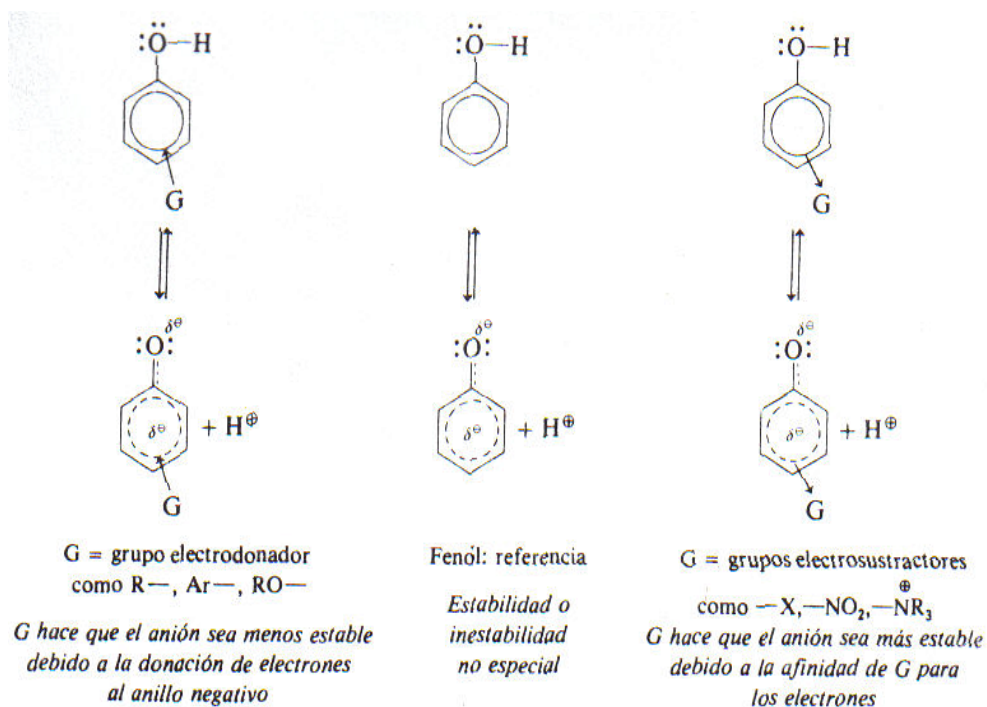
En contraste con los iones alcóxido e hidróxido en los que se concentra la carga negativa en el oxígeno, el ión fenóxido presenta la carga negativa distribuida en un área mucho mayor de la molécula; dicha estabilización de resonancia da lugar a una mayor estabilidad del fenóxido y, por ello, constituye la base más débil de las tres.

Las correlaciones estructura-acidez para una serie de fenoles sustituidos concuerda con las ideas presentadas antes con respecto a la acidez del fenol.

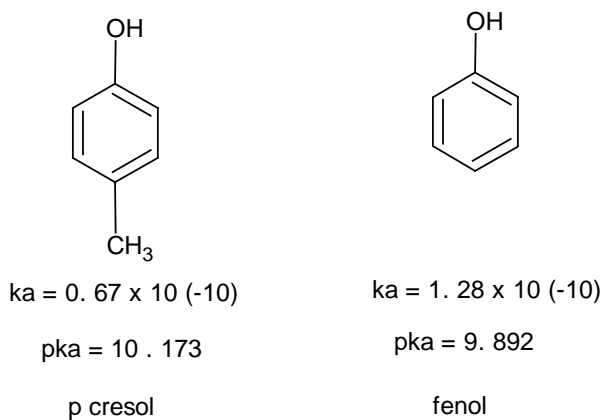
Los sustituyentes de anillo que eliminan electrones estabilizan la carga negativa situada en el anillo después de que ocurre la disociación.

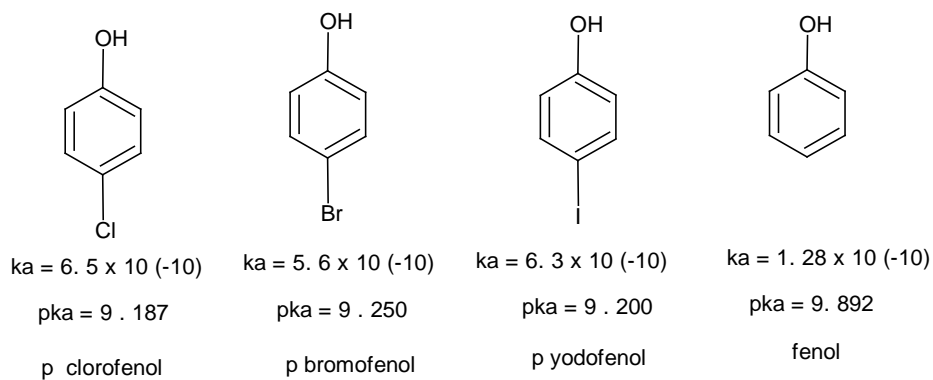
Los sustituyentes que ceden electrones al anillo reducen la acidez debido a que el ion fenóxido sustituido resultante es menos estable.

Lo siguiente ilustra este efecto relativo, comparado con el fenol como referencia:



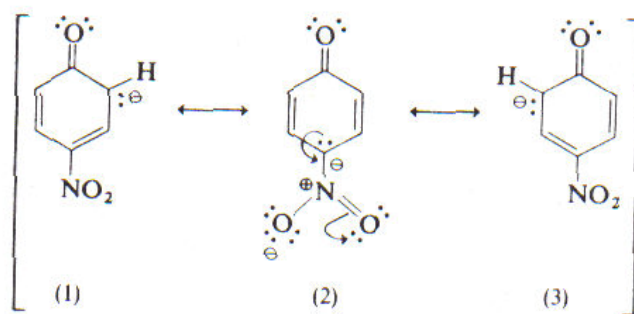
Por ejemplo, las constantes de disociación para la serie de fenoles *para*-sustituidos,  $p\text{-G-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ , muestran que el *p*-cresol ( $\text{G}=\text{CH}_3$ ) es menos ácido  $K_a= 0.67 \times 10^{-10}$ , ( $\text{p}K_a=10.173$ ) que el fenol  $K_a= 1.28 \times 10^{-10}$  ( $\text{p}K_a=9.892$ ) lo cual es razonable pues el metilo dona electrones por el efecto inductivo. Por otra parte, el *p*-clorofenol, *p*-bromofenol, *p*-yodofenol tienen valores  $K_a= 6.5 \times 10^{-10}$  ( $\text{p}K_a=9.187$ ),  $K_a= 5.6 \times 10^{-10}$  ( $\text{p}K_a=9.250$ ) y  $K_a=6.3 \times 10^{-10}$  ( $\text{p}K_a=9.200$ ), respectivamente, y son más ácidos que el fenol, debido al efecto sustractor de electrones de los halógenos. El *p*-nitrofenol es un ácido más fuerte aún,  $K_a= 6.8 \times 10^{-10}$ , ( $\text{p}K_a= 7.167$ ) dado el fuerte efecto electro-a tractor del grupo  $\text{-NO}_2$



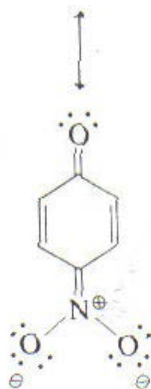


En el caso de ciertos sustituyentes como el grupo nitro, se presenta la estabilización por resonancia del anión por el efecto inductivo electrotractor atribuido al grupo nitro.

Por ejemplo, las estructuras de resonancia para el ion *p*-nitrofenóxido (sin considerar las estructuras de Kekulé) son:



Especialmente estable  
debido a cargas diferentes  
adyacentes entre si



(4)

Estructura de resonancia estabilizada,  
carga negativa deslocalizada sobre un área  
mayor de la molécula

Las estructuras de resonancia 1 y 3 presentan una estabilidad semejante, ya que en cada una de ellas la carga negativa se encuentra en el carbono que posee un hidrógeno. La estructura 2 es especialmente estable debido a las cargas negativas y positiva adyacentes en el nitrógeno y en el carbono, respectivamente; puede dibujarse una estructura de resonancia adicional 4 para mostrar cómo puede deslocalizarse esa carga negativa en un área mayor de la molécula. Esta estabilización de resonancia adicional explica la acidez excepcional del p-nitrofenol respecto al fenol. La unión de los grupos nitro; orto y para al grupo-OH en el anillo aumenta hasta el máximo la acidez por razones análogas a las que explican por qué los haluros de arilo orto- y para-nitrosustituidos son más reactivos en la sustitución nucleofílica aromática.

También observamos que los valores de las movilidades tienen el siguiente orden: LQM330>LQM324>LQM331>LQM334, notoriamente LQM330 es el que tiene menor tiempo de migración debido a que tiene en la posición para el Hidrógeno y es el más pequeño.



## CAPITULO VII. CONCLUSIONES

Todos los LQM, presentaron una estabilidad aceptable en el tiempo de trabajo,

Se obtuvieron dos valores de pKa para los cuatro compuestos antihipertensivos estudiados, de acuerdo a lo esperado. Se determinaron por espectrofotometría UV-Vis a T= 37 °C y I=0.15 M y CZE en T= 37 °C y fuerza iónica variable, por un método gráfico y el programa computacional SQUAD, observando que para la mayoría de los casos SQUAD tiene un mejor tratamiento, ya que mientras éste toma valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda, el método gráfico solamente se realiza para una longitud de onda cada vez.

Los valores determinados de pKa, utilizando el programa SQUAD, por UV-Vis y ECZ, difieren a lo más en un 3.33%; lo que puede atribuirse a que se trabajó a diferentes valores de fuerza iónica.

En cuanto a los datos estimados los cálculos con química computacional (Gaussian 03), se observó que el valor de pKa<sub>1</sub> da un error mayor comparado con los datos experimentales, mientras que para el pKa<sub>2</sub> tiene un error más pequeño, posiblemente a la forma de calibración de los cálculos por Gaussian 03.

Con los valores de pKa estimados por ACD/pKa, son muy cercanos a los valores experimentales, teniendo mayor error en el cálculo comparado con la parte experimental en el pKa<sub>2</sub>

Los esquemas de desprotonación se determinan mediante cálculos teóricos. Se encontró que los compuestos estudiados dan lugar a dos diferentes esquemas: si el sustituyente en la posición *para*- al fenol es electroattractor se desprotona primero el grupo feno, pero si dicho sustituyente es electrodonador se desprotona primero el grupo tiomorfolínico. Posiblemente esto se debe a que los grupos electroattractores estabilizan al anfolito como zwitterión, en tanto que los electrodonadores no lo hacen (estabilizan al anfolito molecular neutro). Esto confirma lo observado para LQM simialres con grupos piperidínicos (en lugar de los tiomorfolínicos).

Se determinaron experimentalmente los coeficientes de partición de los cuatro compuestos estudiados en este trabajo y se observó que el valor de LogP aumenta conforme el carácter electrodonador del sustituyente en la posición *para*- al fenol aumenta, lo que coincide con los cálculos efectuados.

Los resultados teóricos permiten proponer que la especie neutra del derivado Br, podría conferirle una menor solubilidad en el agua y una mayor afinidad a las membranas lipídicas.

Los valores determinados de pKa y LogP para los cuatro compuestos estudiados cumplen con las reglas de Lipinski.

Estos resultados experimentales permiten esperar un mejor comportamiento fisiológico en el orden:



## CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS

Determinar la interacción de los cuatro compuestos tiomorfolínicos con diferentes iones metálicos (Hierro, Zinc y Cobre), los cuales puedan formar complejos.

Realizar estudios de Resonancia Magnética Nuclear para poder asignar con certeza cuales con los protones que intervienen en las reacciones ácido-base.

Hacer corrección de fuerza iónica, para reducir la diferencia de las constantes de acidez entre ambas técnicas.

## CAPITULO IX. BIBLIOGRAFÍA

📖 Abrego V. H., Martínez-Pérez B., Torres L. A., Ángeles E., Martínez L., Marroquin-Pascual J. Lorena, Moya-Hernández Rosario, Amaro-Rencillas H. A.,Rodriguez-Barrientos D. and Rojas A. “Antihypertensive and antiarrhythmic properties of a para-hydroxylbis(ortho-morpholinymethyl)phenyl-1,4-DHP compound: Comparison with other compounds of the same kind and relationship with LogP values”. *European Journal of. Medical. Chemistry*, 45, 4622-4630, (2010).

📖 ACDLogP está disponible por ACD Labs, Toronto Canadá, <http://www.acdlabs.com>. (Julio, 2010).

📖 Advanced Chemistry Development, ACD/pKa DB 5.0, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto Canada (1994-2001).

📖 Barone, V.; Cossi, M and Tomasi J. “A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model”, *J. Chem. Phys*, 107, 3210 (1997)

📖 Bates R.G., “Determination of pH”. New York, John Wiley and Sons. (1973)

📖 Brown, T. N.; Mora-Diez, N. “Computational Determination of Aqueous pKa Values of Protonated Benzimidazoles (Part 1). *J. Phys. Chem. B*, 110, 9270–9279, (2006).

📖 Cances, M. T.; Mennucci, B.; Tomasi, J. “A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics”. *J. Chem. Phys.* 107, 3032–3041. (1997).

📖 Caret RL., Wingrove AS., *Química Orgánica*. Harla. Mexico pág 559-572, (1984).

📖 Castillo A., Revilla A., López R., Rivera P. *Fundamentos de electroforesis capilar*. Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM), Facultad de estudios superiores Cuautitlán. 1ra. Edición. México (2005).

📖 Cela, R. A. Lorenzo, Ma del C. Casáis, *Técnicas de separación en química analítica*, editorial Síntesis (2002).

📖 Del Rio J. *Farmacología Básica*. Ed. Síntesis, S. A. Madrid España. (2003).

📖 Determinar la interacción de los cuatro compuestos tiomorfolínicos con diferentes iones metálicos (Hierro, Zinc y Cobre), los cuales puedan formar complejos.

📖 Fessenden R., Fessenden J., *Química Orgánica*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C. V. (1983).

📖 Frisch Æ. Frisch M. Trucks, G. W. “Gaussian 03 User’s reference” Gaussian Inc.: Wallingford, (2003)

📖 Frisch, M. J.; Trucks, G. W. “Gaussian 03, revision E.01”; Gaussian, Inc.: Wallingford, (2003).

📖 Gómez B. “Determinación de constantes de acidez de la mangiferina y su interacción con algunos iones metálicos en medio acuoso”. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.(2006)

📖 Gómez-Zaleta B. Ramírez-Silva M.T., Gutierrez A., González-Vergara E., Güizado-Rodríguez M., Rojas-Hernandez A., UV/vis,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa Values. *Spectrochim Acta S Mol Biomol Spectrosc* 64 1002-1009. (2006).

📖 Hacer una corrección de fuerza iónica, para reducir la diferencia de las constantes obtenida por ambas técnicas

📖 Hartley F.R., Burgués, C., Alcock R.M. "Solution Equilibria". Wiley Chinchester, (1880).

📖 Havel J., Jancar. L. Scripta. 20, 7, 295 (1990).

📖 Henchoz Y. Schappler J. Geiser L. Rapid determination of pKa values of 20 amino acids by ECZ with UV and capacitively coupled contactless conductivity detections. Springer- Verlag 2007.

📖 [http://biblioteca.redescolar.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/112/htm/sec\\_17.htm](http://biblioteca.redescolar.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/112/htm/sec_17.htm)

📖 <http://www.facmed.unam.mx>, (enero, 2012)

📖 <http://www.inegi.org.mx>, (enero, 2010)

📖 Islas J. M. "Determinación de constantes de acidez de compuestos piperidínicos de interés biológico". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. (2008).

📖 Islas-Martínez J. M., Rodríguez-Barrientos D., Galano A., Ángeles E., Ramírez-Silva M.T., and Rojas-Hernández A. Deprotonation mechanism of new antihypertensive piperidinylmethylphenols: A combined experimental and theoretical study. J. Phys. Chem. B., 113, pág. 11765-11774. (2010)

📖 Kamkare J.J. Anal. Chem. 43, 1322 (1970).

📖 Katzung G. Farmacología, Ed. El manual moderno S. A. de C.V. 1979.

📖 Kecewed 9 August 1996: accepted 14 August 1996

📖 Leggett D. Computational Methods for Determination of Formation Constants, New York, Plenum Press, 1985.

📖 Lipinski C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution Drug Discovery Today Technologies. Vol.1, 4, 337-341, (2004).

📖 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings” Feeney, P. J. Adv. Drug. Delivery. Rev. 23, 3-25 (1997).

📖 Llano, J.; Eriksson, L. A. First principles electrochemistry: Electrons and protons reacting as independent ions. J. Chem. Phys. 117, 10193–10206. (2002),

📖 Marroquín Pascual J. L., Ángeles Anguiano E., Torres Castañeda L. A., Morales Pérez A., Moya Hernández M. R. “Determinación de los valores de pKa del compuesto LQM 301 bajo condiciones pseudofisiológicas”. Memorias in extenso. XX Congreso Nacional de Química Analítica. 267-272. (2006). ISBN: 970-31-0671-4.

📖 Martínez del Valle I. Farmacología del Sistema Cardiovascular, Ed. McGraw Hill. México (2004).

📖 Massoud M. “Medupine and Dibudipine: A Review”. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics (IJPT). 2, 25-29. (2003).

📖 Mennucci, B.; Cancès, E.; Tomasi, J. “Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method: Theoretical Bases, Computational Implementation, and Numerical Applications”. J. Phys. Chem. B. 101, 10506–10517. (1997b).

📖 Mennucci, B.; Tomasi, J. “Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute’s charge distribution and cavity boundaries”. J. Chem. Phys 106, 5151–5158. (1997a).

📖 Mofaddel N. Bar D.. Villemin P. Desbène P.L., Determination of acidity constants of enolisable compounds by capillary electrophoresis, Anal Bional Chem. 380, 664-668. (2004).

📖 Molinspiration, Cheminformatics <http://www.molinspiration.com>. (Enero 2010).

📖 Montes M. G. “Síntesis de Derivados Tiomorfolínico LQM 317, 318, 319, 320, 321 y 326, con actividad antihipertensiva”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. (2005).

📖 Morrison R. T., Boyd R. N. Química Orgánica. Ed. Pearson Addison-Wesley Iberoamericana (1990).

📖 Poole S. K. Patel S. Dehring K. Workman H. Poole C. F. “Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis”. Journal of chromatography A. 1037, 445-454, (2004).

📖 Realizar estudios de Resonancia Magnética Nuclear para poder asignar con certeza cuales con los protones que intervienen en las reacciones ácido-base.

📖 Rodríguez-Barrientos D., Rojas-Hernández A., Gutiérrez A. Moya-Hernandez R. Gómez-Balderas R. Ramírez-Silva M.T. “Determination of pKa values of tenoxicam from <sup>1</sup>H NMR chemical shifts and of oxicams from electrophoretic mobilities (CZE) with the aid of programs SQUAD and HYPNMR. Talanta, 80, 754-762. (2009).

📖 Rojas-Hernández A., Martínez-Pérez B., Ángeles E. “Determinación de los valores de los coeficientes de reparto Octanol/Agua de quince compuestos de la serie LQM300”. XLIV Congreso Mexicano de Química. Comunicación oral. (2009).

📖 Sandmann S., Unger T. L-and T-type calcium channel blockade- the efficacy of the calcium channel antagonist mibefradil. Journal of Clinical and Basic Cardiology. 2, 187-201. (1999).

📖 Sanpedro-Montoya K., Martínez-Pérez B., Galano A., Ángeles E., Abrego V.H., Ramírez-Silva M.T. and Rojas-Hernández A. Deprotonation Mechanism and LogP values of new antihypertensive thiomorpholinylmethylphenols: A combined experimental and theoretical study . J. Chem. Eng. Data, 55, 4323-4331. (2010).

📖 Sierra Zenteno Araceli, “Determinación de las constantes de acidez del 2-(Aminometil)Bencimidazol por RMN de  $^{13}\text{C}$ , espectrofotometría y potenciometría”. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. (2002).

📖 Skoog D. A., Holler J., Crouch S. R., “Principios de análisis instrumental”, 5ta Ed. Mac Graw Hill. Madrid (1992).

📖 Stout D. M. , Matier W. L., Barcelon-Yang C., Reynolds R. D. and Brown B. S. “Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic. Properties of substituted phenols 1. Heteroarylamine derivates. J. Med. Chem. 26, 808-813. (1983).

📖 Stout D. M., Matier W. L., Barcelon-Yang C., Reynolds R. D., and Brown B. S. “Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols 3. Modifications to the linkage region (region 3)”. J. Med. Chem., 28, 295-298. (1985).

📖 Stout D.M, Matier W. L., Barcelon-Yang C., Reynolds R. D. and Brown B. S. “Synthesis and antiarrhythmic and parasympholytic properties of substituted phenols 2. Amides”. J. Med. Chem, 27, . 1347-1350. (1984).

📖 Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E. “The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. J. Mol. Struct. (THEOCHEM), 464, 211–226, (1999).

📖 VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>. (Enero, 2010)

📖 Vega de Kuyper. J. C., “Química Orgánica para estudiantes de ingeniería”. Ed. Alfaomega.México D.F., (2000).

📖 Velázquez A. M., Martínez L., Abrego V., Balboa M., Torres L., Camacho B., Díaz S., López R. and Ángeles E. Synthesis and antihypertensive effects of new methylmorpholinphenol derivates. European J. Med. Chem. 33, 486-500. (2007).

📖 Velázquez, A. M, Torres L., Díaz G., Ramírez A., Hernández R. Santillán H. Martínez L.,Díaz-Barriga S. Abrego V., Balboa M. A., Camacho B., Lopez-Castañeda R.,



Dueñas-González A., Cabrera G., Ángeles E. “A novel one pot, solvent-free Mannich synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols, and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation”. ARKIVOC (ii), 150-161. (2006).

📖 Wade L.G., “Química Orgánica” .Ed. Pearson Prentice Hall. España (2004).

📖 Wallace R. M., Katz S. M. J. A Method for the Determination of Rank en the Anakysis of Absorption Spectra of Multicomponent Systems. J. Phys. Chem. 68, 3890-3892. (1964).

📖 Westcott C. C., “pH Measurements, New York, Academic Press, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”, Orlando (1978).