

**INTERACCION DEL POLIETER MACROCICLICO
DIBENZO-18-CORONA-6 CON METALES DE TRANSICION
PRESENTES EN LA CADENA DE TRANSPORTE
DE ELECTRONES MITOCONDRIAL**

UAM-I
- CBS

**✓ TESIS QUE PRESENTA
✓ ENIKA SOFIA PIEDRAS RENTERIA
PARA OBTENER EL GRADO DE
✓ MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

MEXICO.D.F., 1989 ✓

U. A. M. NEAPALAPA BIBLIOTECA

087382

25 - 92
Fey. J.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUIMICA
Y BIOFISICA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA, BAJO LA
DIRECCION DE

DR. SERGIO ESTRADA-O.

TUTOR

M EN C. MIREYA TORO CALZADA.

ASESOR

DRA. LIGIA TORO CALZADA.

ASESOR

DR. HELIODORO CELIS.

ASESOR

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa cuenta con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio del subsidio 2115-007945 para el fortalecimiento del posgrado nacional.

A mi Padre y a mi Madre.

A mis hermanos:

Miguel y Rosa, y Julieta.

A Julio.

RESUMEN

En este Trabajo se estudió la interacción del políeter macrocíclico Dibenzo-18-corona-6 con Fe y Cu.

Se encontró que el Dibenzo-18-corona-6 (DB18C6) forma complejos con Fe (II) y Fe (III), utilizando los cloruros metálicos de ambos iones ; y no lo hace con Cu (bajo las mismas condiciones experimentales). La relación estequiométrica políeter-cación de los complejos de Fe (II) y Fe (III) es de 1:1, para ambos casos.

Se encontró que los cambios en las características fisicoquímicas del medio (momento dipolar y constante dieléctrica) provocan cambios en la selectividad iónica del políeter, de K^+ hacia Fe (II) y Fe (III); existiendo una región crítica de polaridad e hidrofobicidad, donde ocurre la inversión.

Se propone una hipótesis del mecanismo por el cual el políeter inhibe el transporte de electrones mitocondrial, correlacionando este efecto con los hallazgos experimentales del presente Trabajo.

CONTENIDO.

	PAG.
I. INTRODUCCION.....	1
1. TRANSLCADORES IONICOS.....	2
2. ACARREADORES IONICOS SINTETICOS.....	5
3. LOS POLIETERES MACROCICLICOS.....	7
A. ESTRUCTURA QUIMICA.....	7
B. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INTERACCION POLIETER-CATION.....	8
4. ALTERACIONES CAUSADAS POR LOS POLIETERES MACROCICLICOS EN SISTEMAS BIOLOGICOS.....	14
A. EFECTO TOXICOLOGICO.....	15
B. EFECTO A NIVEL DE LA TRANSDUCCION DE ENERGIA.....	16
5. EL SISTEMA DE FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL.....	17
A. CADENA RESPIRATORIA.....	19
a. EL COMPLEJO I: NADH:UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA.....	20
i) Composición.....	20
ii) Propiedades espectrales.....	21
iii) Estructura.....	22
iv) Propiedades catalíticas.....	24
v) Inhibidores.....	25
6. EL DIBENZO-18CORONA-6 Y SU CAPACIDAD DE INHIBICION EN EL COMPLEJO I DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCON- DRIAL.....	26
7. OBJETIVOS.....	27
A. OBJETIVO GENERAL.....	27
B. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
 II. MATERIAL Y METODOS.....	 28
MATERIALES.	
1. REACTIVOS QUIMICOS.....	29
2. APARATOS.....	29

087382

M E T O D O S.....	31
1. FORMACION DE LOS COMPLEJO POLIETER-CATION.....	31
A. PURIFICACION ORGANICA DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION.....	32
2. DETECCION ESPECTROSCOPICA DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION.....	34
3. DETERMINACION DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION.....	38
A. CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DE CATION EN LOS COMPLEJOS.....	38
a. Cuantificación de Fe (II) y Fe (III).....	38
i) Curva de Calibración.....	40
b. Cuantificación de Cu (II).....	42
B. CALCULO DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA.....	44
4. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE EXTRACCION DE LOS COMPLEJOS.....	45
A. DEFINICION.....	45
B. PROCEDIMIENTO.....	46
C. CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	47
D. CUANTIFICACION DEL COMPLEJO POLIETER-METAL..	48
a. Cuantificación de Fe (II) y Fe (III).....	50
b. Cuantificación de K ⁺	50
i) Curva de calibración de K ⁺	51
5. ESTADISTICA.....	54
 III. R E S U L T A D O S	55
1. OBTENCION DE LOS COMPLEJOS DIBENZO-18-CORONA-6 CON Fe (II), Fe (III) Y Cu (II).....	55
2. DETECCION ESPECTROSCOPICA DE LOS COMPLEJOS.....	56
1. DETECCION ESPECTROSCOPICA DE LA FORMACION <i>IN</i> <i>SITU</i> DEL COMPLEJO DIBENZO-18-CORONA-6 CON Fe (III).....	56
2. DETECCION ESPECTROSCOPICA DE LOS COMPLEJOS FORMADOS POR SATURACION QUIMICA.....	60
a. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.....	60

i)Complejo Dibenzo-18-corona-6-Fe (II)....	60
ii)Complejo Dibenzo-18-corona-6-Fe (III)..	63
iii)Complejo Dibenzo-18-corona-6-Cu (II)..	66
b.ESPECTROSCOPIA VISIBLE.....	70
3. QUANTIFICACION DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA	
POLIETER-METAL DE LOS COMPLEJOS.....	71
4. OBTENCION DE LAS CONSTANTES DE EXTRACCION K_{ex} DE	
LOS COMPLEJOS.....	73
A. EFECTO DE LA HIDROFOBICIDAD (ϵ) DEL SOLVENTE	
EN LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR DB18C6..	75
B. EFECTO DE LA POLARIDAD (μ) DEL SOLVENTE EN	
LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR DB18C6.....	77
V. D I S C U S I O N	81
1. EL DIBENZO-18-CORONA-6 FORMA COMPLEJOS 1:1 CON Fe	
(II) Y Fe (III).Y NO INTERACTUA CON Cu (II)EL	
CONTRAION UTILIZADO INFLUYE EN LA COMPLEJACION....	81
2. LA AFINIDAD EN LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR	
DIBENZO-18-CORONA-6 DEPENDE EN GRAN MEDIDA DE LAS	
CONDICIONES FISICOQUIMICAS DEL MEDIO.....	83
3. POSIBLE CORRELACION ENTRE EL CAMBIO EN LA AFINIDAD	
IONICA DEL DIBENZO-18-CORONA-6 Y SU EFECTO A NIVEL	
DE CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	87
V C O N C L U S I O N E S	91
VI. L I T E R A T U R A C I T A D A	93
A G R A D E C I M I E N T O S	106

ABREVIATURAS

Ag	Plata
Al	Aluminio
As	Arsénico
ATP	Trifosfato de adenosina
Au	Oro
Ba	Bario
C	Carbono
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Ce	Cerio
C18C6	Ciclohexil-18-corona-6
18C6	18-corona-6
15C5	15-corona-5
12C4	12-corona-4
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cs	Cesio
Cu	Cobre
DB18C6	Dibenzo-18-corona-6
DB21C7	Dibenzo-21-corona-7
DB24C8	Dibenzo-24-corona-8
DC18C6	Diciclohexil-18-corona-6
DC24C8	Diciclohexil-24-corona-8
DL ₅₀	Dosis letal 50
DMF	Dimetilformamida
ϵ	Coefficiente de extinción molar ($\text{m}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
ϵ	Constante dieléctrica
<i>et al</i>	<i>Et alibi</i>
Eu	Europio
F	Fluor
Fe	Hierro
FMN	Flavín mononucleótido
Ga	Galio
Gd	Gadolinio
Hg	Mercurio
HP	Fracción proteica hidrófoba
I	Yodo
IP	Fracción proteica de hierro
K	Potasio
Kd	Kilodaltons
K _{ex}	Constante de extracción
l	Litro
La	Lantano
Li	Litio
Lu	Lutecio
Log	Logaritmo en base 10
λ	Longitud de onda
M	Molar
Mg	Magnesio
ml	Mililitro
μM	Micromolar

Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
mV	Milivoltios
μ	Momento dipolar (debyes)
$\Delta\mu$ +	Gradiente de potencial electroquímico de H^+
Na	Sodio
NADH	Nicotín adenín dinucleótido, reducido
Nia-N5	Centros Fe-S de la NADH deshidrogenasa
Nd	Niódinio
Ni	Níquel
nm	Nanometro
O	Oxígeno
Pb	Plomo
Pr	Praseodimio
p/v	peso/volumen
Ra	Radio
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre
Se	Selenio
Sn	Estaño
Sr	Estroncio
σ_{n-1}	Desviación estándar por muestreo
UV	Ultravioleta
V	Vanadio
VIS	Visible
vs	versus
Yb	Yterbio
Zn	Zinc
'	Minutos

I. INTRODUCCION.

Dentro de los elementos esenciales para la vida de todos los organismos, además de los elementos químicos que constituyen a las biomoléculas, existen otros componentes cuya presencia es necesaria para el funcionamiento de los seres vivos. Tanto los macroelementos, como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , S y P; como los elementos traza, como el I, Br, Al, Sn, Cr, Ni, Mo, V, Se, Fe, Cu, Mn, Zn, Co, As, F y silicón, son requeridos para la vida y la funcionalidad celular.

Las expresiones funcionales de estos últimos metales son muy variadas y complejas debido a que pueden ser: partes constitutivas de enzimas y proteínas, funcionar como cofactores; ó ser elementos necesarios para la biosíntesis de proteínas y el desarrollo de tejidos, entre otros. En el aspecto de la funcionalidad enzimática, los elementos traza -como es el caso del Fe y Cu- pueden estar involucrados en procesos tan finamente regulados, como es la transferencia de electrones de sistemas transductores de energía.

Para entender la naturaleza de la interacción entre los elementos celulares y los metales, se ha estudiado la dinámica de la formación de complejos metálicos, utilizando para ello a moléculas modelo. En estos estudios, se asume que existirán características comunes de interacción metal-ligando, entre los procesos de

clatración metálica con las moléculas modelo y los fenómenos análogos a nivel biológico. Por otra parte, los translocadores iónicos modelo también se utilizan como instrumentos moleculares para la prospección experimental de la interacción con metales que son transportados a través de la membrana de la célula.

En paralelo a los conceptos antes señalados, en el presente trabajo se estudió la interacción de un translocador iónico modelo -el poliéter macrocíclico Dibenzo-18-corona-6 - con metales de transición presentes en los sistemas enzimáticos de transferencia de electrones. Las observaciones experimentales realizadas, permiten sugerir un modelo de clatración metálica en el microambiente de una molécula transductora de energía, como parte de la explicación del mecanismo de acción por el cual el poliéter Dibenzo-18-corona-6 interfiere con el transporte de electrones a nivel de la NADH deshidrogenasa, localizada en la membrana interna mitocondrial.

1. TRANSLOCADORES IONICOS.

Los translocadores iónicos modelo son, como su nombre lo indica, moléculas capaces de movilizar iones a través de barreras lipídicas. Pueden ser naturales o sintéticos, siendo los primeros sintetizados en sistemas biológicos y los segundos los producidos por medio de síntesis química. Por su mecanismo para transportar a los

iones, se clasifican en dos tipos: canales iónicos y acarreadores móviles o ionóforos (Gómez Fuyou & Gómez-Lojero, 1977; Reed, 1979; Szabo, 1981).

Los canales iónicos son estructuras que abarcan el grosor de las membranas y rompen su continuidad al crear canales acuosos a través de los cuales permean libremente iones y agua. Algunos ejemplos de este tipo de moléculas son la gramicidina y la monazomicina. (Müller & Rudin, 1967; Reed, 1979; Szabo, 1981).

Los acarreadores móviles o ionóforos translocan cationes a través de matrices hidrófobas, por medio de la formación de complejos liposolubles que aumentan la permeabilidad iónica en el sistema. Este tipo de moléculas se ejemplifica por la valinomicina (Moore & Pressman, 1964; Pressman et al., 1967). A la fecha no ha sido posible aislar y cristalizar un ionóforo a partir de membranas biológicas de organismos uni ó multicelulares. Solamente se han aislado moléculas provenientes de actinomicetos, que actúan como ionóforos en membranas lipídicas, pero no se puede afirmar que sea esta su función en los organismos de donde fueron extraídos; por esta razón, la totalidad de los ionóforos que se estudian actualmente se consideran ionóforos modelo.

A su vez, los ionóforos pueden ser de dos tipos, de acuerdo a su estructura química: carboxílicos y

neutros. Los ionóforos carboxílicos son polímeros de cadena abierta que contienen un grupo carboxilo terminal; al clatrar a los iones cierran su cadena sobre estos, por medio de interacciones químicas. Algunos ejemplos de estas moléculas son la nigericina, el ácido lasalócido y la monensina (Estrada-O et al., 1967a y b; Celis et al., 1967; Reed, 1979; Szabo, 1981).

Los ionóforos neutros presentan estructuras cerradas carentes de grupos ionizables, contienen una cavidad interna formada por grupos polares que interactúan con el clatrato, mientras que su exterior hidrófobo les confiere una alta liposolubilidad. Este grupo se encuentra representado por la valinomicina, los polímeros macrocíclicos y las antamánidas (Pedersen, 1967; Reed, 1979; Szabo, 1981; Pressman, 1968 y 1973).

El estudio de los translocadores iónicos empieza en la década de los sesentas, al descubrirse la actividad ionofórica de cierto número de moléculas aisladas a partir de actinomicetos; de esta manera se inicia el estudio de estos antibióticos cuya función biológica en los organismos que la producen no está bien elucidada actualmente. Estas estructuras son importantes debido a que aportan datos en el estudio de mecanismos de movilización iónica a través de membranas sintéticas y naturales (Pressman, 1968 y 1973; Landy et al., 1967; Tosteson, 1968).

A partir de ese momento se empiezan a establecer los patrones de selectividad iónica de los ionóforos existentes, así como sus efectos sobre diversos sistemas biológicos (Pressman, 1968 y 1973; Lardy, 1968; Tosteson, 1968). Todos los ionóforos mencionados anteriormente -a excepción de los poliéteres macrocíclicos- son moléculas que se encuentran en la naturaleza.

2. ACARREADORES IONICOS SINTETICOS.

Paralelamente al estudio de los ionóforos de origen natural, surge la química de los ligandos multidentados. Estas moléculas con ligandos artificiales del tipo de ionóforos neutros, que fueron diseñadas *ex profeso* para la catálisis química de derivados del petróleo, procesos de separación orgánica y de clatración metálica (Lehn, 1988; Cram, 1988; Pedersen, 1988). La característica general de estas moléculas es que todas ellas interactúan -en mayor o menor grado- con cationes metálicos y algunas otras especies cargadas.

A partir de este momento se instaure el estudio de la química de los complejos ligando-metal y sus posibles aplicaciones. En las últimas décadas se ha explotado esta línea para el diseño y la síntesis de centenares de moléculas que presenten funciones

previamente establecidas: tanto a nivel industrial, como es en la extracción iónica de radioisótopos (Gerow et al, 1981; Jagur-Grodzinski, 1985); para la separación de iones (Shanzer et al, 1983); como a nivel experimental, en muy diversos campos, como es el diseño de pigmentos catión- selectivos (Dix & Vögtle, 1980); como constituyentes base para electrodos selectivos de moléculas cargadas (Shirahama et al, 1983; Kimura et al, 1983; Kimura et al, 1984 a y b; Kitazawa et al, 1984; Shinar et al, 1986; Kamata et al, 1988); como marcadores de anticuerpos dirigidos contra células cancerígenas (Moi et al, 1985; Morphy et al, 1988); para el diseño de movilizadores iónicos de posible uso médico (Pannell et al, 1982; Pannell et al, 1984; Pannell et al, 1987); para facilitar la solubilización de proteínas y DNA (Boyer & Odell, 1985; Odell & Earlam, 1985; Odell, 1985); para el diseño de canales iónicos sintéticos (Nolte et al, 1984); para el estudio de la relación estructura-actividad de agentes adrenérgicos (Hayakawa et al, 1988); y como rastreadores en experimentos de transiciones de fase (Herrmann et al, 1984; Tsukube et al, 1986).

Los poliéteres macrocíclicos pertenecen a esta categoría de translocadores iónicos.

Por sus aportaciones, el Premio Nobel de Química de 1987 les fué adjudicado a los científicos que inicialmente diseñaron estas moléculas sintéticas:

3. LOS POLIÉTERES MACROCÍCLICOS.

En 1967, Charles J. Pedersen sintetiza 60 estructuras diferentes a las que denomina genericamente polióteres macrocíclicos. Su característica en común es que poseen cavidades hidrofílicas centrales que interactúan directamente con los iones o moléculas clatradas, y que presentan substituyentes hidrófobos en la parte exterior de su molécula que la hacen liposoluble (Pedersen, 1967 a y b, 1968, 1970 a y b, 1988).

A. ESTRUCTURA QUÍMICA.

Los polióteres macrocíclicos, como su nombre lo indica, contienen desde 3 a 20 grupos éter que conforman el anillo central o CORONA de la molécula. En esta porción se realiza la interacción con el clatrato, por atracciones de tipo ión-dipolo entre los oxígenos de la corona y el catión clatrado. Por otro lado, el tipo y la cantidad de grupos substituyentes en el exterior de la molécula, le conferirá su grado de liposolubilidad (Pedersen, 1967 a y b, 1968, 1970 a y b).

Para facilitar la designación de los éteres coronados, se ideó una nomenclatura trivial, en la que

primero se señalan los substituyentes que se encuentran al lado del anillo:luego se enumera la cantidad total de átomos que están en el anillo,seguido de la palabra CORONA; y finalmente se señala el número de átomos de oxígeno presentes en el anillo central (Pedersen 1967b).

La figura 1 muestra las estructuras químicas de algunos de los éteres macrocíclicos sintetizados originalmente por Pedersen.

B FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INTERACCION POLIETER-CATION.

Una vez caracterizadas las estructuras de estas moléculas,se estudió la naturaleza de los complejos que forman con los cationes, aislando los complejos cristalinos en estado sólido,observando la solubilidad de sus sales en solventes orgánicos y agua,haciendo extracciones orgánicas de cationes y analizando por espectroscopia UV las interacciones poliéter-cación (Pedersen,1967 a y b,1968,1970 a y b).

Actualmente se sabe que los éteres corona interactúan con cationes monovalentes: Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ (Pedersen 1967 a y b,1968,1970 a y b; Frensdorff,1970; Izatt et al,1969 y 1976; Lamb et al,1980 a,b,c,d y e); cationes divalentes: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} y Ra^{2+} (Pedersen,1967a y b,1968,1970a y b; Izatt et al,1976; Lamb et al 1980c; Strzelbicki & Bartsch,1981a); metales

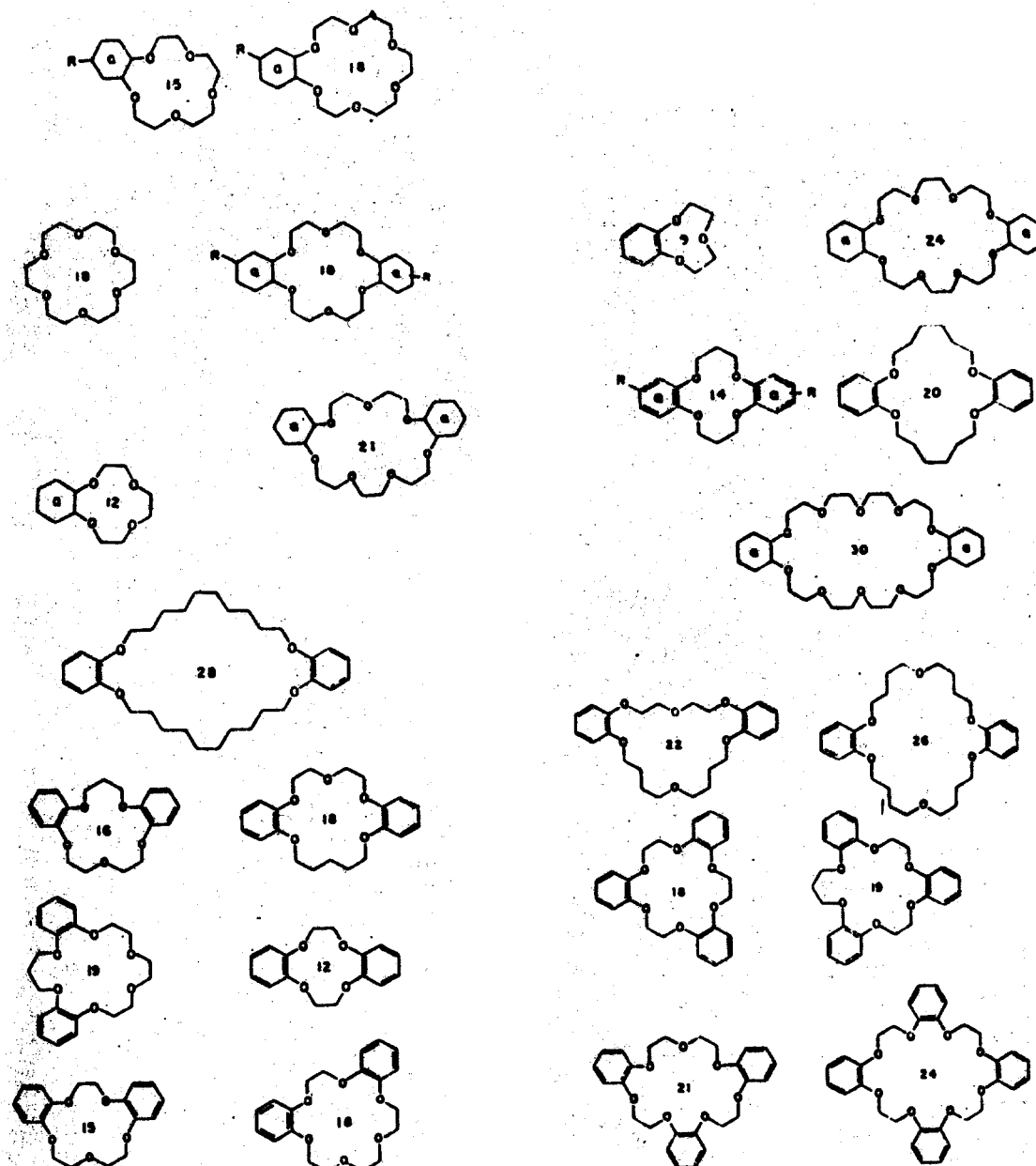


Figura 1. Estructura química de algunos polióteres macrocíclicos. Los números escritos en el centro de cada estructura corresponden al número de átomos totales de la corona. (Tomado de Pedersen, C. J., J. Am. Chem. Soc., 89, 2470-2480, 1967.)

pesados: Tl^+ y Pb^{2+} (Pedersen 1967b; Lamb et al, 1980; Arias Abrodo et al, 1984); tierras raras: La, Ce, Nd, Yb, Pr, Eu, Gd-Lu, La-Lu, La-Gd, Eu-Sm, La-Eu, La-Nd, Eu-Yb (Pedersen 1967b; Bombieri et al, 1980; Bartsch et al, 1983; Bünzli et al, 1984); metales de transición: Cu (II), Ag (I), Au (I, II), Zn (II), Cd (II), Hg (I, II), V (III), Fe (III), Ni (II) y Co (II) (Pedersen 1967a y b; Abraham & Marji, 1985; Buschmann, 1985; Koshima & Ohnishi, 1985 y 1986; Yatsimirskii et al, 1986); Ga(III), Tl (III) y Sb (III, V) (Koshima & Ohnishi, 1986); algunas aminas biológicas: cocaína, dibucaina, hexilcaina, benzocaina, procaina, bupivacaina, tetracaina, lidocaina, trebutilamonio y terbutilisotiouronio (Shirahama et al, 1983; de Boer & Reinhoudt, 1985; Reinhoudt et al, 1985); amidas [tiourea] (Hilgenfeld & Saenger, 1981); iones hidronio (Behr et al, 1982); sales de diazonio (Hashida & Matsui, 1980); y iones oxonio (Jagur-Grodzinski, 1985). Sin embargo, independientemente de que los éteres coronados puedan interactuar con los cationes mencionados, se sabe que estos ligandos son altamente selectivos a cationes monovalentes (Pedersen, 1967b; Izatt et al, 1976; Lamb et al, 1980c).

El estudio a nivel fisicoquímico de la interacción polióter-cación, puede analizarse desde cuatro aspectos diferentes: complejación, selectividad, extracción en sistemas de dos fases y transporte a través de barreras lipídicas.

interacción poliéter-cación:

i) El diámetro iónico (Pedersen, 1967b; Frensdorff, 1970; Izatt, 1976; Lamb et al, 1980a; Man et al, 1985; Hancock et al, 1988).

ii) El diámetro interno del poliéter, es decir, el diámetro interno de la corona, que está dado por el número de oxígenos que contenga.

Experimentos realizados por Pedersen en 1967, indican que los poliéteres que clatan iones con mayor efectividad contienen de 5 a 10 átomos de oxígeno separados entre sí por dos átomos de carbono. Los poliéteres que contienen 4 átomos de oxígeno en su corona son más afines a Li, aquellos que contienen 5 interactúan con Na, y los de 6 oxígenos lo hacen preferentemente con K (Pedersen, 1967a; Frensdorff, 1970; Izatt et al, 1976; Dix et al, 1980; Man et al, 1985; Grootenhuis et al, 1985).

iii) La coplanaridad de los átomos de oxígeno de la corona. Esto significa que serán más estables en la interacción con los cationes, las moléculas en cuyas estructuras se encuentran los oxígenos dispuestos en el mismo plano y/o aquellas en las que los vértices de los ángulos formados por las uniones C-O-C estén dirigidos hacia el centro del mismo plano (Pedersen, 1967b).

iv) La posición simétrica de los átomos de oxígeno (Pedersen, 1967b).

v) El impedimento estérico producido al substituir alguno de los oxígenos del anillo por otro elemento de mayor tamaño, restará estabilidad al complejo. (Pedersen, 1967b; Bradshaw et al., 1980; Adam et al., 1985; Dijkstra et al., 1988).

vi) La presencia de grupos substituyentes en la cadena lateral del poliéter (Mizuno et al., 1980; Strzelbicki et al., 1981; Kimura et al., 1983; Otsuka et al., 1983; Taguchi et al., 1984; White et al., 1985; Tsukube et al., 1986a y b).

vii) La carga eléctrica del ión (Pedersen, 1967b).

viii) La tendencia del ión a asociarse con agua ó con el solvente orgánico (Pedersen, 1967b; Haynes et al., 1974; Izatt et al., 1976; Iwachido et al., 1980; Hashida et al., 1980; de Boer & Reinhoudt, 1985; Man et al., 1985; Reinhoudt et al., 1985; Rodrigue et al., 1986; Tabeta et al., 1986).

ix) El tipo de anión acompañante (contraión) (Pedersen, 1968; Wong et al., 1974; Christensen et al., 1978; Lamb et al., 1980c y d; Burgard et al., 1983; Tsukube et al., 1986).

x) La solubilidad del poliéter, de la sal y del complejo poliéter-metal-anión (Pedersen 1967b; Lamb et al., 1980d).

Factores que influyen en la selectividad iónica del poliéter:

Además de los factores mencionados, los cambios en la polarizabilidad de los grupos éter de la corona, inducidos por sustituciones químicas tanto en la corona como en la cadena lateral; provocará cambios de selectividad iónica del poliéter. De esta manera, si algunos oxígenos son substituidos por Nitrógeno (Aza-coronados) o Azufre (Tioéteres), estas moléculas presentarán marcadas selectividades por Ag^+ y/o Cu^{2+} (Pedersen, 1967b; Bradshaw et al, 1980; Kimura et al, 1984; Lupo et al, 1984a y b; Kushi et al, 1985; Lupo & Tarrago, 1985).

Factores que influyen en la extracción iónica del poliéter:

En experimentos de extracción iónica en sistemas de dos fases, además de los factores mencionados, intervienen: la naturaleza y composición de las fases, la hidrofobicidad de los complejos poliéter-metal formados y de los solventes utilizados, y la energía de hidratación iónica (Hashida & Matsui, 1980; Iwachido et al, 1980; Strzelbicki & Bartsch, 1981; Gerow et al, 1981; Otsuka et al, 1983; de Boer & Reinhoudt, 1985; Yoshida & Hayano, 1986).

Factores que influyen en el transporte iónico de los poliéteres:

Para el transporte iónico, otros factores que influyen (además de los ya establecidos) son las cinéticas de:

- La interacción del poliéter con la sal metálica en la interfase, y su movilización hacia la fase hidrófoba.-La difusión del complejo acarreador-metal-anión en la matriz de la membrana.
- La liberación de los iones hacia la fase acuosa adyacente.
- La difusión del poliéter libre a través de la membrana.

Como es de esperarse, la velocidad de los procesos descritos está regulada por las constantes de equilibrio respectivas de cada semirreacción (Burgard et al.1982; Thomas et al.1983; Yoshida & Hayano.1985).

4. ALTERACIONES CAUSADAS POR LOS POLIETERES MACROCICLICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.

La capacidad de los poliéteres macrocíclicos para interactuar selectivamente con cationes monovalentes, conduce a considerarlos como moléculas eficaces en la translocación de iones a través de matrices lipídicas. Así, se ha observado que los poliéteres macrocíclicos son capaces de aumentar la conductancia en

bicapas lipídicas negras y naturales, en presencia de metales alcalinos (Eisenman et al, 1968 y 1973; Mc Laughlin et al, 1972; Haynes et al, 1974b).

A. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.

Existen reportes en la literatura acerca del efecto toxicológico de algunos éteres coronados, como son el 12-corona-4, 15-corona-6, Dibenzo-18-corona-6 y Diciclohexil-18corona-6. En animales experimentales pueden causar efectos neurológicos transitorios, parálisis de miembros posteriores, liberación de catecolaminas y/o atrofia testicular (Leong et al, 1974; Takayama et al, 1977; Hendrixson et al, 1978; Gad et al, 1978 y 1985). Estos efectos se observan al administrar dosis relativamente altas de poliéteres (la DL_{50} por vía intraperitoneal para ratas varía desde 10 a 1380 mg/kg de peso). La explicación para estos efectos -que no son de carácter fisiológico sino toxicológico- está dada por los autores en función a la afinidad iónica de cada poliéter; es decir, que los efectos observados se deben a cambios inducidos en los gradientes iónicos del sistema. Así, los efectos causados por los poliéteres DB18C6, DC18C6, DB24C8 y DC24C8 se considera que son debidos a perturbaciones de los gradientes de K^+ , mientras que los efectos del 18C6 y 12C4 ocurrirán al modificar las concentraciones de Na^+ (Leong et al, 1974; Takayama et al, 1977; Hendrixson et al, 1978; Gad et al, 1978 y 1985). Con respecto a la explicación dada en

la literatura de estas alteraciones fisiológicas fenómenos, las evidencias experimentales no son suficientes como para emitir una teoría del efecto toxicológico de los políéters (Gad et al. 1979); se requiere de un análisis a fondo del sistema experimental y sus variables, ya que los autores no analizan factores como la liposolubilidad de las moléculas, su comportamiento en sistemas acuosos, la interacción neta con cationes y la probable competencia de otras moléculas cargadas (aminas biológicas u otro tipo de cationes biológicos presentes en el sistema experimental).

B. EFECTO A NIVEL DE LA TRANSDUCCION DE ENERGIA.

Algunos éteres corona administrados a concentraciones discretas (en el orden de 1 a 0.1 μ M) son capaces de interferir el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, tanto en hepatocitos de rata como en otras preparaciones experimentales (Lardy, 1968; Estrada-O & Carabez, 1972; Tashmukhamedova et al, 1978; Carabez & Sandoval, 1981).

Principalmente el DB18C6 y el DC18C6, y en menor medida el DB21C7 y el DB24C8 inhiben el transporte de electrones a nivel del complejo enzimático I de la cadena respiratoria (NADH-Ubiquinona oxidoreductasa) (Estrada-O & Gómez-Lojero, 1976).

Las modificaciones químicas realizadas al

poliéter -en este caso al Dibenzo-18-corona-6- se traducen en cambios substanciales en su efecto inhibidor sobre el transporte de electrones mitocondrial (al grado de desaparecerlo) (Estrada-O & Gómez-Lonero, 1976).

Los compuestos que presentan mayor porcentaje de inhibición en presencia de K^+ , son el DB18C6 con 85 %, el DC18C6 (mezcla racémica) con 67 %, el DB21C7 con 51 % y el DC18C6 (*trans*) con 42 %. En presencia de Li^+ , todos estos poliéteres presentan el mismo porcentaje de inhibición, que es menor con respecto al producido con K^+ ; esto se debe a que en presencia de Li^+ ocurre un menor transporte de estos iones a través de la membrana mitocondrial. La inhibición del transporte de electrones inducida por los poliéteres macrocíclicos se ha explicado por la interacción de estos con cationes involucrados en la funcionalidad de la NADH deshidrogenasa (Estrada-O & Carabez, 1972), más no existen evidencias experimentales concluyentes para apoyar esta afirmación. Carabez y Sandoval (1981) sugieren que este efecto es debido a potasio, sin embargo, no se ha detectado por métodos directos la presencia de este ión en el complejo enzimático I.

5. EL SISTEMA DE FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL.

Como se ha establecido después de Mitchell (1962), las reacciones de producción y consumo de energía

mitocondrial se relacionan entre sí por medio de un circuito de protones. La transferencia de electrones a partir de los substratos de cadena respiratoria hasta el aceptor final (oxígeno molecular), produce una translocación vectorial de protones hacia el exterior de la membrana interna mitocondrial; este gradiente energético es utilizado para la síntesis de ATP, la translocación iónica y la importación de metabolitos.

En organismos eucariotes, el sistema de fosforilación oxidativa se encuentra contenido en la membrana interna mitocondrial, que está compuesta aproximadamente por un 70 % de proteína y un 30 % de lípidos (fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, y cardiolipina) (Fleischer et al, 1961).

Funcionalmente, el sistema se divide en 5 complejos enzimáticos (Hatefi, 1985);

- Complejo I: NADH:Ubiquinona oxidoreductasa
- Complejo II: Succinato:Ubiquinona oxidoreductasa
- Complejo III: Ubiquinol:Ferrocitocromo c oxidoreductasa
- Complejo IV: Ferrocitocromo c:oxígeno oxidoreductasa
- Complejo V: ATP sintetasa

A. CADENA RESPIRATORIA.

Los complejos I, II, III y IV junto a la ubiquinona y citocromo c constituyen a la cadena respiratoria, mientras que en la ATP sintetasa se lleva a cabo la fosforilación oxidativa.

Los acarreadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial pueden ser estructuras quinoides: FMN, FAD y quinonas, ó complejos de metales de transición: grupos Fe-S, grupos hemo y Cu unido a proteínas. Las estructuras quinoides así como los centros Fe-S predominan en regiones de potencial eléctrico (E_m) menor de 0 mV; los grupos hemo y el Cu ocurren en zonas de $E_m > 0$ (Wilson, 1974).

En los complejos I, III y IV, la energía oxidativa se conserva al acoplarse con la translocación vectorial de protones, creando un gradiente de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_H^+$) (Mitchell, 1978). Todo el sistema es reversible hasta el nivel del citocromo c; la transferencia de electrones desde citocromo c hacia el oxígeno es irreversible, esto provoca que el equilibrio del sistema sea desplazado hacia la síntesis de ATP (Hatefi, 1985).

A continuación se señalan las características estructurales y funcionales de la NADH deshidrogenasa, por ser de estricta relevancia al desarrollo del presente ensayo experimental.

a. EL COMPLEJO I. NADH:UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA.

Esta enzima fue aislada inicialmente por Youssef Hatefi en 1962. Solamente se ha podido aislar a partir de mitocondrias de corazón de bovino y de ave (Hatefi, 1978a). Las características principales de esta enzima se describen a continuación.

i) Composición.

La enzima está constituida por polipéptidos y coenzimas. Los componentes no-proteicos de este complejo son FMN, Fe no-hemo, Azufre lábil en ácido, quinona y fosfolípidos. La relación existente de FMN:Fe:S es de 1:22-24:22-24, mientras que el contenido de quinonas es variable. El contenido de lípidos del complejo es muy semejante al de la totalidad de la membrana interna mitocondrial (Hatefi, 1985).

Con respecto a las proteínas, los polipéptidos que constituyen al complejo I pueden dividirse en tres grupos, de acuerdo a su comportamiento al someterlos a técnicas de fraccionamiento: una fracción proteica de Fe-S hidrosoluble (IP), una fracción de flavoproteína Fe-S (FP), y una fracción hidrofóbica (HP), esta última contiene a todos los lípidos del complejo y polipéptidos en extremo hidrófobos (Hatefi, 1978b).

La fracción FP está constituida por una NADH deshidrogenasa de tipo diaforasa y presenta una alta especificidad por quinonas (incluyendo análogos de quinonas y citocromo c) y complejos férricos como aceptores de electrones. A pH < 6 cataliza también la transhidrogenación de NADH a NAD. Las fracciones HP e IP no presentan actividad catalítica (Hatefi & Stigall, 1976; Hatefi, 1985).

Existen de 5 a 6 centros Fe-S binucleares ($2\text{Fe}-2\text{S}$) y tres centros tetranucleares ($4\text{Fe}-4\text{S}$): las fracciones FP y HP tienen asociados un centro binuclear y uno tetranuclear a cada una de ellas; la fracción IP contiene tres centros binucleares y uno tetranuclear (Ohnishi, 1973; Hatefi & Stigall, 1976; Ohrme-Johnson & Ohrme-Johnson, 1978; Ohnishi, Ragan & Hatefi, 1985).

ii) Propiedades Espectrales.

Actualmente 4 de los centros Fe-S están plenamente confirmados (N1b , N2 , N3 y N4), y dos ellos aún son controversiales (N1a y N5). Los centros 1a y 1b son binucleares, mientras que el resto son tetranucleares. El orden en sus potenciales de reducción es: $\text{N2} > \text{N3} > \text{N4} > \text{N1b}$ (En aparente: -20 mV, -245 mV, -245 mV, -245 mV, respectivamente). Además de estos centros, se sabe que existen otros dos núcleos de Fe-S que son silenciosos en Resonancia del Espín Electrónico (ESR). (Ohnishi, 1973;

Hatefi, 1985; Ohnishi et al. 1985). Las señales de campo de los 5 centros Fe-S en Resonancia del Espín Electrónico son (Hatefi, et al. 1985):

Centro	Posición de Campo $\delta_{x,y,z}$
N1a	1.91, 1.95, 2.03
N1b	1.92, 1.94, 2.02
N2	1.92, 1.92, 2.05
N3	1.86, 1.93, 2.04
N4	1.87, 1.93, 2.10
N5	2.11, 1.93, 1.88

iii) Estructura.

Las fracciones FP e IP se encuentran rodeadas por polipéptidos de HP. En la *Figura 2* se puede observar una representación esquemática del arreglo espacial de las subunidades del complejo I.

La fracción IP contiene a las subunidades de 75, 49, 30 y 13 Kd, contiene también a los centros Fe-S N4 y N1a. Se sabe que en ausencia de las subunidades 75 y 13 Kd no se lleva a cabo el transporte de electrones (Capaldi, 1988).

La fracción FP contiene los bloques de 51, 24 y 9 Kd y a los centros N3 y N1b. El centro N3 se encuentra localizado en el fragmento 51 Kd, que se considera que es el polipéptido que contiene al grupo FMN; por lo tanto se

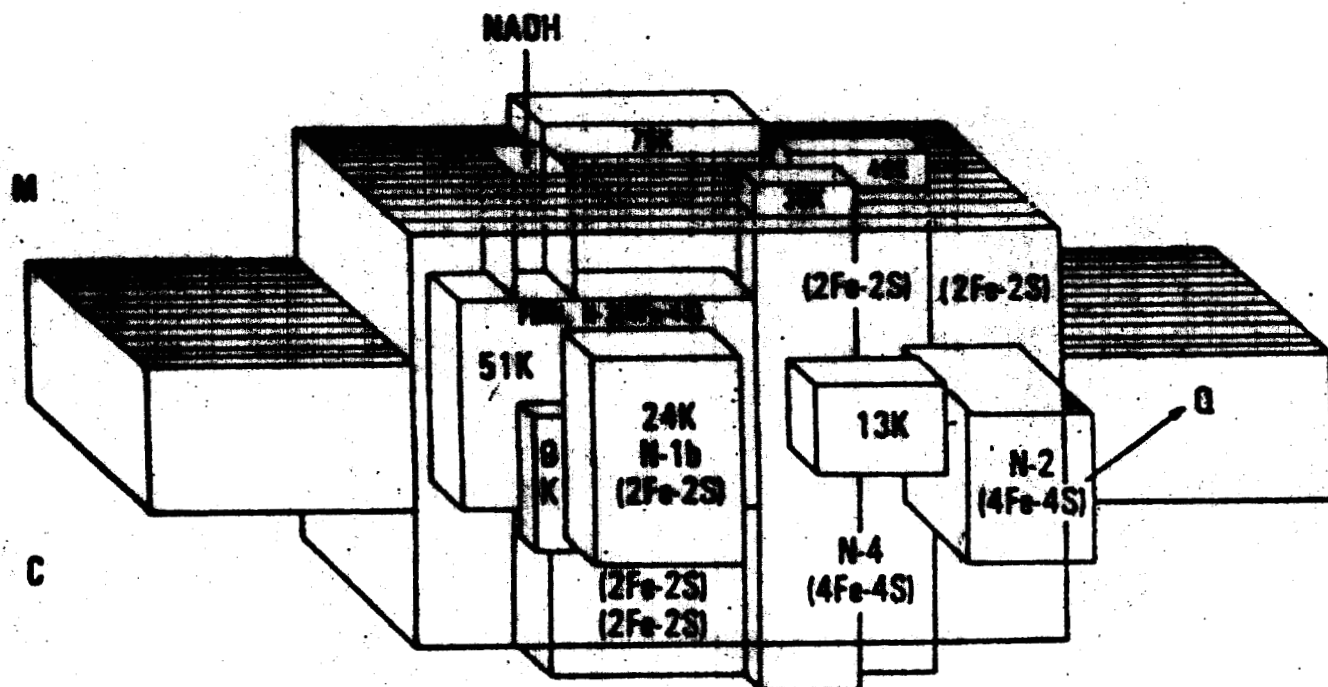


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del Complejo I. Los bloques 51, 24 y 9 Kd (Kilodaltons) componen a la fracción FP; los bloques 75, 49, 30 y 13 Kd integran la fracción IP. La estructura que contiene a las fracciones IP y FP corresponde a la fracción HP (ver texto). El tamaño relativo y la localización de los fragmentos no es preciso. (Tomado de Hatefi, Y., Ann. Rev. Biochem., 54: 1023, 1985).

piensa que este centro N3 presente interacciones de tipo spin-spin con el FMN (Ohnishi, 1979).

El bloque de mayor tamaño de la Figura 2 representa a la fracción MP; se considera que el centro de Fe-S N2 se localiza en esta fracción, debido a que sus valores de potencial son dependientes de fosfolípidos y a que los resultados experimentales señalan a este centro como el responsable directo de la donación de electrones a la Ubiquinona (Ohnishi et al, 1985; Hatefi, 1985).

iv) Propiedades Catalíticas.

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la Ubiquinona (ó sus homólogos). La reducción de la quinona está acoplada a la translocación vectorial de protones. Las K_m aparentes de oxidación y reducción de NADH y quinona son de 14 y 49 μM respectivamente.

Los centros Fe-S están involucrados en el proceso de reducción de la quinona; para explicar este mecanismo, se sugiere que la reducción ocurra por medio un electrón único, ya que se han encontrado radicales ubisemiquinónicos en preparaciones de Complejo I tratadas con NADH.

Se estima que la estequiometría de translocación

de protones acoplada a este complejo, es de 1,1.5 ó 2. Como no existe información precisa a este respecto, no se sabe aún por medio de qué mecanismo ocurre el fenómeno, ya sea por medio del mecanismo de "lazos redox" propuesto por Mitchell (1977), ó por cambios en el pK de residuos prototópicos de polipeptidos, propuesto por Chance (1972); sin embargo, se sabe que los centros de Fe-S son necesarios en la translocación de protones, específicamente el centro N2 (Hatefi, 1985).

v) Inhibidores.

La oxidación de NADH es inhibida por rotenona, barbituratos, demerol, mercuriales, piericidina, rehina y heptilquinona, además de los polióteres macrocíclicos mencionados anteriormente.

El inhibidor más potente es la piericidina A, y aún cuando su estructura no se parece a la de la rotenona ó a la de los barbituratos, los tres actúan en el mismo nivel, que es la unión de la NADH deshidrogenada con la coenzima Q. La generalidad de estos inhibidores es que presentan uniones muy fuertes de tipo no covalente hacia sitios específicos que involucran tanto a los polipeptidos como a los lípidos que componen a la enzima (Slater, 1968; Singer, 1979; Hatefi, 1985).

6. EL DIBENZO-18-CORONA-6 Y SU CAPACIDAD PARA INHIBIR EL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN EL COMPLEJO I DE LA CADENA OXIDATIVA MITOCONDRIAL

Como se ha señalado a lo largo de este capítulo, el DB18C6 es el poliéter macrocíclico que presenta mayor capacidad para inhibir el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, específicamente en el complejo I de la NADH deshidrogenasa.

Este poliéter es altamente selectivo para K^+ , aún cuando es capaz de interactuar con otros cationes. En presencia de potasio, el poliéter DB18C6 presenta valores máximos de inhibición del transporte de electrones en el complejo I.

El mecanismo de inhibición del poliéter no se ha explicado hasta la fecha, sin embargo, como ya se indicó, se sugiere que el DB18C6 interactúa con metales involucrados en la funcionalidad de la NADH deshidrogenasa. Las posibilidades para validar esta hipótesis son que el DB18C6 interactúe con Fe ó con Cu, en base a la reconocida existencia de estos iones en la cadena oxidativa mitocondrial.

7. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

Establecer una correlación entre la capacidad del políster macrocíclico Dibenzo-18-corona-6 de interacción con los metales de transición Fe y Cu, y su capacidad para interferir el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial.

B. OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar si el políster macrocíclico puede interactuar con los metales presentes en la cadena respiratoria mitocondrial: Fe (II), Fe (III) y Cu (II).

Establecer la relación estequiométrica políster-catión de los complejos Dibenzo-18-corona-6-Fe (II), Dibenzo-18-corona-6-Fe (III) y Dibenzo-18-corona-6-Cu (II).

Analizar el efecto de las condiciones fisicoquímicas del microambiente en la interacción del Dibenzo-18-corona-6 con Fe (II), Fe (III) y K^+ .

II. MATERIAL Y METODOS.

MATERIALES.

1. REACTIVOS QUÍMICOS.

Las sustancias químicas empleadas son de grado reactivo analítico y espectroscópico, provenientes de casas comerciales conocidas:

-Merck: Cloruro de potasio, 1,10-fenantrolina (orto-fenantrolina), N,N-Dimetilformamida, Diclorometano, Cloroformo, Etanol Absoluto, Acido nítrico.

-J.T.Baker: Cloruro férrico, Cloruro ferroso, Sulfato férrico, Sulfato ferroso, Cloruro cúprico, Hidróxido de amonio, Hidróxido de sodio, Acetato de amonio, Acetato de etilo, 1-Butanol, Acetona, Acido clorhídrico.

-Sigma: Citrato férrico y Dibenzo-18-corona-6 (DB18C6).

-Aldrich: Solución estándar de Cu para Absorción atómica.

-ICN: ascorbato de sodio, gentil donación del M.C.Jorge Morales T., Depto. de Ciencias de la Salud. UAM-Iztapalapa.

-Infra: N₂ de alta pureza.

El agua utilizada en todos los experimentos es desionizada.

2. APARATOS.

1.-Centrifuga refrigerada automática "DuPont Instruments/Sorvall". Modelo RC-5. DuPont Co. Instrument Products Division. Sorvall Operations, Newton, Conn. EUA.

-Rotor modelo SS-34, diseñado para contener tubos con capacidad para 50 ml.

2.-Centrifuga clínica marca "Solbat". Aparatos científicos de México.

-Rotor para tubos cónicos con capacidad para 15 ml.

3.-Baño de agua a temperatura constante "Grant". Modelo SP50-1. EUA.

4.-Potenciómetro "Beckman". Modelo 4500.

-Electrodo "Beckman" sensible a K⁺. modelo 39047.

-Electrodo "Beckman" de referencia, de tipo calomel, modelo 41239.

5.-Liofilizadora "LABCONCO" Modelo Freeze Dryer 3. LABCONCO Corporation, Kansas, MO. EUA.

6.-Desionizador de agua "Millipore". Modelo Milli-Q. Millipore de México, S.A.

7.-Espectrofotómetro UV-VIS "Carl Zeiss". Modelo PM 6

K8. Carl Zeiss de México. S.A.

8.-Espectrofotómetro UV-VIS "AMINCO". Modelo DW-2a.
American Instrument Co. Division of Travenol Lab. Inc.
Silver Spring, Ma. EUA.

9.-Espectrofotómetro de Absorción Atómica y Emisión de
Flama "Shimadzu". Modelo AA670. Cortesía de los Laboratorios
de Análisis y Control de Calidad de la División de Metales
y Materiales, Banca Cremi, SNC.

10.-Balanza Analítica "Sartorius", modelo 2405, México.

11.-Balanza Analítica "Sartorius". modelo 2842. Alemania.

12.-Balanza de dos platos "Ohaus", con capacidad para 5 lb.

13.-Agitador mecánico "Super mixer". modelo 1290. Labline
Instruments Inc. Melrose Park. Ill. EUA.

14.-Agitador magnético "Corning", modelo PC-353.

15.-Agitador magnético / Parrilla de calentamiento
"Thermolyne", modelos 1000 y SP-10105 B.
Dubuque, Iowa, EUA.

MÉTODOS.

1. FORMACION DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION.

Se pesan 10 mg del políeter macrocíclico Dibenzo-18-corona-6 (DB18C6) en un tubo cónico y se le añaden 4 ml de cloroformo. Se añaden 33.3 equivalentes del cloruro del metal (FeCl_2 , FeCl_3 o CuCl_2 .) y se agita en vórtex a la mayor velocidad posible durante 3'. Este paso se repite hasta haber añadido 100 equivalentes.

Se centrifuga a 3000 rpm durante 15'. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio.

La pastilla se lava con aproximadamente 2 ml de cloroformo, agitando durante 3' a la máxima velocidad, se deja sedimentar y el sobrenadante se transfiere al tubo limpio antes mencionado. Este paso se realiza 5 veces.

Cada vez que se transfiere sobrenadante al tubo limpio, este se pone en un baño maría a 48 °C (temperatura máxima) y se le burbujea N_2 , con el objeto de evaporar el sobrenadante y concentrar el complejo políeter-cation en un volumen aproximado de 1 ml.

Al finalizar los pasos anteriores, se realiza nuevamente toda la operación, añadiendo otros 100 equivalentes del cloruro del metal (en 3 partes) al tubo

087382

cónico que contiene el complejo poliéter catión formado. El procedimiento se lleva a cabo hasta completar la adición de 500 equivalentes del cloruro metálico.

Una vez realizado lo anterior, se evapora totalmente el solvente. Para el caso de los complejos de DB18C6-Cu (II), estos se liofilizan directamente y se cuantifica el % de rendimiento.

Los complejos de DB18C6-Fe (II) y Fe (III) se obtienen contaminados con las sales a partir de las cuales fueron formados; ya que estas son parcialmente solubles en cloroformo. Es por ello que los complejos deben ser sometidos a una purificación posterior, la cual se describe a continuación.

A. PURIFICACION DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION.

La purificación de los complejos se realiza en un sistema de dos fases: una orgánica y otra acuosa. Se utiliza diclorometano como fase orgánica, ya que en este solvente los complejos poliéter-catión entran perfectamente en solución, mientras que las sales de Fe son insolubles en él. De esta manera, el complejo poliéter-catión permanece en la fase orgánica, mientras que el exceso de sal migra hacia la fase acuosa, quedando así el complejo purificado.

El complejo DB18C6-Fe (II) ó DB18C6-Fe (III) se disuelve en 10 ml de diclorometano y se agita mecánicamente hasta la solubilización total (aproximadamente 3').

La solución se transfiere a un embudo de separación y se añaden de 15 a 30 ml de H₂O desionizada. El embudo se tapa y se agita vigorosamente (durante aproximadamente 2'), permitiendo la mezcla de ambas fases.

La solución se deja reposar durante 180' para permitir la separación entre las fases orgánica y acuosa.

La fase orgánica se pasa a un vial limpio, mientras que la fase acuosa se lava nuevamente con 10 ml de diclorometano (repitiendo toda la operación).

Los lavados con diclorometano se realizan hasta haber eliminado de la fase orgánica el complejo poliéter-cation: esto se corrobora midiendo la absorbancia de la solución a $\lambda=274$ nm (λ máxima de absorción del complejo poliéter-cation), hasta obtener un valor igual a el del blanco.

Las fracciones de la fase orgánica obtenidas se reúnen en un vial y se evaporan en un baño maría a 50 °C y con flujo de N₂. La muestra final se liofiliza y se

cuantifica el % de rendimiento.

De esta manera, la contaminación por exceso de sales queda eliminada en la fase acuosa.

2 DETECCION ESPECTROSCOPICA DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION

Los complejos de DB18C6-Fe (II), Fe (III) o Cu (II) se detectan por espectroscopia UV y VISIBLE; para ello se obtienen los espectros absolutos de las muestras, así como los espectros diferenciales.

Los espectros absolutos de los complejos poliéter-cation se obtienen comparando los espectros de estas muestras con respecto al solvente utilizado.

Por otro lado, los espectros diferenciales se obtienen al comparar (o restar) los espectros de las soluciones poliéter-cation con respecto al espectro del poliéter.

Para obtener los espectros descritos, se usa el espectrofotómetro AMINCO DW-2a de doble rayo, indicado en la sección de materiales, en su modalidad de operación "split-beam", en el que con un solo monocromador se hace un

barrido a lo largo del rango de longitudes de onda seleccionadas. En general, para graficar la línea basal, tanto la celda de referencia como la usada para la muestra, se llenan con sustancias idénticas y se colocan en los compartimientos correspondientes; en seguida se hace pasar un solo rayo de luz monocromático, dividido en dos por el espejo rotatorio fraccionante, alternativamente a través de las celdas de referencia y muestra. Esta radiación fraccionada, minimiza cualquier desigualdad entre los rayos de referencia y muestra, produciendo una línea basal relativamente recta. Después de que se ha graficado la línea basal, la celda correspondiente a la muestra se altera químicamente, con lo que se graficará el espectro de la diferencia entre la muestra y la referencia. A continuación se describen el funcionamiento óptico y las vías que siguen las señales. Esto se muestra en la *Figura 3*.

La radiación proveniente de la lámpara de deuterio (UV) o bien de la lámpara de tungsteno (VISIBLE), es afocada por el espejo 1 (E_1) a la rendija de entrada del monocromador 1 (MONO 1). El obturador 1 (O_1), se coloca de tal manera que solo un rayo pase a través de la máscara divisoria del rayo (M). Este rayo es colimado por el espejo 2 (E_2) y difractado por el MONO 1: la radiación monocromática que resulta es afocada por el espejo 3 (E_3) a la rendija de salida. El lente "zoom" (Z), corrige al rayo de cualquier aberración cromática y

automáticamente lo mantiene afocado a un punto determinado en el compartimiento de la muestra, sin importar la longitud de onda. El rayo es reflejado a la muestra (M) y a la referencia (R) en forma alternada, por el espejo rotatorio fraccionante (E_4) y por el espejo fijo (E_5), respectivamente. En este punto, las señales de ambos rayos se igualan con un atenuador (AS). Después de que el rayo ha pasado a través de la muestra y la referencia, llega al cátodo del tubo fotomultiplicador (FM) que genera dos señales de corriente -separadas en el tiempo-. Estas corrientes se convierten en señales de la muestra y de la referencia, siendo aplicadas a los amplificadores respectivos. El espejo E_4 produce pulsos de sincronización óptica, que generan: pulsos de sincronización de referencia que dan salida a señales de referencia a través del amplificador respectivo; pulsos de sincronización de muestra que dan salida a señales a través del amplificador de la muestra; y señales de tiempo, para mantener la velocidad del motor del espejo E_4 a 250 o a 1000 Hz. Las salidas de los amplificadores de referencia y muestra son señales de corriente directa (CD). La señal CD de la muestra puede ser corregida por el circuito de corrección de la línea base (LB) y aplicada junto con la señal CD de referencia, al amplificador diferencial (DIF); este amplificador toma la diferencia entre las dos entradas y la aplica al circuito de absorbancia (Abs) o al de transmitancia (T), el cual atenúa la señal diferencial y la aplica en escala al eje Y del

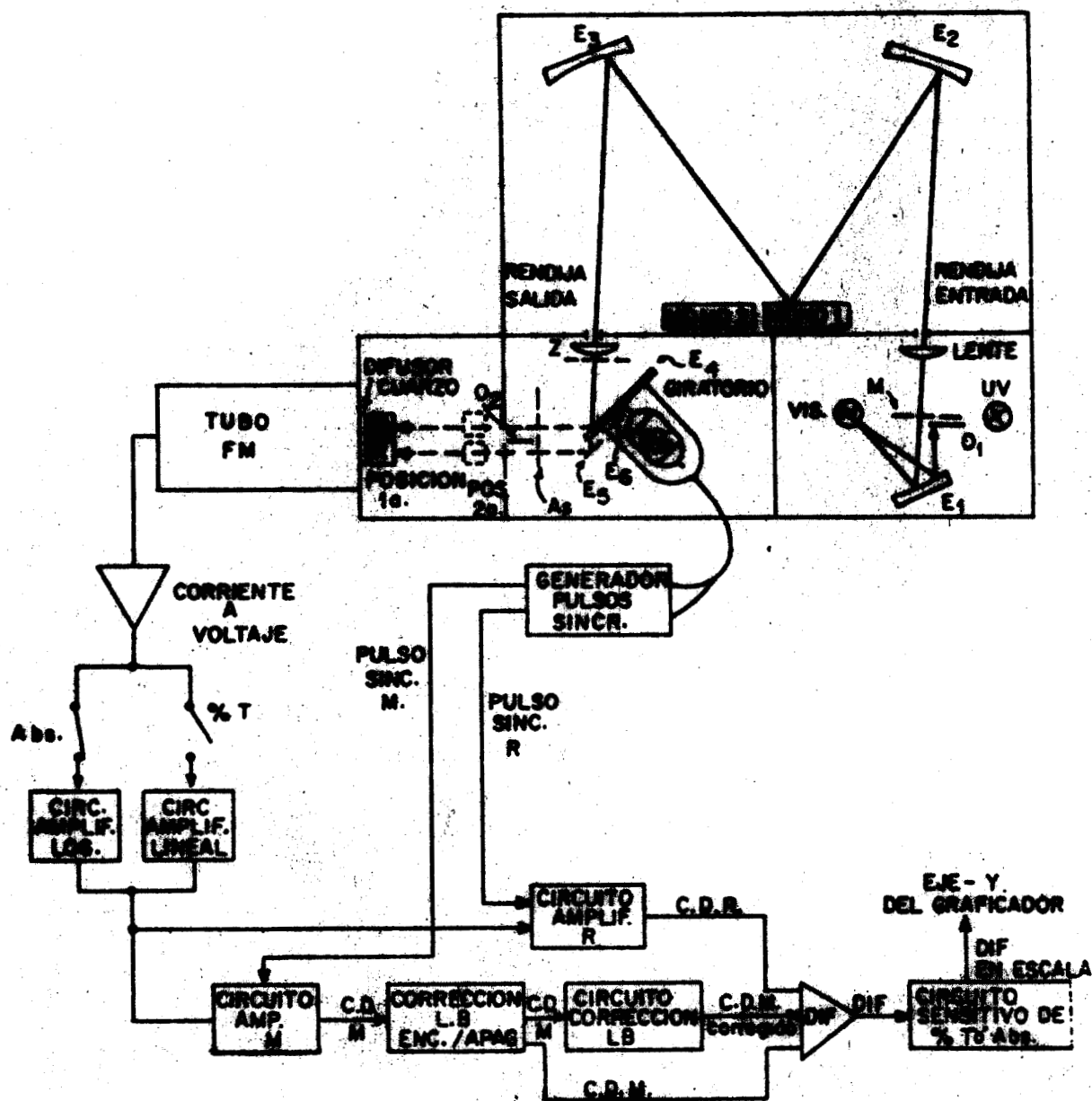


Figura 3. Diagrama Funcional del Espectrofotómetro DW- 2a. Modalidad "Split beam". (Explicación en el Texto).

graficador.

3. DETERMINACION DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA DE LOS COMPLEJOS POLIETER-CATION

A. CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DE CATION EN LOS COMPLEJOS .

a. CUANTIFICACION DE Fe (II) Y Fe (III).

Se sigue el Método de Beinert (Brumby & Massey, 1967) para cuantificación de Fe no-hemo. Todo el material utilizado en este procedimiento se lava perfectamente con mezcla crómica y se hierve en HCl 6N durante 10' aproximadamente; posteriormente se enjuaga varias veces con agua bidestilada.

Previo al ensayo de Fe, es necesario efectuar una digestión ácida de las muestras, con el fin de liberar al metal de su unión con el poliéter.

Las muestras y los controles se colocan en tubos de ensayo con rosca. A cada tubo se le añade 1 ml de HNO_3 concentrado, se colocan en una gradilla de aluminio, y se evaporan a sequedad sobre una parrilla de calentamiento; debe evitarse la ebullición violenta. Este paso se repite hasta que todos los residuos orgánicos desaparecen. Se dejan enfriar los tubos antes de continuar.

Ensayo de Beinert.

Una vez digerida la parte orgánica de la muestra, a cada tubo se le añade 1 ml de HCl 2N, se tapa, se agita mecánicamente (tratando de que todos los residuos entren en contacto con el ácido) y se incuba a 60 °C durante 15' (de esta manera se asegura la solubilización total del metal presente en el tubo). Se agregan entonces 3.3 ml de agua desionizada y se repite la incubación.

Una vez que se enfrían los tubos, se adicionan: 750 µl de solución de 1,10-fenantrolina (orto-fenantrolina) al 0.1 % p/v; 250 µl de solución de ascorbato de sodio al 1% p/v (esta solución se debe preparar el mismo día del experimento porque es altamente inestable); 250 µl de NaOH 4N; 100 µl de acetato de amonio saturado (aproximadamente al 66 %); y 150 µl de hidróxido de amonio al 12.6% (1:1).

Se agitan mecánicamente todos los tubos y se mantienen a temperatura ambiente durante 60'.

La reacción de la orto-fenantrolina con el Fe da una coloración anaranjada (el pH de las muestras debe ser superior a 4, puesto que los H⁺ compiten con el catión por la orto-fenantrolina).

El Fe se cuantifica midiendo la Absorbancia a $\lambda=510$ nm en el espectrofotómetro Zeiss. Los valores

obtenidos se interpolan en la gráfica de la curva de calibración.

En la figura 4 se muestra el barrido en la región VISIBLE del espectro, de la reacción orto-fenantrolina-Fe. La concentración de orto-fenantrolina es 0.011% p/v (la misma que en el ensayo); las concentraciones de Fe son de 0,5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$. La punta de flecha indica la λ (510 nm) donde se lleva a cabo la cuantificación.

i) Curva de calibración.

Solución estándar. Se pesa la cantidad necesaria de FeCl_2 para tener una concentración de $1.78 \times 10^{-2}\text{M}$ (1000 $\mu\text{g/ml}$) en 1 l de solución. Se disuelve en 50 ml de ácido nítrico concentrado y se hierve durante 10' para eliminar los óxidos de N existentes. Se deja enfriar, y se afora a 1 l con agua desionizada.

A partir de la solución madre de FeCl_2 $1.78 \times 10^{-2}\text{M}$ (1000 $\mu\text{g Fe/ml}$) se prepara otra que contenga 50 $\mu\text{g Fe/ml}$ de solución. Para la curva patrón se utilizan 7 tubos con las siguientes concentraciones (en un volumen final de 1 ml): 0,5, 10, 20, 30, 40, y 50 $\mu\text{g de Fe/ml}$ de solución.

Se lleva a cabo la técnica de cuantificación de Fe (descrita anteriormente), a partir de la adición de HCl 0N. La curva de calibración se realiza por triplicado

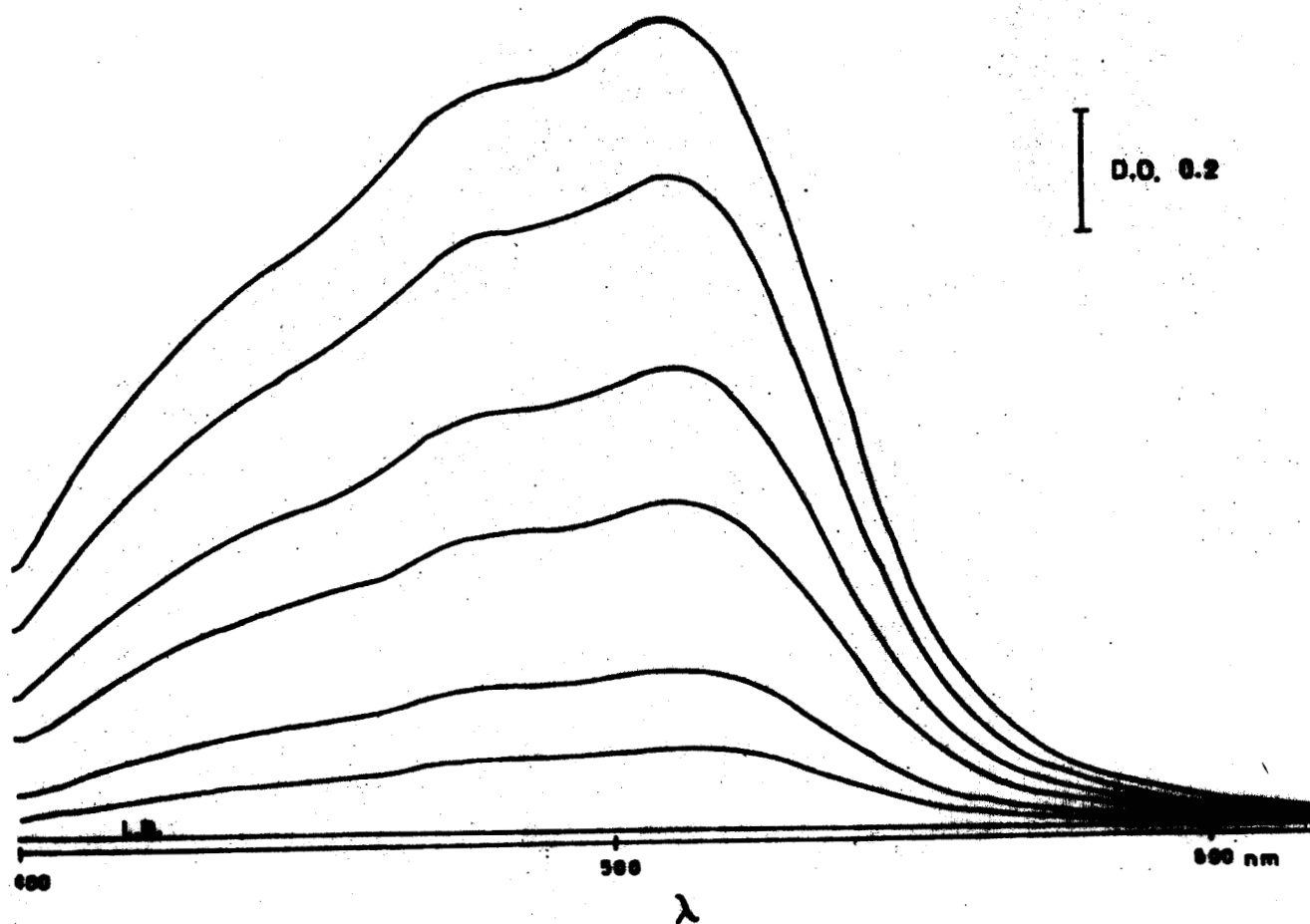


Figura 4. Espectros Absolutos de Ortofenantrolina con Fe. Comportamiento de orto-fenantrolina al 0.011 % en presencia de concentraciones crecientes de Fe (II): 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$. La punta de flecha indica la longitud de onda ($\lambda=510$ nm) a la cual se realiza la cuantificación de Fe por el Método de Belnert. LB= Línea Base.

087382

en cada experimento.

Se grafica la relación existente entre la concentración de Fe y Absorbancia obtenida a $\lambda=510$ nm. Estos datos se ajustan por el método de mínimos cuadrados.

La figura 5 muestra la curva de calibración tipo para la cuantificación de Fe; la recta obtenida es $y = 0.03128 x + 0.00050$, con un coeficiente de correlación $r=0.99992$. Esta gráfica representa el promedio de 15 experimentos diferentes (cada uno realizado por triplicado). Las líneas verticales representan la desviación estándar por muestreo para cada punto.

B. CUANTIFICACION DE Cu (II).

Las muestras de complejo DB18C6-Cu (II) son nitradas de la misma manera que para el caso de los complejos de DB18C6 con Fe (II y III).

Los residuos tanto los controles como de las muestras experimentales se solubilizan en una solución de ácido nítrico al 2% preparada con agua desionizada.

La curva de calibración se realiza con estándares comerciales para espectroscopia de absorción atómica, en el rango de 0 a 20 μg de Cu/ml de solución.

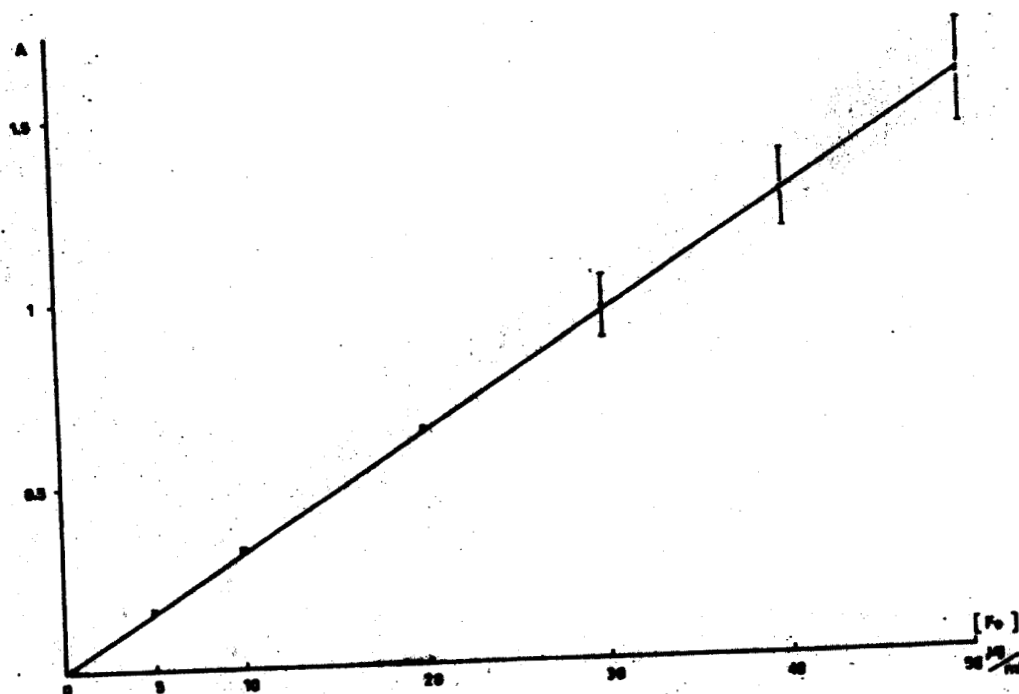


Figura 5. Curva de Calibración de Fe en presencia de orto-fenantolína, a $\lambda = 510$ nm. La ecuación de la recta es $y = 0.03128 x + 0.00659$, con una correlación de 0.99992. La gráfica representa el promedio de 15 experimentos (realizados por triplicado). Las barras verticales indican la desviación estándar por muestreo (σ_{n-1}) para cada punto.

Se cuantifica directamente en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Estos experimentos se llevaron a cabo en los Laboratorios de Análisis de la División de Metales y Materiales de Banca Cremi S.N.C., lugar donde gentilmente se nos permitió realizar las mediciones de Cu.

B. CALCULO DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA.

La estequiometría de los complejos poliéter-cation se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{RELACION ESTEQUIOMETRICA} = \frac{\text{NUMERO DE MOLES DE POLIETER}}{\text{NUMERO DE MOLES DE CATION}} \quad (1)$$

donde:

$$\text{NUMERO DE MOLES DE POLIETER} = \frac{\text{MASA DEL POLIETER PESADA Y REFERIDA A LA ALICUOTA}}{\text{PESO MOLECULAR DEL POLIETER}} \quad (2)$$

la masa del poliéter se determina de la siguiente manera:

$$\text{MASA DEL POLIETER} = \text{PESO TOTAL DE LA MUESTRA} - (\text{PESO DEL CATION} + \text{PESO DEL ANION}) \quad (8)$$

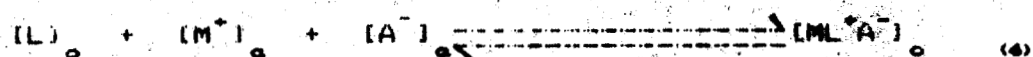
El peso del catión se determina experimentalmente por Absorción atómica o por métodos colorimétricos; el peso del anión presente en cada muestra se calcula de acuerdo al número de oxidación de su par catiónico.

4. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE EXTRACCION DE LOS COMPLEJOS.

A. DEFINICION.

La constante de extracción de los complejos poliéter-catión se determina en un sistema de dos fases, en el que se tiene inicialmente solubilizado al poliéter en la fase orgánica, y al catión (en forma de sal) soluble en la fase acuosa.

El equilibrio en la extracción de un par iónico, por efecto del poliéter macrocíclico DB18C6, se describe por la reacción:



donde L , M^+ y A^- representan al políéter macrocíclico (ligando), al ión metálico, y al anión respectivamente, mientras que los subíndices a y o denotan las fases acuosa y orgánica.

De esta manera, la constante de extracción K_{ex} se define como la constante de equilibrio de la reacción anterior:

$$K_{ex} = [ML^+A^-]_o / [M^+]_a [L]_o [A^-]_a \quad (5)$$

B. PROCEDIMIENTO.

Para obtener los valores de K_{ex} del DB18C6 con respecto a $Fe(II)$, $Fe(III)$ y K^+ , se realizan las reacciones en sistemas de mesofases, y se hacen las mediciones cuando el sistema llega al equilibrio.

En un vial de 20 ml se colocan 10 ml de la solución acuosa del par iónico a cuantificar ($FeCl_2$, $FeCl_3$ o KCl , con una concentración en el orden de $10^{-2}M$), en seguida, se ponen en contacto con 10 ml de la fase orgánica que contiene al políéter macrocíclico DB18C6 en solución (en una concentración del orden de $10^{-2}M$).

El vial se tapa y se agita a la máxima velocidad

posible durante 50', por medio de un agitador magnético, posteriormente se transfieren las fases a un tubo de centrifuga de 50 ml de teflón (resistente a todo tipo de solventes orgánicos) y se centrifuga a 6000 rpm durante 35', a una temperatura entre 5 y 10 °C (para evitar pérdidas por evaporación del solvente).

Para corroborar que la concentración inicial de poliéter se encuentra en su totalidad en la fase orgánica, se cuantifica su presencia en la fase acuosa, a manera de control.

Las fases se separan cuidadosamente por medio de una pipeta pasteur (si la fase orgánica queda en la parte inferior del tubo, entonces se elimina la fase acuosa por medio de vacío) y se toman alícuotas de la fase orgánica, para cuantificar la presencia del complejo poliéter-par iónico.

Los tiempos de reacción y centrifugación utilizados en este procedimiento resultaron ser los óptimos tanto para obtener el equilibrio de la reacción, como para la total separación de las fases.

C. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Los valores de K_{ex} para el caso del DB18C6 con respecto a Fe (II), Fe (III) y K^+ se obtienen en diversos

solventes orgánicos.

Para seleccionar los solventes orgánicos a emplearse en estos experimentos, se consideran las siguientes características: deben ser inmiscibles en agua, y deben presentar una buena solubilización para el DB18C6.

En la Tabla I se enlistan los solventes seleccionados, con sus respectivos valores de constante dieléctrica ϵ y momento dipolar μ (debyes), estos parámetros representan las características fisicoquímicas que se analizarán en estos experimentos. La Tabla I también establece los valores de las propiedades mencionadas, para el caso del agua, como punto de referencia.

D. CUANTIFICACION DEL COMPLEJO POLIETER-METAL.

Una vez que se conoce la relación estequiométrica poliéter/metal del complejo, es posible determinar la concentración de ligando unido al metal en la fase orgánica de los experimentos de mesofases: se determina directamente la concentración de metal presente en dicha fase y se calcula entonces la concentración de complejo poliéter-cation, de acuerdo a su estequiometría.

Dado que la concentración de complejo

TABLA 1. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS SOLVENTES ORGANICOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS DE Kex.

SOLVENTE	Polaridad μ (d)	Hidrofobicidad E
BENCENO	0.00	2.275
CCl_4	0.00	2.238
CICLOHEXANO	0.00	2.202
TOLUENO	0.45	2.568
CHCl_3	1.01	4.806
ACETATO DE ETILO	1.81	6.02
CH_2Cl_2	1.6	9.08
1-BUTANOL	1.66	17.5
H_2O	1.84	80

TOMADO DE DEAN, J. A. LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTRY, MC. GRAW HILL CO., NY, EUA, 1972.

ligando-metal-anión ($[LM^+A^-]_0$) es la única incógnita de la ecuación (5) para el cálculo de la constante de extracción K_{ex} , esta puede entonces calcularse directamente (ver el inciso A de esta sección).

a. Cuantificación de Fe (II) y Fe (III).

Se toma una alícuota de 2 ml. proveniente de la fase orgánica del experimento de mesofases y se transfiere a un tubo de ensayo de 15 ml. con rosca, lavado como se indica en la sección 3 A de este capítulo. Se evapora el solvente en una gradilla de aluminio colocada directamente sobre una parrilla: se lleva a cabo el procedimiento de cuantificación de Fe con la técnica de Beinert, descrito anteriormente. Cada experimento se realiza por triplicado: para el cálculo de la K_{ex} se toman en cuenta por lo menos 4 experimentos diferentes.

b. CUANTIFICACION DE K^+

Se toma una alícuota de 3 ml de la fase orgánica del experimento y se evapora a sequedad (como se describió en el párrafo anterior). se le añaden 2 ml de ácido nítrico concentrado y se evapora nuevamente a sequedad.

A cada tubo se le añaden 3 ml de agua desionizada y se agita perfectamente. Si la nitración fue completa el

pH de esta solución debe ser superior a 5.

La concentración de K^+ presente en las muestras se cuantifica potenciométricamente, registrando la diferencia de potencial eléctrico del catión, con un electrodo selectivo para K^+ y un electrodo de referencia. Para esta cuantificación se utiliza una cámara de vidrio con capacidad de 5 ml y con agitación continua. La temperatura de la cámara se mantiene constante por medio de un flujo de agua corriente.

Los valores obtenidos de diferencia de potencial eléctrico (mV) se interpolan en la curva de calibración, para obtener la concentración de K^+ .

1) CURVA DE CALIBRACION DE K^+ .

A partir de una solución madre de KCl 1M (en solución acuosa) se realizan diluciones sucesivas para obtener concentraciones de 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1×10^{-1} , 5×10^{-1} y 1 M.

Se mide potenciométricamente la relación existente entre la diferencia de potencial eléctrico y la concentración de K^+ . Cada medición se realiza por triplicado. El potencial eléctrico inicial se calibra arbitrariamente a 50 mV con la solución de KCl 1 M.

087382

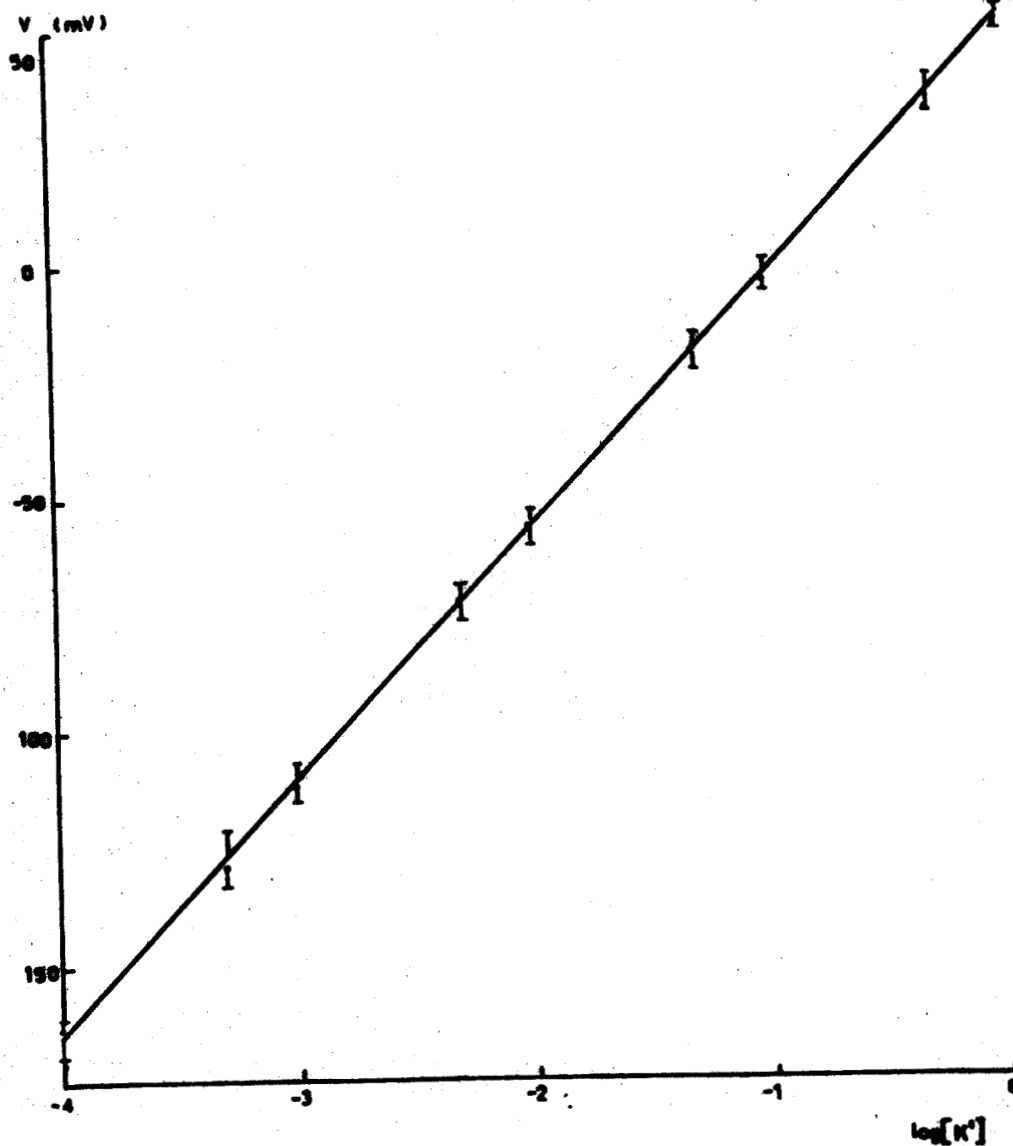


Figura 6. Curva de Calibración Potenciométrica de K^+ . La ecuación de la recta es $y = 53.3 x + 49.1$, con una correlación de 0.9998. La gráfica representa un promedio de 13 experimentos (realizados por triplicado como mínimo). Las barras verticales indican la desviación estándar muestral (σ_{n-1}) para cada punto.

Se grafica el log de la concentración de K^+ vs la diferencia de potencial eléctrico obtenido para cada concentración. Los puntos se ajustan por el método de mínimos cuadrados.

Esta recta debe comportarse de acuerdo a la ecuación de Nernst: $\phi = \frac{-RT}{zF} \log \frac{c_i}{c_o}$, donde $\frac{-RT}{zF}$ es una constante cuyo valor es de 59.2 mV (A $T = 298$ °K ; y $z = 1$), c_i es la concentración interna del electrodo y c_o representa la concentración externa al electrodo, es decir, la solución a cuantificar. Al rearrreglar la ecuación de Nernst para el caso de cationes monovalentes, queda una ecuación del tipo de $\phi = A + 59 c_o$, donde A contiene a todos los términos constantes y c_o es la concentración externa al electrodo; como se observa, la pendiente de esta recta es de 59 cuando se grafica el potencial eléctrico vs el log de la concentración del catión.

Finalmente, los valores experimentales se interpolan en la curva de calibración. La figura 6 muestra la curva obtenida con el promedio de 15 valores experimentales; la ecuación de esta recta es $y = 53.3 x + 49.1$, con un coeficiente de correlación de 0.9999. Las líneas verticales de la figura representan la desviación estándar muestral (σ_{n-1}) para cada punto.

5. ESTADISTICA.

Los resultados experimentales de estequiometría y K_{ex} se expresan como los promedios de las diferentes determinaciones (al menos 3 para cada experimento, cada uno realizado por triplicado) $\pm$ su error estándar por muestreo

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{(\sum x^2 - (\sum x)^2/n) / (n-1)}$$

donde:

- σ_{n-1} = Desviación estándar por muestreo
- x = valores experimentales
- n = número de experimentos

III. RESULTADOS.

1. OBTENCION DE LOS COMPLEJOS DE DIBENZO-18-CORONA-6 CON Fe (II), Fe (III) Y Cu (II).

Durante la formación de los complejos de DB18C6 con Fe en sus dos estados de oxidación, se encontró que únicamente se pueden obtener a partir de los cloruros del metal. Si se intenta obtener los complejos a partir de otras sales como son los citratos o los sulfatos, los resultados son negativos; esto se corroboró por espectroscopia UV-VIS, Infrarrojo (Gentil colaboración del Dr. Jorge Cerbón, del Depto. de Bioquímica del CIEA) y Resonancia del Espin Electrónico (ESR) (Gentil colaboración del Dr. Antonio Campero, del Depto. de Química de la UAM-I).

Todos los complejos de Dibenzo-18-corona-6 con hierro se formaron a partir de los cloruros del metal. El complejo con Fe (II) presenta una coloración violeta y el complejo con Fe (III) tiene una coloración violeta claro. Ambos complejos son solubles en cloroformo.

Dado que los cloruros de Fe también son solubles en cloroformo, que es el solvente donde se preparan los complejos; se diseñó la técnica de separación orgánica de los complejos, con el fin de obtenerlos en forma

purificada. Esta técnica de purificación se describe en la sección de Métodos del capítulo anterior.

Para la preparación de los complejos de DB18C6 con Cu (II) se utilizó el Método de saturación química, y no se requirió de una posterior purificación, puesto que el cloruro de cobre no es soluble en cloroformo.

2. DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPLEJOS.

1. DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA FORMACIÓN *IN SITU* DEL COMPLEJO DIBENZO-18-CORONA-6 CON Fe (III).

El políéter Dibenzo-18-corona-6, como ya fue reportado por Pedersen (1968), presenta un espectro de absorción característico en la región Ultravioleta (UV) del espectro electromagnético, con absorciones máximas a 239 y 282 nm, como se muestra en la figura 7. Cualquier alteración en el espectro de absorción de una molécula refleja cambios en su estructura, es por ello que se utilizó este enfoque experimental para detectar la formación de los complejos. Ahora bien, para verificar la facilidad de interacción del DB18C6 con Fe (III), se decidió intentar la formación *in situ* del complejo, añadiendo cantidades limitantes del catión metálico directamente en la celda de registro.

A partir de una concentración fija del políéter disuelto en N,N'-dimetilformamida, se añadieron

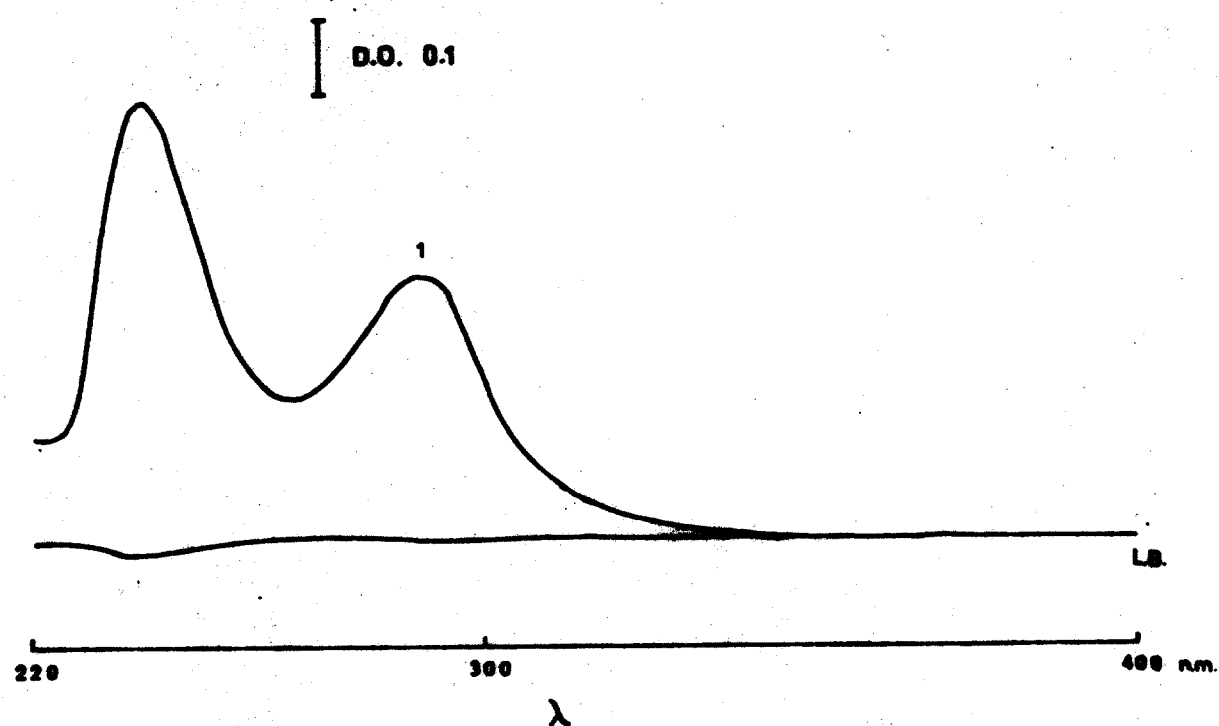


Figura 7. Espectro Absoluto del Dibenzo-18-corona-6 libre, en cloroformo. La concentración de políster es de $7.8 \times 10^{-5} M$. LB= Línea Base.

concentraciones discretas de FeCl_3 y se realizaron los barridos de absorción correspondientes en la región UV del espectro electromagnético. Asimismo se realizaron los espectros de absorción de FeCl_3 a las diferentes concentraciones (en ausencia de poliéter).

La *figura 8a* muestra los cambios que sufre el espectro de absorción del poliéter DB18C6 al ir agregando cantidades crecientes de FeCl_3 , lo que se traduce como la formación del poliéter-catión. Se observa que concentraciones de Fe menores de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ producen un hombro de absorción negativa, con un máximo alrededor de los 274 nm. esto es característico de la presencia del complejo DB18C6-Fe (III) en solución.

Por otra parte, cuando se tienen concentraciones de Fe mayores de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ se pueden observar distorsiones en los patrones de los espectros obtenidos a concentraciones menores: se detecta la aparición de absorciones positivas en casi toda la región UV; nótese la semejanza del espectro obtenido a la máxima concentración de Fe con aquellos representados en la *figura 8b* que reflejan el comportamiento de FeCl_3 en ausencia del poliéter. se observa que estas muestras absorben en toda la región UV, con máximos a 275 nm aproximadamente.

Lo anterior se explica como la formación *in situ* del complejo DB18C6 a concentraciones de Fe menores de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; al aumentar la concentración de Fe, el DB18C6 se

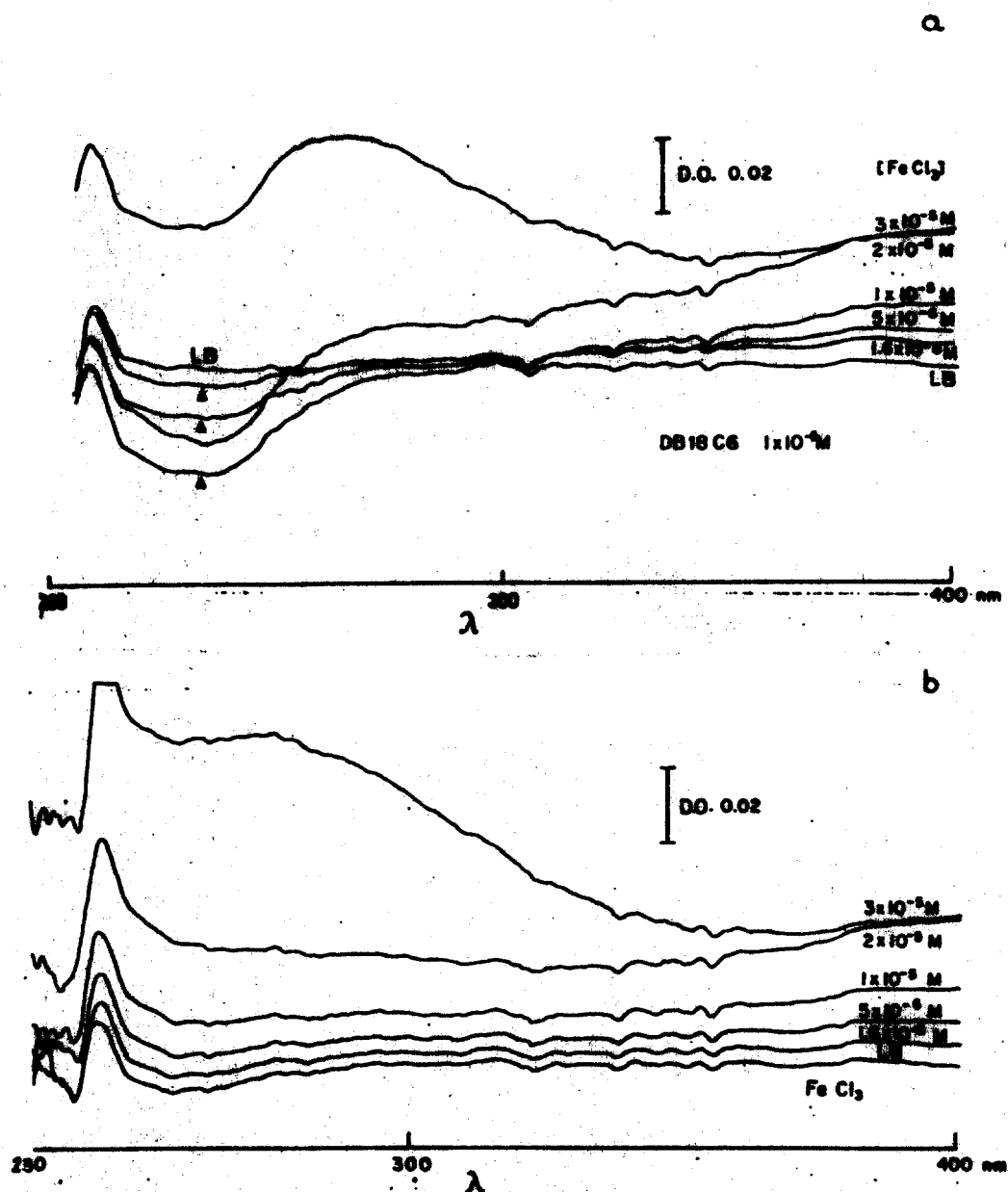


Figura 8. a. Formación in situ del complejo DB18C6-Fe (III), en DMF, 1×10^{-6} M. Se añadieron concentraciones crecientes de Fe (III) etanólico (indicadas en la fig.). Las puntas de flecha indican la aparición del complejo. b. Comportamiento característico de concentraciones crecientes de Fe (III) etanólico, en DMF. LB= Línea Base. DMF= N,N'-Dimetilformamida.

satura (ya no forma más complejo) y empieza a aparecer el espectro del FeCl_3 libre que se encuentra en exceso en la solución.

2. DETECCIÓN ESPECTROSCOPICA DE LOS COMPLEJOS FORMADOS POR SATURACION QUIMICA.

Después de preparar -y en su caso purificar- los complejos de DB18C6 con Fe (II), Fe (III) y Cu (II) por el método de saturación química -y separación en mesofases- se obtuvieron sus respectivos espectros de absorción tanto en la región del UV como en el VISIBLE.

A. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.

1) ESPECTROS ABSOLUTOS Y DIFERENCIAL DEL COMPLEJO DB18C6-Fe (II).

La figura 9 muestra los espectros de absorción absolutos del complejo DB18C6-Fe (II) y del DB18C6 a concentración de $7.81 \times 10^{-5} \text{ M}$ en diclorometano, obtenidos en la región del UV comprendida entre 220 y 400 nm.

Como se observa, el políeter DB18C6 libre absorbe de 220 a 320 nm (*trazo 1*), con máximos a 239 y 282 nm. En cambio, el complejo DB18C6-Fe (II) (*trazo 2*) absorbe en toda la región UV, aunque presenta máximos de absorción a las mismas λ que el políeter libre.

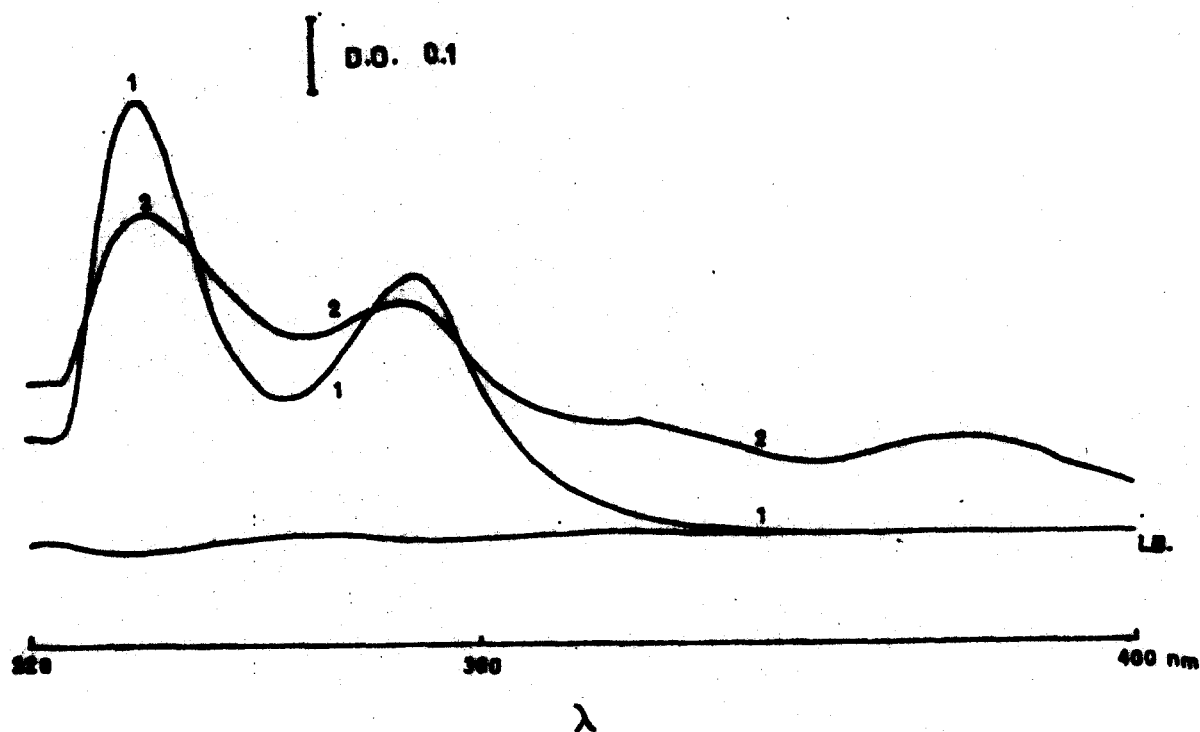


Figura 9. Espectro Absoluto del complejo DB18C6-Fe (II), en cloroformo. Trazo 1: DB18C6 libre $7.8 \times 10^{-5} M$. Trazo 2: Complejo DB18C6-Fe (II), $7.8 \times 10^{-5} M$. LB= Línea Base.

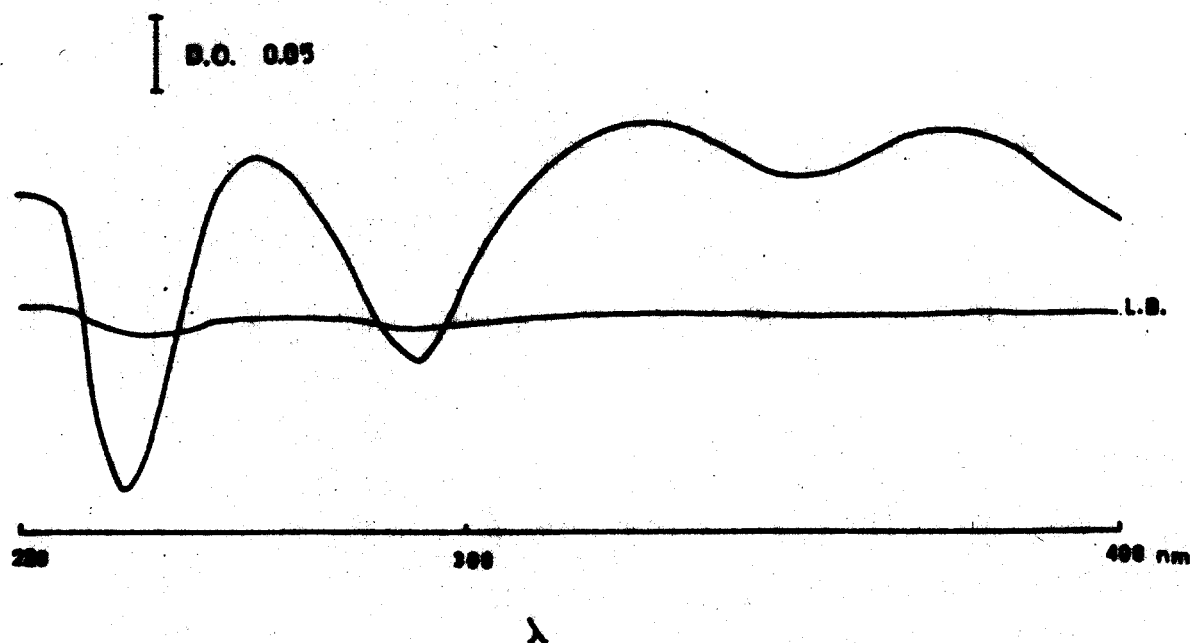


Figura 10. Espectro Diferencial del complejo DB19C6-Fe (II) vs. DB19C6 libre, a una concentración de $7.9 \times 10^{-5} M.$, en cloroformo. LB= Línea Base, DB19C6 libre vs. DB19C6 libre, a la misma concentración.

Por otro lado, a partir del espectro diferencial del complejo de Fe (II) versus el DB18C6 libre, que se muestra en la figura 10, se puede apreciar que el complejo DB18C6-Fe (II) presenta picos negativos a $\lambda=237$ y 287 nm; y máximos de absorción positiva a $\lambda>230$ nm, $\lambda=258$ nm, $\lambda=316$ nm y 374 nm. Nótese que a $\lambda > 320$ nm -región donde no absorbe el DB18C6 libre - el complejo presenta absorción positiva continua hasta los 400 nm. También se observan puntos isosbásticos a los $230, 246, 279$ y 289 nm.

11) ESPECTROS ABSOLUTO Y DIFERENCIAL DEL COMPLEJO DB18C6-Fe (III).

La figura 11 muestra los espectros absolutos tanto del complejo DB18C6-Fe (III) como del DB18C6 a concentración de 7.8×10^{-5} M en diclorometano.

Se detecta una disminución drástica en la absorción del complejo DB18C6-Fe (III) (trazo 2) desde 220 a 400 nm., con respecto a la señal del DB18C6 libre (trazo 1). El complejo DB18C6-Fe (III) no presenta picos máximos de absorción en esta región, sino una absorción continua. A $\lambda > 320$ nm y hasta 400 nm, se puede ver claramente que el complejo DB18C6-Fe (III) absorbe, a diferencia del trazo del políéter libre.

Por otra parte, la figura 12 evidencia el espectro diferencial del complejo DB18C6-Fe (III) versus

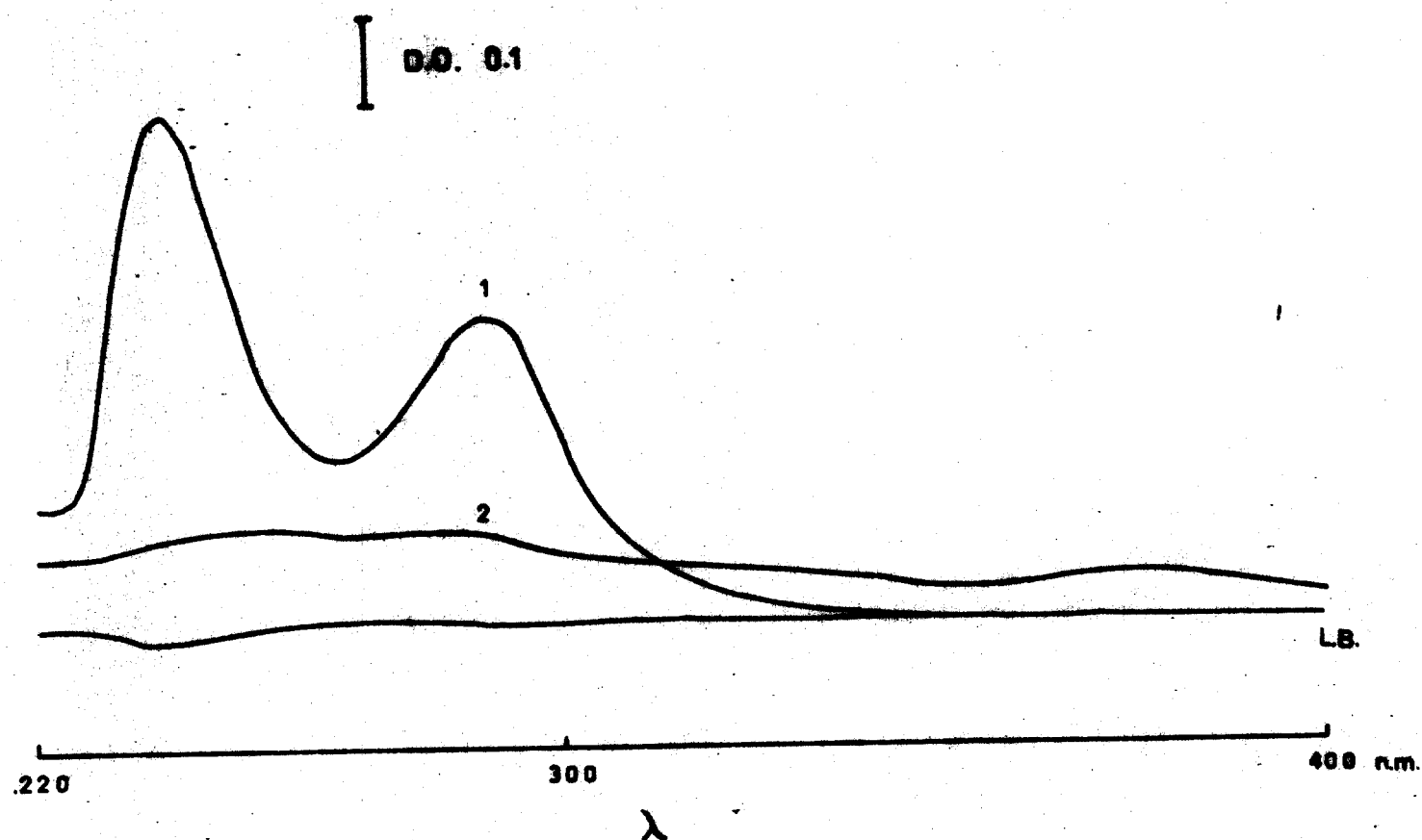


Figura 11. Espectro Absoluto del complejo DB19C6-Fe (III), en cloroformo. Trazo 1: DB19C6 libre, $7.8 \times 10^{-5} M$. Trazo 2: Complejo DB19C6-Fe (III), $7.8 \times 10^{-5} M$. LB= Línea Base.

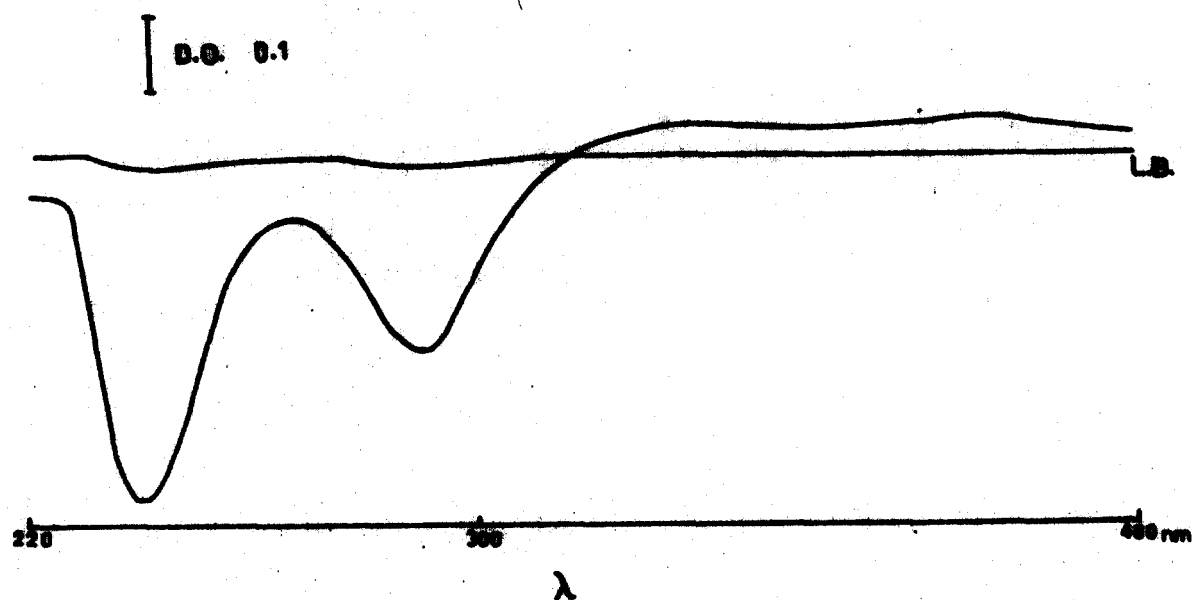


Figura 12. Espectro Diferencial del complejo DB18C6-Fe (III) vs. DB18C6 libre, $7.8 \times 10^{-5} M.$, en cloroformo. LB= Línea Base, DB18C6 libre vs. DB18C6 libre, a la misma concentración.

DB18C6 libre. Nótese que a $\lambda > 310$ nm la absorción del complejo es negativa, con picos máximos a 238 y 286 nm. A $\lambda > 310$ nm se observa que la absorción del complejo (aunque limitada) se torna positiva. El único punto isosbástico del espectro se encuentra a $\lambda = 310$ nm.

La Tabla II resume los valores de los coeficientes de extinción molar ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) a $\lambda = 239$ y 283 nm, tanto para el DB18C6 como para los complejos de DB18C6-Fe (II) y DB18C6-Fe (III).

Obsérvese que los valores de ϵ disminuyen para el caso de los dos complejos del políeter con Fe, con respecto al DB18C6 libre:

-A 239 nm el ϵ para el complejo DB18C6-Fe (II) disminuye en un 24.8 %, mientras que el valor para DB18C6-Fe (III) decrece en un 81.1 %.

-A 283 nm, la disminución del valor de ϵ es de un 10.2 % para el complejo con Fe (II) y un 70.9 % para el DB18C6-Fe (III).

iii) COMPLEJO DB18C6-Cu (II).

El complejo DB18C6-Cu (III) no pudo obtenerse en las condiciones experimentales utilizadas para ello en esta tesis.

TABLA II COEFICIENTES DE EXTINCION MOLAR ϵ EN LA REGION ULTRAVIOLETA (230 Y 283 nm), DE DB18C6 LIBRE Y DE LOS COMPLEJOS DB18C6-Fe (II) Y DB18C6-Fe (III).

Muestra	Coeficiente de extinción molar (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
	230nm	283nm
DB18C6	7,552	4,351
DB18C6-Fe(II)	5,985	4,086
DB18C6-Fe(III)	1,482	1,322

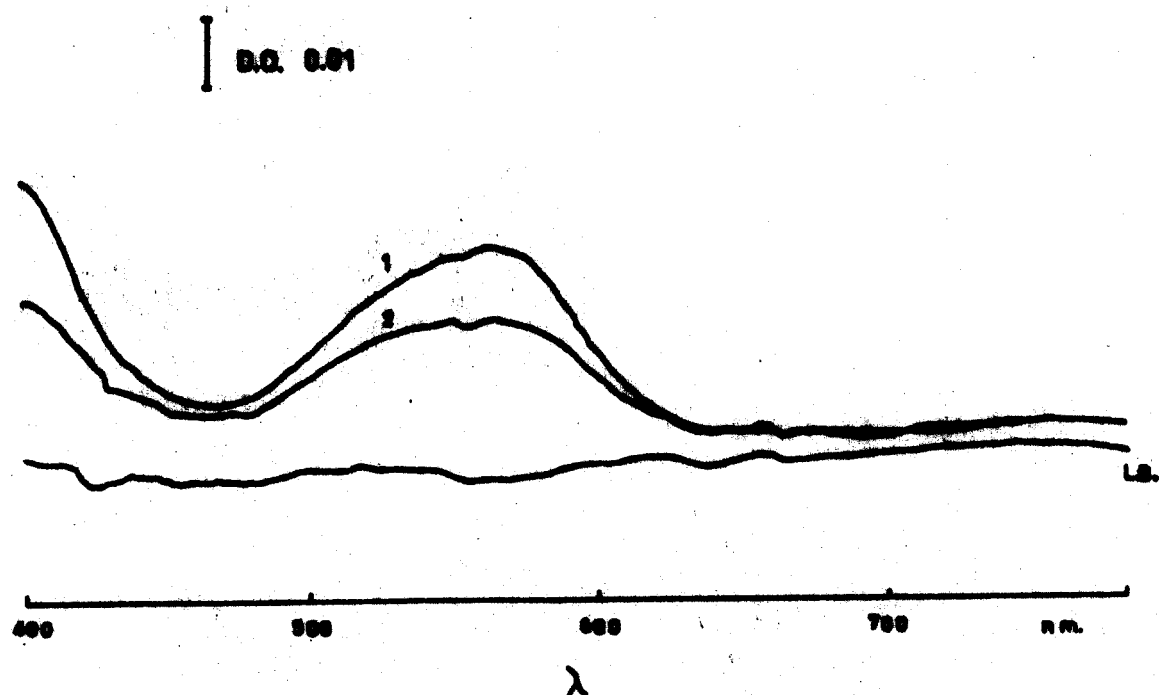


Figura 13 Espectro Diferencial de los complejos DB19C6-Fe (II) y DB19C6-Fe (III), $7.8 \times 10^{-5} M.$, en cloroformo, en la región VIS. del espectro electromagnético. Trazo 1: Complejo DB19C6-Fe (II). Trazo 2: Complejo DB19C6-Fe (III). LB: Línea Base, DB19C6 libre vs. DB19C6 libre.

TABLA III. COEFICIENTES DE EXTINCION MOLAR ϵ EN LA REGION VISIBLE (400 Y 557 nm.), DE LOS COMPLEJOS DB18C6-Fe (II) Y DB18C6-Fe (III).

Muestra	Coeficiente de extinción molar ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	
	400nm	557nm
DB18C6	—	—
DB18C6-Fe(II)	487.179	483.845
DB18C6-Fe(III)	288.231	275.641

El espectro absoluto obtenido de las muestras experimentales preparadas a partir de Cu (II), no evidencian diferencia alguna con respecto a los controles de DB18C6. El trazo del espectro diferencial de la muestra versus el DB18C6 libre coincide con la línea basal. Por ser resultados negativos, no se muestran en este trabajo.

B. ESPECTROSCOPIA VISIBLE.

La figura 13 muestra los espectros diferenciales en la región VISIBLE del espectro (de 400 a 800 nm). obtenidos a partir de las muestras de DB18C6-Fe (II) y DB18C6-Fe (III) con respecto a DB18C6 libre. La concentración de todas las muestras es de $7.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ en diclorometano.

Tanto el complejo DB18C6-Fe (II) (trazo 1), como el DB18C6-Fe (III) (trazo 2) presentan absorción positiva en toda la región, con máximos a 400 y 567 nm. El complejo DB18C6-Fe (II) tiene una mayor absorción que el DB18C6-Fe (III).

El DB18C6 libre carece de absorción en esta región del espectro electromagnético.

En la Tabla III se reportan únicamente los valores de ϵ obtenidos a $\lambda=400$ y 567 nm para DB18C6-Fe

(II) y DB18C6-Fe (III), ya que, el DB18C6 no presenta absorción en esta región ($\lambda > 400$ nm). El DB18C6-Fe (II) absorbe 180 % más que el DB18C6-Fe (III) a $\lambda = 400$ nm. y 150 % más a $\lambda = 567$ nm.

3. CUANTIFICACION DE LA RELACION ESTEQUIOMETRICA POLIETERMETAL .

Las estequiometrias encontradas son de 1:1 para los complejos de DB18C6-Fe (II) y DB18C6-Fe (III). En la Tabla IV pueden observarse los valores experimentales obtenidos, así como sus desviaciones estándar muestrales (σ_{n-1}).

La cuantificación de hierro se llevó a cabo por el método colorimétrico de Beinert (descrito en los Métodos).

Por otra parte, aún cuando el políeter DB18C6 no forma complejos con Cu (II), en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para formar los complejos con Fe (II y III), se corroboró la ausencia de Cu en la muestras por medio de espectroscopia de Absorción Atómica. Estos experimentos se realizaron tanto por cuantificación directa, como por el método de Adiciones: este último se utiliza para detectar concentraciones bajas del metal, en el rango de $1 \mu\text{g/ml}$. Ambos métodos

**TABLA IV. RELACION ESTEQUIOMETRICA POLIETER-CATION (P:C)
DE LOS COMPLEJO DB18C6-Fe (II), DB18C6-Fe (III) Y
DB18C6-Cu (II).**

Muestra	Relación estequiométrica (P:C)
DB18C6-Fe (II)	0.0002 ± 0.020
DB18C6-Fe (III)	1.040 ± 0.485
DB18C6-Cu (II)	N.D. *

ND* = NO DETECTADO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA

demonstraron la ausencia de Cu en las muestras.

4. OBTENCION DE LAS CONSTANTES DE EXTRACCION K_{ex} DE LOS COMPLEJOS POLIETER - CATION

Con el fin de comparar la afinidad que presenta el poliéter DB18C6 por Fe (II) y Fe (III) con respecto a K^+ , se determinaron sus constantes de extracción K_{ex} . Esta comparación se lleva a cabo puesto que está ampliamente reportado en la literatura que el DB18C6 es altamente selectivo por K^+ .

Con el objetivo de discernir las características fisicoquímicas (hidrofobicidad (s) y polaridad (μ)) de la interacción del DB18C6 con Fe (II y III) y K^+ ; se cuantificó la extracción de estos iones por el poliéter en cuatro solventes orgánicos diferentes: cloroformo, diclorometano, 1-butanol y acetato de etilo. Las características de hidrofobicidad (s) y polaridad (μ) de ellos, se reportan en la Tabla I del capítulo de Métodos.

La Tabla V resume los valores de $\log K_{ex}$ obtenidos para los tres iones, en las condiciones mencionadas.

TABLA V. LOG DE LA CONSTANTE DE EXTRACCION IONICA (K_{ex}) DEL DIBENZO-18-CORONA-6 PARA Fe (II), Fe (III) Y K^+ , EN CUATRO SOLVENTES ORGANICOS.

LOGK _{EX} DIBCO6			
SOLVENTE	CATION		
	K^+	Fe II	Fe III
CHCl ₃ ($\mu=1.01$, $E=4.806$)	0.7512 ± 0.1180	3.6498 ± 0.1343	3.2620 ± 0.0940
ACETATO DE ETILO ($\mu=1.81$, $E=6.02$)	2.5868 ± 0.0301	1.1768 ± 0.3373	1.0338 ± 0.3732
CH ₂ Cl ₂ ($\mu=1.9$, $E=9.08$)	2.9927 ± 0.3886	1.9288 ± 0.3090	1.1000 ± 0.0832
1-BUTANOL ($\mu=1.86$, $E=17.5$)	3.2996 ± 0.4111	1.7368 ± 0.4235	1.7245 ± 0.2437

1. EFECTO DE LA HIDROFOBICIDAD (ϵ) DEL SOLVENTE EN LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR DB18C6.

En la *figura 14* se grafica la relación existente entre la hidrofobicidad (ϵ) de los solventes utilizados y los valores de $\log K_{ex}$ obtenidos para los diferentes cationes.

Como se puede ver, para la extracción de K^+ (círculos abiertos), el $\log K_{ex}$ presenta una disminución drástica en valores de $\epsilon < 6$ (0.7512); en los valores de ϵ comprendidos entre 6.02 y 17.5 el $\log K_{ex}$ oscila entre valores de 2.5 y no cambia significativamente.

Por el contrario, para el caso de las extracciones de Fe (II) y Fe (III) (triángulos cerrados y abiertos), el $\log K_{ex}$ es de 3.4 en regiones de polaridad menor a 6. Para los valores de ϵ comprendidos entre 6.02 y 17.5, el $\log K_{ex}$ disminuye a valores de 1.35.

Los datos anteriores demuestran que en la región de mayor hidrofobicidad, que corresponde a valores de ϵ comprendidos entre 4.08 y 6.02, se invierten los patrones de selectividad en la extracción de Fe (II y III) con respecto a K^+ . Esta inversión en la selectividad del DB18C6 implica un cambio importante en la afinidad del políeter, puesto que en medios altamente hidrófobos, la molécula "prefiere" al Fe y no al K^+ , que siempre se ha reportado como el catión más afín con DB18C6.

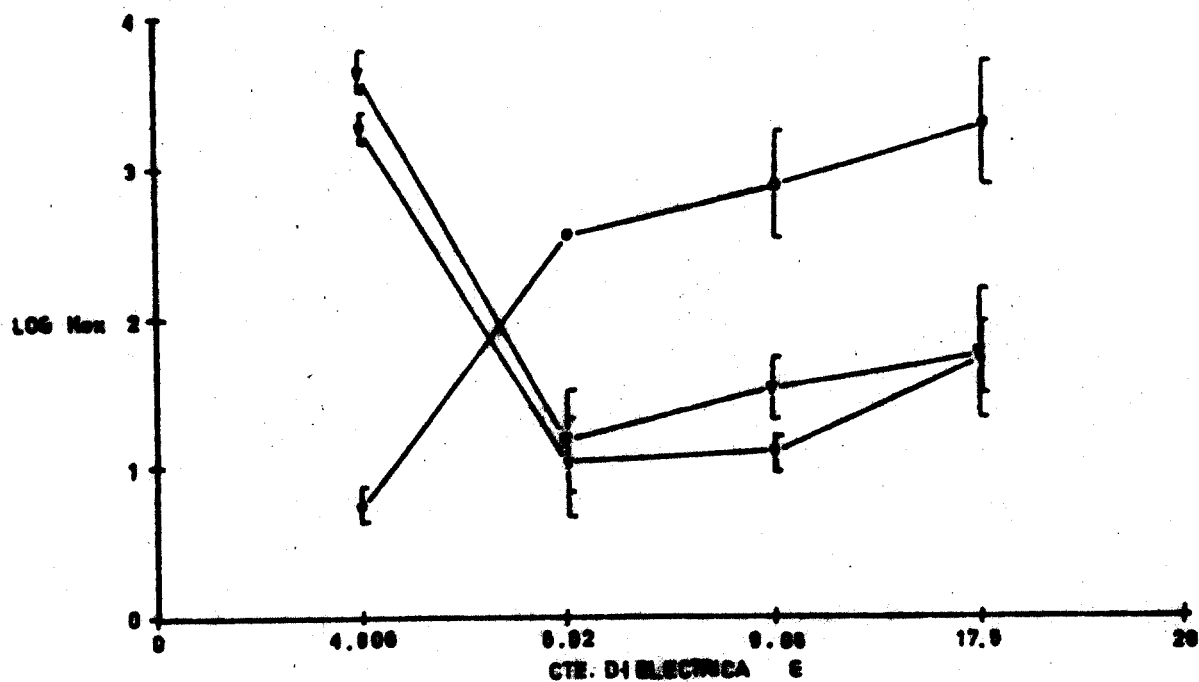


Figura 14. Efecto de la constante dieléctrica (ϵ) del medio sobre la extracción iónica del Dibenzo-18-corona-6.

$\circ - K^+$, $\nabla - Fe(II)$, $\blacktriangledown - Fe(III)$.

2. EFECTO DE LA POLARIDAD (μ) DEL SOLVENTE EN LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR DB18C6.

La relación encontrada entre la polaridad (μ) de los solventes y el $\log K_{ex}$ para los diferentes cationes, se reporta en la figura 15.

Los datos obtenidos para la extracción de K^+ por DB18C6 se grafican con círculos abiertos. Se puede apreciar que la facilidad de extracción para este ión, disminuye a 0.7512 en regiones de μ intermedia ($\mu=1.01$ debyes), con respecto a los solventes más polares, donde los valores observados son de aproximadamente 2.5.

Los resultados obtenidos para la extracción de Fe (II) y Fe (III) se indican con triángulos abiertos y cerrados en la figura 15. Contrariamente a lo cuantificado para el ión potasio, la polaridad intermedia favorece notablemente la extracción de Fe (II) y Fe (III) ($\log K_{ex} = 3.4$). En zonas de $\mu > 1.6$ d., se aprecia un descenso de dos órdenes de magnitud en la extracción de ambos iones ($\log K_{ex} = 1.35$).

A partir de estos experimentos se evidencia la existencia de una región "crítica" de polaridad en donde ocurren las transiciones en la afinidad del políster DB18C6 por K^+ con relación a Fe (II) y Fe (III).

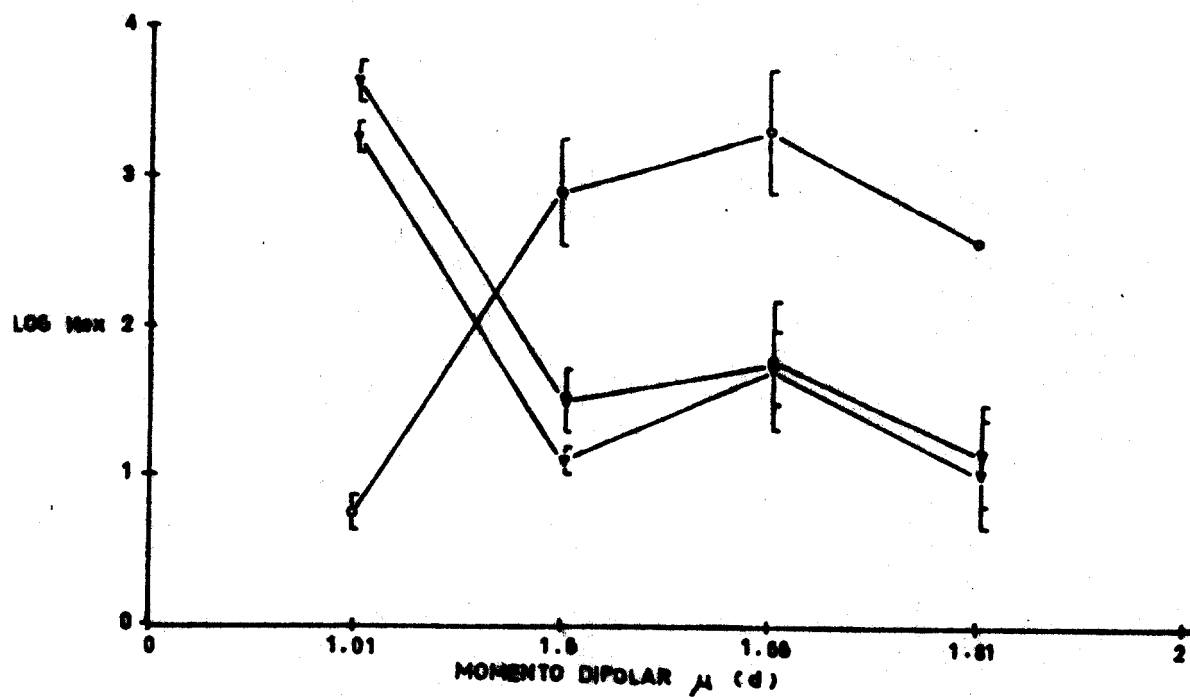


Figura 15. efecto del momento dipolar (μ) o polaridad del medio, sobre la extracción iónica del Dibenzo-18-corona-6.
 O - K^+ , ∇ - $Fe(II)$, $\blacktriangledown$ - $Fe(III)$.

TABLA VI. EFECTO DEL MOMENTO DIPOLAR (μ) DEL MEDIO SOBRE LA SELECTIVIDAD IONICA DEL DIBENZO-18-CORONA-6.

SOLVENTE	μ (debyes)	SELECTIVIDAD
CLOROFORMO	1.01	$\text{Fe II} > \text{Fe III} > \text{K}^+$
DICLOROMETANO	1.60	$\text{K}^+ > \text{Fe II} > \text{Fe III}$
1 BUTANOL	1.66	$\text{K}^+ > \text{Fe II} = \text{Fe III}$
ACETATO DE ETILO	1.81	$\text{K}^+ > \text{Fe II} = \text{Fe III}$

En la Tabla VI se resumen los cambios en la selectividad del DB18C6 por los cationes estudiados, con respecto a la polaridad del medio .

Nótese que en el valor de 1.01 d. el políéter DB18C6 es más selectivo para Fe (II y III) que para K^+ . En cambio, en medios de $\mu > 1.6$ d., la selectividad iónica del DB18C6 se invierte, siendo más afin para K^+ que para Fe (II) y Fe (III).

Por otra parte, es evidente que en medios de $\mu < 1.66$ d. el DB18C6 es capaz de discriminar entre los estados de oxidación del Fe, siendo un tanto más selectivo para Fe (II) que para Fe (III).

IV. DISCUSION.

En este capítulo se intenta integrar de manera general los resultados previamente analizados de manera particular; con el fin de dar una explicación coherente a los hallazgos experimentales, así como su posible significado en sistemas biológicos.

1 EL DIBENZO-18-CORONA-6 FORMA COMPLEJOS 1:1 CON Fe (II) Y Fe (III), Y NO INTERACTUA CON Cu (II) EL CONTRAION UTILIZADO INFLUYE EN LA COMPLEJACION

En la presente tesis se estudió la posible formación de los complejos DB18C6-Fe (II), DB18C6-Fe (III) y DB18C6-Cu (II); las figuras 8 - 12, y las tablas II, III y IV demuestran los resultados experimentales obtenidos.

Para la obtención de los complejos DB18C6 con Fe (II) y Fe (III), se corroboraron los reportes bibliográficos (Lamb et al., 1980 y Christensen et al., 1978; Tardade, 1980), que indican que el tipo de contraión utilizado en el experimento influye en la interacción políeter-metal-anión. Los intentos para obtener los complejos de los metales mencionados a partir de las sales de sulfatos ó de citrato fueron negativos en

ambos casos, solamente se obtuvieron a partir de los cloruros. La explicación a este fenómeno puede estar dada en función de los cambios en la energía de solvatación que presentan los diferentes aniones utilizados (Christensen *et al.* 1980).

La obtención del complejo DB18C6-Fe (II) en este trabajo, representa la primera evidencia experimental reportada de este hecho, puesto que se ha establecido en la literatura la formación de complejos entre los polióteros (Benzo-15-corona-5, Dibenzopiridino-15-corona-5 y N-fenil-aza-15-corona-5) únicamente con Fe (III) (Abraham y Marji, 1985). Para el caso del transporte de Fe, los reportes bibliográficos solamente indican resultados positivos con respecto al ión Fe (III) (Yatsimirskii *et al.*, 1986); lo mismo ocurre en los experimentos de extracción reportados hasta la fecha (Koshima y Onishi, 1985 y 1986.).

La formación del complejo DB18C6-Fe (III) se corroboró por medio de dos enfoques experimentales. Para comprobar la relativa "facilidad" de formación del complejo, se realizaron los experimentos *in situ* mostrados en las figuras 8 a y b; y por otra parte, los complejos se obtuvieron también por el método de saturación química.

Con respecto a la interacción DB18C6 con Cu (II), se observó que partiendo de las mismas condiciones

experimentales que para el caso de los complejos de DB18C6 con Fe, a diferencia de estos, no fue posible obtener ningún complejo de DB18C6-Cu (II).

Se han reportado interacciones entre macrociclos y Cu (II) a partir de percloratos (Tschudin & Kaden, 1988 y Tschudin et al., 1988), bromuros (Abraham & Marji, 1985), pero también utilizando cloruros (Moi et al., 1985, Morphy et al., 1988, Kamata et al., 1988 y Kimura et al., 1985); sin embargo, todos estos experimentos se realizaron con macrociclos aza-sustituídos y no se han reportado interacciones utilizando polióteres macrocíclicos. Esto puede explicarse considerando que los éteres corona presentan una muy baja constante de afinidad por el Cu, a diferencia de sus análogos N-sustituídos.

2. LA AFINIDAD EN LA EXTRACCION IONICA REALIZADA POR DIBENZO-18-CORONA-6 DEPENDE EN GRAN MEDIDA DE LAS CONDICIONES FISICOQUIMICAS DEL MEDIO.

Los experimentos para cuantificar las constantes de extracción (K_{ex}) del DB18C6 por Fe (II), Fe (III) y K^+ se pueden analizar en las figuras 14 y 15, y las tablas V y VI.

En ellas se observa que la hidrofobicidad del

medio favorece la extracción de Fe en sus dos estados de oxidación (Fe (II) y Fe (III)) existiendo una zona de hidrofobicidad crítica entre valores de 4 y 6 de constante dieléctrica (ϵ). Al aumentar la constante dieléctrica, el DB18C6 sufre un drástico descenso en su afinidad por Fe (dos órdenes de magnitud).

El K^+ , por el contrario, es más fácilmente extraído en regiones de hidrofobicidad baja, mientras que no lo es en zonas de alta hidrofobicidad. La zona de transición para este comportamiento es en valores de ϵ comprendidos entre 4 y 6.

Como se observa claramente, la zona de hidrofobicidad crítica mencionada, delimita la región donde ocurre una inversión en la selectividad de DB18C6 para los iones K^+ versus Fe (II)/Fe (III).

El hecho de que la afinidad del DB18C6 por K^+ disminuya en dos órdenes de magnitud con respecto al Fe, en zonas altamente hidrófobas, resalta la importancia que tienen las condiciones fisicoquímicas del solvente sobre la interacción políéter-catión.

Por su parte, la polaridad media ($\mu=1.01$ d) del solvente, favorece la extracción de Fe (II) y Fe (III) en dos órdenes de magnitud sobre la extracción de K^+ . Por el contrario, las regiones de polaridad más alta (de 1.6 a

1.66 d) son ideales para la extracción de K^+ , más no lo son para hierro.

Al igual que en el caso de la hidrofobicidad del medio, con respecto a la polaridad también existe una zona crítica que delimita la regiones donde se invierte la afinidad del DB18C6 con respecto a K^+ versus Fe (II y III). Esta zona está comprendida en valores de μ mayores de 1.01 d y menores de 1.6 d.

Asimismo, debe notarse que en zonas de polaridad menor o igual a 1.6 d., el DB18C6 es capaz de discriminar selectivamente entre el estado de oxidación del hierro, siendo más selectivo para Fe (II) que para Fe (III). En solventes de polaridad mayor a 1.66 d. este poder de discriminación se pierde, a la vez que la afinidad del DB18C6 por Fe (II y III) decrece notablemente.

Este análisis de la influencia de la hidrofobicidad y la polaridad del solvente, denotan la importancia de las condiciones fisicoquímicas del medio donde se realiza la reacción, ya que estas pueden provocar cambios drásticos en la selectividad iónica del DB18C6.

En la literatura no existen reportes que indiquen variaciones de selectividad iónica de polióteres macrocíclicos, inducidos por cambios fisicoquímicos del medio; sin embargo, se sabe que la afinidad del 18C6 por sales de diazonio varía dependiendo del tipo de solvente

utilizado (Hashida & Matsui, 1980): lo mismo ocurre en los experimentos realizados con 1806 y 1,3-xilil-1805 con perclorato de terbutilamonio (de Boer & Reinhoudt, 1985). Todos estos datos están en concordancia con los datos experimentales e interpretaciones obtenidos a partir de este trabajo.

En un reporte reciente (LoGrasso et al., 1986) también se enfatiza la importancia del tipo de solvente utilizado, para obtener cambios conformacionales en la gramicidina A: es decir, que las características de la conformación membranal del sistema propician en mayor ó menor grado, la formación de canales por la gramicidina A.

Desde este enfoque analítico, las diferencias en las características fisicoquímicas del microambiente, podrían explicar la multiplicidad de efectos biológicos inducidos por algunos antibióticos polióteres. Esta explicación podría aplicarse a la monensina, que tiene efectos sobre el transporte de P_i en mitocondrias de riñón de rata (Estrada-O et al., 1970); en la motilidad de amibas (Nelson & Ward, 1980); en la transcripción y traducción de DNA (Alanzo & Carrasco, 1980); en la regulación de la glicogenólisis (Huges et al., 1980); en la secreción de proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Tajiri et al., 1980; Hattwara & Tauzer, 1981); en la secreción de catecolaminas (Perlmann et al., 1980); efector

cardiovasculares, renales y coronarios (Schlafter & Kane, 1980; Somani & Saini, 1981); en el reciclaje de lipoproteínas de baja densidad (Baso et al., 1981); y en proteólisis fagolisosomal de paramecios (Fok & Ueno, 1987), entre otros. Todos estos efectos han sido adjudicados a la interacción de la monensina con el Na^+ sin tomar en cuenta la presencia de otros metales (incluyendo a los metales traza) ó la influencia de los cambios microambientales del medio celular. Otro punto a favor de esta interpretación es el hecho de que en el grupo de trabajo del Dr. Sergio Estrada-O. se ha encontrado que la nigericina - otro ionóforo carboxílico -, que es selectiva a cationes monovalentes (potasio), es capaz de formar complejos con Ca^{2+} y Pr^{3+} , que son cationes a los cuales no transporta (Piedras et al., 1986).

3. POSIBLE CORRELACION ENTRE EL CAMBIO DE AFINIDAD IONICA DEL DIBENZO-18-CORONA-6 Y SU EFECTO A NIVEL DE CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.

La hipótesis propuesta en el presente Trabajo para explicar el mecanismo por el cual el DB18C6 interfiere con el transporte de electrones en el complejo I de cadena respiratoria mitocondrial, se ve apoyada por los datos experimentales reportados en el presente trabajo.

Como se señaló en la Introducción, la NADH deshidrogenasa se ha aislado, y se conocen las subunidades que la componen, así como sus características. Está establecido que el único catión metálico involucrado en la funcionalidad de esta enzima es el hierro. Aún cuando se ha sugerido la presencia de K^+ en este segmento de la cadena oxidativa mitocondrial, no se tiene ninguna evidencia experimental concluyente que lo ratifique.

El hecho experimental de que la selectividad del DB18C6 por Fe (II y III) aumente notablemente bajo ciertas características fisicoquímicas del medio, indica la versatilidad de interacción del DB18C6, puesto que es un políéster selectivo por K^+ .

Considerando lo anterior, el DB18C6 podría estar interfiriendo el transporte de electrones a nivel de alguno de los 6 centros Fe-S presentes en la NADH-deshidrogenasa (Hatefi, 1985), que se encuentre interfacial a la cara externa de la membrana interna mitocondrial.

La validez de esta propuesta radica en la consideración de que exista un gradiente, tanto de polaridad como de hidrofobicidad, entre el centro mismo de la membrana lipídica y la fase acuosa inmediata a ella (Singer & Nicolson, 1972); así, las características del microambiente vecinal al centro Fe-S más interfacial a la

membrana, podrían provocar que en esa región se cambie la afinidad del DB18C6 por K^+ hacia Fe (II ó III).

Como se ha mencionado anteriormente, esta propuesta está respaldada por evidencias experimentales que validan la importancia de las características fisicoquímicas del medio, tanto en experimentos de interacción poliéter-cation (Pedersen, 1970, Hashida & Moi, 1980 y de Boer & Reinhoudt, 1985, entre otros.), como en estudios recientes de afinidad enzimática (de Meis & Inesi, 1988), donde se observa que la afinidad de la ATPasa de Ca^{+} (de retículo sarcoplásmico) por P_i varía dependiendo del solvente donde se lleve a cabo la reacción.

La reversibilidad del efecto inhibitor del poliéter, inducida por concentraciones crecientes de K^+ (Estrada-O & Cárabez, 1972), se explicaría por la ley de acción de masas, puesto que las concentraciones de K^+ disponibles en el medio sobrepasan en órdenes de magnitud la concentración disponible de grupos Fe accesibles a la interfase mitocondrial.

Los resultados de esta Tesis no pueden extrapolarse para explicar la reversibilidad del efecto inhibitor del DB18C6 inducida por Li^+ en mitocondrias depletadas de K^+ (Cárabez & Sandoval, 1981) ó por Cs^+ en mitocondrias normales (Estrada-O & Cárabez, 1972): para ello, se deberán realizar experimentos de Kex del DB18C6

para Li^+ y Cs^+ , en los medios analizados en la presente Tesis, así como experimentos con partículas transportadores de electrones en presencia de los cationes monovalentes.

V. CONCLUSIONES.

A partir del análisis de los experimentos se concluyen los siguientes puntos.

1. El políéter macrocíclico Dibenzo-18-corona-6 (DB18C6) forma complejos con Fe en sus dos estados de oxidación: Fe (II) y Fe (III).

Los complejos se pueden obtener por medio de técnicas de saturación química, así como a partir de concentraciones limitantes de metal (experimentos de complejación *in situ*).

2. El tipo de anión acompañante ó contraión utilizado en la formación de los complejos, influye en la capacidad de complejación iónica del políéter DB18C6 .

3. En las condiciones experimentales utilizadas, el DB18C6 no forma complejos con Cu (II).

4. La relación estequiométrica políéter/catión de los complejos DB18C6-Fe (II) y DB18C6-Fe (III) es de 1:1 para ambos casos.

5. El DB18C6 es más selectivo (dos órdenes de magnitud) para Fe (II) y Fe (III) que para K^+ , en condiciones de alta

hidrofobicidad y polaridad media ($\epsilon=4.806$ y $\mu=1.01$ d.).

6. Las condiciones que favorecen la selectividad del DB18C6 para K^+ son de baja hidrofobicidad y polaridad alta ($\epsilon>6$ y $\mu>1.6$ d.).

7. El DB18C6 discrimina selectivamente entre los estados de oxidación del Fe en medios de polaridad menor a 1.6 d.; siendo más selectivo para Fe (II) que para Fe (III).

En medios de polaridad mayor de 1.6 d., la capacidad de discriminación del políeter, entre los estados de oxidación del hierro se pierde.

8. La afinidad del Dibenzo-18-corona-6 para Fe (II) y Fe (III) se invierte con respecto a la de K^+ , existiendo una zona crítica de hidrofobicidad y polaridad que comprende valores entre 4.9 y 6 de constante dieléctrica y 1.1 y 1.6 d. de polaridad, respectivamente.

9. Las características fisicoquímicas del medio ambiente, influyen drásticamente en la determinación de la selectividad iónica -o el cambio de ella- del DB18C6.

VI. LITERATURA CITADA.

1. Abraham, J. & Marji, D. CROWN-ETHER COMPLEXES WITH SOME TRANSITION METALS. *Inorg. Chim. Acta.*, 101: L24-L24, 1985.
2. Adam, K.R., Bridgen, L.G., Henrick, K., Lindoy, L.F., Mc Partlin, M., Minnagh, B. & Tasker, P.A. COMPUTER MODELLING OF METAL ION RECOGNITION. SIMULATION OF THE RELATIVE THERMODYNAMIC STABILITIES OF THE NICKEL COMPLEXES OF RELATED O₂N -DONOR MACROCYCLIC LIGANDS. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 710-711, 1985.
3. Alanzo, M.A. & Carrasco M. ACTION OF MEMBRANE ACTIVE COMPOUNDS ON MAMMALIAN CELLS. PERMEABILIZATION OF HUMAN CELLS BY IONOPHORES TO INHIBITORS OF TRANSLATION AND TRANSCRIPTION., *Eur. J. Biochem.*, 109: 535-540, 1980.
4. Arias-Abrodo, P., Blanco-Gomis, D. & Saenz-Medel, A. A COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT EXTRACTION SYSTEMS FOR THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF POTASSIUM. *Microchem. J.* 30:58-70, 1984.
5. Bartsch, R. Grandjean, J. & László, P. A SYNTHETIC CROWN ETHER CARBOXYLIC ACID IONOPHORE DISPLAYS SYNERGISTIC TRANSPORT OF Pr³⁺ IN CONJUNCTION WITH LASALOCID ACID. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117 (1): 340-343, 1983.
6. Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. & Brown, M.S. MONENSIN INTERRUPTS THE RECYCLING OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTORS IN HUMAN FIBROBLASTS., *Cell.*, 24: 493, 1981.
7. Behr, J.P., Dumas, P. & Moras, D. THE H₂O CATION: MOLECULAR STRUCTURE OF AN OXONIUM-MACROCYCLIC POLYETHER COMPLEX. *J. Am. Chem. Soc.*, 104: 4540-4543, 1982.
8. Boer, de., J.A.A. & Reinhoudt, D.N. COMPLEXATION OF TERT-BUTYLAMONIUM PERCHLORATE BY CROWN ETHERS IN POLAR SOLVENTS STUDIED BY ¹H-NMR SPECTROSCOPY. *J. Am. Chem. Soc.*, 107: 5347-5351, 1985.
9. Bombieri, G., De Paoli, G., Benetollo, F. & Cassol, A. CROWN ETHER COMPLEXES WITH LANTHANOID AND ACTINOID ELEMENTS. CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF Nd(NO₃) (18-CROWN-6). *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 42: 1417-1422, 1980.
10. Bowyer, J.R. & Odell, B. SOLUBILISATION OF FERROCYTOCHROME C IN METHANOL USING A CROWN ETHER: ABSORPTION, CIRCULAR DICHROISM AND ESPECTRAL PROPERTIES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 127 (3): 828-835, 1985.

11. Bradshaw, J.S., Maas, G.E., Lamb, J.D., Izatt, R.M. & Christensen, J.J. CATION COMPLEXING PROPERTIES OF SYNTHETIC MACROCYCLIC POLYETERHER-DIESTER LIGANDS CONTAINING THE PYRIDE SUBCYCLIC UNIT. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 467-474, 1980.
12. Brumby, P.E. & Massey, E. DETERMINATION OF NON-HEME IRON, TOTAL IRON AND COPPER en *Methods in Enzymology*, Ed. Estabrook, R.W. & Pullman, M.E., Academic Press., NY, Vol X. No. 73 p 462-474, 1967.
13. Bünzli, J.-C.G. & Wessner, D. SOICOMETRY AND STRUCTURE OF THE COMPLEXES BETWEEN LANTHANIDE IONS AND MACROCYCLIC CROWN ETHER CONTAINING FROM FOUR TO SEVEN COORDINATING SITES. *Israel. J. Chem.*, 24: 313-322, 1984
14. Burgard, M., Jurdy, L., Park, H.S. & Heimburger, R. LIQUID-LIQUID EXTRACTION AND LIQUID MEMBRANES: AN ANALYSIS OF TRANSPORT RATES OF POTASSIUM AND RUBIDIUM SALTS THROUGH A LIQUID MEMBRANE CONTAINING DIBENZO-18-CROWN-6. *Nouveau J. de Chim.*, 7 (10): 575-578, 1983.
15. Buschmann, H.J. THE MACROCYCLIC CRYPTATE EFFECT. 4. COMPLEXATION OF Co (II) AND Ni (II) BY NON-CYCLIC, MONOCYCLIC AND BICYCLIC LIGANDS IN METHANOL. *Inorg. Chim. Acta.*, 108: 241-245, 1985.
16. Capaldi, R. MITOCHONDRIAL MYOPATIES AND RESPIRATORY CHAIN PROTEINS. *T.I.B.S.*, 13 (4): 144-148, 1988.
17. Carabez, A. & Sandoval, F. ON THE MECHANISM OF ACTION OF POLYETERHER XXVIII AT SITE I OF ELECTRON-TRANSFER CHAIN IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 638: 125-131, 1981.
18. Collis, H., Estrada-O, S. & Montal, M. MODEL TRANSLOCATORS FOR MONOVALENT AND DIVALENT ION TRANSPORT IN PHOSPHOLIPID MEMBRANES. I. THE ION PERMEABILITY INDUCED IN LIPID BILAYERS BY THE ANTIBIOTIC X 537- A. *J. Membr. Biol.*, 18: 187-199, 1974.
19. Christensen, J.J., Lamb, J.D., Izatt, S.R., Starr, S.E., Weed, G.C., Astin, M.S., Stitt, B.D. & Izatt, R.M. EFFECT OF ANION TYPE ON THE RATE OF FACILITATED TRANSPORT OF CATIONS ACROSS LIQUID MEMBRANES VIA NEUTRAL MACROCYCLIC CARRIERS. *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (10): 3219-3220, 1980.
20. Dean, J.A. LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTRY. Mc.Graw-Hill Co., NY, EUA, 1972.
21. De Meis, L. & Inesi, G. EFFECTS OF ORGANIC SOLVENTS, METHYLAMINES AND UREA ON THE AFFINITY FOR P_i OF DE Ca -ATPase OF SARCOPLASMIC RETICULUM.

J. Biol. Chem. 263 (1): 157-161, 1988.

22. Dijkstra, P.J., den Hertog Jr. H.J., Van Eerden, J., Harkema, S. & Reinhoud, D.N. 4-PYRAN AND PYRILIUM HEMISPHERANDS: PARTLY PRE-ORGANIZED IONOPHORES WITH REACTIVE MOLECULAR CAVITIES. J. Org. Chem., 53:374-382, 1988.

23. Dix, J.P. & Vögtle, F. IONENSELEKTIVE FARBSTOFFKRONENETHER. Chem. Ber. 113: 457-470, 1980.

24. Dix, J.P., Wittenbrink-Dix, A. & Vögtle, F. ION-SELECTIVE STEERING OF THE REACTION RATE AND OF THE CATALYST ACTIVITY BY CROWN-ETHER COMPLEXATION. Naturwissenschaften, 67:5.91, 1980.

25. Eisenman, G., Ciani, S.M. & Szabo, G. SOME THEORETICALLY EXPECTED AND EXPERIMENTALLY OBSERVED PROPERTIES OF LIPID BILAYER MEMBRANES CONTAINING NEUTRAL MOLECULAR CARRIERS OF IONS. Fed. proc. 27 (6): 1289-1304, 1968.

26. Eisenman, G., Szabo, G., Mc Laughlin, S.G.A. & Ciani, S.M. MOLECULAR BASIS FOR THE ACTION OF MACROCYCLIC CARRIERS ON PASSIVE IONIC TRANSLOCATION ACROSS LIPID BILAYER MEMBRANES. J. Bioenergetics., 4: 93-148, 1973.

27. Estrada-O, S., Graven, S.N. & Lardy, H.A. EFFECTS OF NIGERICIN ON THE MITOCHONDRIAL ION TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORILATION. Fed. Proc. 26: 610-614, 1967.

28. Estrada-O, S., Rightmire, B. & Lardy, H.A. ANTIBIOTICS AS TOOLS FOR METABOLIC STUDIES XI. SPECIFIC INHIBITION OF ION TRANSPORT BY THE MONENSINS. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 6: 279-288, 1967.

29. Estrada-O, S. & Calderón, E. POTASSIUM AND PROTON LINKED MOVEMENTS IN RELATION TO THE ENERGY LINKED TRANSPORT OF PHOSPHATE IN LIVER MITOCHONDRIA. Biochem., 9 (10): 2092-2099, 1970.

30. Estrada-O, S. & Cárabez, A. SPECIFIC INHIBITION BY MACROCYCLIC POLYETHERS OF MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AT SITE I. J. Bioenergetics, 3: 429-443, 1972.

31. Estrada-O, S. & Gómez-Lojero, C. ELECTRON TRANSFER AND ENERGY COUPLING AT THE NADH-UBIQUINONE SEGMENT OF MITOCHONDRIA. en Mitochondrial Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure, Academic Press. NY, EUA. p 167-180, 1976.

32. Fleischer, S., Brierley, G. & Klowen, H. STUDIES OF THE ELECTRON TRANSFER SYSTEM. XXXVIII. LIPID COMPOSITION OF PURIFIED ENZYME PREPARATIONS DERIVED FROM BEEF HEART MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. 236: 2936-2941, 1961.

33. Fok, A.K. & Ueno, M.S. IONOPHORES AND WEAK BASES INHIBIT PHAGOLYSOSOMAL PROTEOLYSIS IN PARAMECIUM. Eur. J. Cell. Biol., 45: 145-150, 1987.

34. Frensdorff, H.K. STABILITY CONSTANTS OF CYCLIC POLYETHER COMPLEXES WITH UNIVALENT CATIONS. J. Am. Chem. Soc., 93 (3): 600-606, 1970.

35. Fritz, S.J. & Schenck, H.G. QUANTITATIVE ANALYTICAL CHEMISTRY. Allyn & Bacon, 4th. Edition. NY. EUA.

36. Gad, S.C., Conroy, W.J., McKelvey, J.A. & Turney, R.A. BEHAVIOURAL AND NEUROPHARMACOLOGICAL TOXICOLOGY OF THE MACROCYCLIC ETHER 18-CROWN-6. Drug. Chem. Tox., 1: 339-354, 1978.

37. Gad, S.C., Reilly, C., Siino, K., Gavigan, F.A. & Witz, G. THIRTEEN CATIONIC IONOPHORES: THEIR ACUTE TOXICITY, NEUROBEHAVIOURAL AND MEMBRANE EFFECTS. Drug. Chem. Tox., 8 (6): 451-468, 1985.

38. Garbers, D.L. THE ELEVATION OF CYCLIC AMP CONCENTRATIONS IN FLAGELLA-LESS SEA URCHIN SPERM HEADS., J. Biol. Chem., 256: 2235, 1981.

39. Gerow, I.H., Smith Jr, J.E. & Davis Jr, M.W. EXTRACTION OF Cs^+ AND Sr^+ FROM HNO_3 SOLUTION USING MACROCYCLIC POLYETHERS. Sep. Sci. Tech., 16 (5): 519-548, 1981.

40. Gómez-Puyou, A. & Gómez-Lojero, C. THE USE OF IONOPHORES AND CHANNEL FORMERS IN THE STUDY OF THE FUNCTION OF BIOLOGICAL MEMBRANES. en Current Topics of Bioenergetics, Vol 6., Academic Press, NY, EUA, p 22-257, 1977.

41. Grootenhius, P.D.J., Sudholter, E.J.R., van Staveren, C.J. & Reinhoudt, D.N. DYNAMICS OF MOLECULAR CAVITIES OF MACROCYCLIC POLYETHERS AND OF THE CORRESPONDING GUANIDINIUM PERCHLORATE COMPLEXES. A CARBON-13 NMR T1 RELAXATION TIME STUDY. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1426-1428, 1985.

42. Hancock, R.D., Dobson, S.M., Evers, A., Wade, P.W., Ngwenya, M.P., Boeyens, J.C.A. & Wainwright, K.P. MORE RIGID MACROCYCLIC LIGANDS THAT SHOW METAL ION SIZE-BASED SELECTIVITY. A CRISTALLOGRAPHIC, MOLECULAR, MECHANICS AND FORMATION CONSTANT STUDY OF THE COMPLEXES OF BRIDGED CYCLEN. J. Am. Chem. Soc., 110: 2788-2794, 1988.

43. Hashida, Y. & Matsui, K. COMPLEXATION OF ARENEDIAZONIUM IONS WITH A MACROCYCLIC POLYETHER. THE STABILITY CONSTANTS OF COMPLEXES, Bull. Chem Soc. Jpn., 53: 551-552, 1980.

44. Hatefi, Y. PREPARATION AND PROPERTIES OF THE

ENZYMES AND ENZYME COMPLEXES OF THE MITOCHONDRIAL
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. En Methods in
Enzymology, vol. LIII: Biological Oxidations on
Mitochondria and Microbial systems. Ed. by Fleischer, S.
& Packer, L., Academic Press. NY. EUA., pp 3-14, 1978.

45. Hatefi, Y. PREPARATIONS AND PROPERTIES OF
NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE. En Methods in Enzymology.
vol LIII: Biological Oxidations: Mitochondria and
Microbial Systems. Ed. Fleischer, S. & Packer, L., Academic
Press, NY. EUA., pp 15-20, 1978.

46. Hatefi, Y. THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. Ann.Rev.Biochem., 54:
1015-1069, 1985.

47. Hatefi, Y. & Stigall, D.L. METAL- CONTAINING
FLAVOPROTEIN DEHYDROGENASES in The Enzymes. Editado por
Boyer, P.D., Academic Press, NY. EUA., Vol XIII, parte C,
No. 4 ,p 175-221, 1976.

48. Hatefi, Y., Ragan, C.J., & Galante, Y.M. THE ENZYMES IN
BIOLOGICAL MEMBRANES. Vol IV., Ed. by Martonosi, A., Plenum
Press, NY., pp 1-70, 1985.

49. Hayakawa, K., Kido, K. & Kanematsu, K. SYNTHESIS AND
CHARACTERIZATION OF CROWNED 1,4-BENZOQUINONES AS
IONOPHORE-DIENOPHYTE (REDOX) COMBINED SYSTEMS; DOUBLE
INTERACTION WITH CATECHOLAMINES AND TRYPTAMINE.
J.Chem.Soc.Ferkin.Trans., I: 511-519, 1988.

50. Haynes, D.H. & Pressman, B.C. TWO-PHASE PARTITION
STUDIES OF ALKALI CATION COMPLEXATION BY IONOPHORES. J.
Membr. Biol., 18: 1-21, 1974. (a)

51. Haynes, D.H., Wiens, T. & Pressman, B.C. TURNOVER NUMBERS
FOR IONOPHORE-CATALYZED CATION TRANSPORT ACROSS THE
MITOCHONDRIAL MEMBRANE. J.Membr.Biol., 18: 23-38, 1974.
(b)

52. Hendrixson, R.R., Mack, M.P., Palmer, R.A., Ottolenghi, A.
& Ghirardelli, R.G. ORAL TOXICITY OF THE CYCLIC POLYETHERS
12-CROWN-4, 15-CROWN-5 AND 18-CROWN-6 IN MICE.
Tox.Appl.Pharm., 44:263-268, 1978.

53. Herrmann, V., Tümmler, B., Maass, G., Koo Tze Maw, P. &
Vogtle, ANTHRACENOYL CROWN ETHERS AND CRYPTANDS AS
FLUORESCENT PROBES FOR SOLID-PHASE TRANSITIONS OF
PHOSPHATIDYL CHOLINES: SYNTHESIS AND PHOSPHOLIPID
MEMBRANE STUDIES. Biochem., 23: 4059-4067, 1984.

54. Hilgenfeld, R. & Saenger, W. A TERNARY CROWN ETHER
"SUPERCOMPLEX": X RAY STRUCTURE ANALYSIS OF THE 1:1:1
ADDUCT OF DIBENZO-18-CROWN-6, KI AND THIUREA.
Angewandte.Chimie.Int.Ed.Engl., 20 (12):1045-1046, 1981.

55. Huges, B.P., Blackmore, P.F. & Exton, J.H. EXPLORATION OF THE ROLE OF SODIUM IN THE α -ADRENERGIC REGULATION OF HEPATIC GLYCOGENOLYSIS., FEBS Lett., 121: 260, 1980.
56. Iwachido, T., Minami, M., Kimura, M., Sadakane, A., Kawasaki, M. & Tlei, K. THE COEXTRACTION OF WATER INTO NITROBENZENE WITH ALKALI AND ALKALINE EARTH METAL SALTS OF 2,2',4,4',6,6'-HEXADINITROPHENYLAMINE IN THE PRESENCE OF SEVERAL CROWN ETHER AND CRYPTANDS. Bull.Chem.soc.Jpn., 53: 703-708, 1980.
57. Izatt, R.M., Rytting, J.W., Nelson, D.P., Haymore, B.L., & Christensen, J.J. BINDING OF ALKALI METAL IONS BY CYCLIC POLYETHERS: SIGNIFICANCE IN ION TRANSPORT PROCESSES. Science, 164: 443-444, 1969.
58. Izatt, R.M., Terry, R.E., Nelson, D.P., Chan, Y., Eatough, D.J., Bradshaw, J.S., Hansen, L.D. & Christensen, J.J. CALORIMETRIC TITRATION STUDY OF THE INTERACTION OF SOME UNI- AND BIVALENT CATIONS WITH BENZO-15-CROWN-5, 18-CROWN-6, DIBENZO-24-CROWN-8 AND DIBENZO-27-CROWN-9 IN METHANOL-WATER SOLVENTS, AT 25 °C AND $m=0.1$. J.Am.Chem.Soc., 98(24): 7626-7629, 1976.
59. Jagur-Grodzinski, J. PROTONATION OF MACROCYCLIC POLYETHERS. Israel.J.Chem., 25: 39-42, 1985.
60. Kajiwarra, T. & Tauzer, M.L. UNDERSULFATED α -D-XYLOSIDIC GLUCOSAMINOGLYCANS ARE SECRETED IN THE PRESENCE OF THE IONOPHORE MONENSIN. FEBS Lett., 134: 43, 1981.
61. Kamata, S., Yamasaki, K., Higo, M., Bahle, A. & Fukunaga, Y. COPPER (II)-SELECTIVE ELECTRODES BASED ON MACROCYCLIC THIOETHERS. Analyst., 113, 45-47, 1988.
62. Kimura, E., Machida, R. & Kodama, M. MACROCYCLIC DIOXOPENTAAMINES: NOVEL LIGANDS FOR 1:1 Ni (II)O₂ ADDUCT FORMATION. J.Am.Chem.Soc., 100: 5497-5505, 1984.
63. Kimura, K., Tamura, H. & Shono, T. A HIGHLY SELECTIVE IONOPHORE FOR POTASSIUM IONS: A LIPOPHILIC BIS (15-CROWN-5) DERIVATIVE. J.Chem.Soc.Chem.Comm.: 492-493, 1983.
64. Kimura, K., Kitazawa, S. & Shono, T. HIGHLY SELECTIVE IONOPHORE FOR LITHIUM IONS. 14-CROWN-4 DERIVATIVE BEARING A LONG ALIPHATIC CHAIN. Chemistry.Letters.: 639-640, 1984. (a)
65. Kimura, K., Kitazawa, S. & Shono, T. LIPOPHILIC CROWN 4 DERIVATIVES AS LITHIUM IONOPHORES. J.Am.Chem.Soc., 106 (23): 6978-6983, 1984. (b)
66. Koshima, H. & Ohnishi, H. EXTRACTION OF IRON III WITH CROWN ETHERS FROM HYDROCHLORIC ACID SOLUTION. Anal.Sci.,

1: 389-390, 1985.

67. Koshima, H. & Ohnishi, H. EXTRACTION OF IRON (III), GOLD (III), GALLIUM (III), THALLIUM (III), ANTIMONY (V) AND ANTIMONY (III) FROM HYDROCHLORIC ACID SOLUTION WITH CROWN ETHERS. *Analyst.*, 111: 1261-1264, 1986.

68. Kushi, Y., Machida, R. & Kimura, E. CO-ORDINATION OF A 16 MEMBERED DIOXOPENTAAMINE MACROCYCLE TP HIGH-SPIN NICKEL (II) X RAY STUDY OF STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR A MONOOXYGENASE MODEL. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 216-218, 1985.

69. Lamb, J.D., Izatt, R.M., Swain, C.S. & Christensen, J.J. A SYSTEMATIC STUDY OF THE EFFECT OF MACROCYCLE RING SIZE AND DONOR ATOM TYPE ON THE $\log K$, ΔH AND ΔS OF REACTIONS AT 25 C IN METHANOL OF MONO- AND DIVALENT CATIONS WITH CROWN ETHERS. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (2): 475-478, 1980. (a)

70. Lamb, J.D., Izatt, R.M., Swain, C.S., Bradshaw, J.S. & Christensen, J.J. CATION COMPLEXES OF CROWN ETHER DIESTERS. STABILITIES, ENTHALPIES AND ENTROPIES OF REACTION AT 25 C IN METHANOL. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (2): 479-482, 1980. (b)

71. Lamb, J.D., Christensen, J.J., Izatt, S.R., Bedke, K., Astin, M.S. & Izatt, R.M. EFFECTS OF SALTS CONCENTRATION AND ANION ON THE RATE OF CARRIER-FACILITATED TRANSPORT OF METAL CATIONS THROUGH BULK LIQUID MEMBRANES CONTAINING CROWN ETHERS. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 3399-3403, 1980. (c)

72. Lamb, J.D., Christensen, J.J., Oscarson, J.L., Nielsen, B.L., Asay, B.W. & Izatt, R.M. THE RELATIONSHIP BETWEEN COMPLEX STABILITY CONSTANTS AND RATES OF CATION TRANSPORT THROUGH LIQUID MEMBRANES BY MACROCYCLIC CARRIERS. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 6820-6824, 1980. (d)

73. Lamb, J.D., Izatt, R.M., Robertson, P.A. & Christensen, J.J. HIGHLY SELECTIVE MEMBRANE TRANSPORT OF Pb^{2+} FROM AQUEOUS METAL ION MIXTURES USING MACROCYCLIC CARRIERS. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (2): 2452-2454, 1980. (e)

74. Lardy, H. INFLUENCE OF ANTIBIOTICS AND CYCLIC POLYETHERS ON ION TRANSPORT IN MITOCHONDRIA. *Fed. Proc.*, 27 (6): 1278-1282, 1968.

75. Lardy, H.A., Graven, S.N. & Estrada-O, S. SPECIFIC INDUCTION AND INHIBITION OF CATION AND ANION TRANSPORT IN MITOCHONDRIA. *Fed. Proc.*, 26: 1355-1360, 1967.

76. Leong, B.K.J., Ts'o, T.O.T. & Chenoweth, M. TESTICULAR ATROPHY FROM INHALATION OF ETHYLENE OXIDE CYCLIC TETRAMER. *Tox. Appl. Pharm.*, 27: 342-354, 1974.

77. Lupo, B., Gal, M. & Tarrago, G. SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS IONOPHORES DE CORONANDES HÉTÉROCYCLIQUES. I. MACROCYCLES À UNITÉS MONOPYRAZOLIQUES. Bull. Soc. Chim. de France., 11-12: 464-472, 1984. (a)
78. Lupo, B. & Tarrago, G., SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS IONOPHORES DE CORONANDES HÉTÉROCYCLIQUES. II. MACROCYCLES À UNITÉS BIPYRAZOLIQUES. Bull. Soc. Chim. de France., 11-12: 473-479, 1984. (b)
79. Lupo, B. & Tarrago, G. SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS IONOPHORES DE MACROCYCLES TETRAPYRAZOLIQUES., Tetrahedron., 41 (2): 421-425, 1985.
80. Man, V.F., Dale Lin, J. & Cook, K.D. ELECTROHYDRODYNAMIC MASS SPECTROMETRIC STUDIES OF SOME POLYETHER-CATION COMPLEXES. J. Am. Chem. Soc., 107: 4635-4640, 1985.
81. Mc Laughlin, S.G.A., Szabo, G., Ciani, S. & Eisenman, G. THE EFFECTS OF A CYCLIC POLYETHER ON THE ELECTRON PROPERTIES OF PHOSPHOLIPID BILAYER MEMBRANES. J. Membr. Biol., 9:3-30, 1972.
82. Mitchell, P. CHEMIOSMOTIC COUPLING IN OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION. Biol. Rev., 41: 445-502, 1966.
83. Mitchell, P. A COMMENTARY ON ALTERNATIVE HYPOTHESES OF PROTONIC COUPLING IN MEMBRANE SYSTEMS CATALYSING OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATIONS., FEBS Lett. 78 (1): 1-20, 1977.
84. Mitchell, P. LES PRIX NOBEL EN 1978., en The Nobel Found., Stockholm, pp 135-172, 1978.
85. Mizuno, T., Nakatsuji, Y., Yanagida, Sh. & Okahara, M. THE SYNTHESIS AND CATION-COMPLEXING ABILITY OF ALKALI CROWN ETHERS. Bull. Chem. Soc. Jpn., 53: 481-484, 1980.
86. Morphy, J.R., Parker, D., Alexander, R., Bains, A., Carne, A.F., Eaton, M.A.W., Harrison, A., Millican, A., Phipps, A., Rhind, S.K., Titmas, R. & Weatherby, R. ANTIBODY LABELLING WITH FUNCTIONALISED CYCLAM MACROCYCLES. J. Chem. Soc. Chem. Commun.: 156-159, 1988.
87. Müller, P. & Rudin, D.O. DEVELOPMENT OF K AND Na DISCRIMINATION IN EXPERIMENTAL BIMOLECULAR LIPID MEMBRANES BY MACROCYCLIC ANTIBIOTICS. Biophys. Biochem. Res. Commun., 26 (4): 398-404, 1967.
88. Nelson, G.A. & Ward, S. VESICLE FUSION, PSEUDOPOD EXTENSION AND AMEBOID MOTILITY ARE INDUCED IN NEMATODE SPERMATIDS BY THE IONOPHORE MONENSIN. Cell., 19: 457, 1980.

89. Nolte, R.J.M., Van Beijen, A.J.M., Neevel, J.G., Zwikker, J.M., Verkeley, A.J. & Drenth, W. AN ARTIFICIAL CHANNEL TYPE IONOPHORE. Israel. J.Chem., 24: 297-301, 1984.
90. Odell, B. THE DISSOLUTION OF POLYNUCLEOTIDES IN NON-AQUEOUS SOLVENTS USING MACROCYCLIC POLYETHERS. J.Chem.Soc.Chem.Comm.: 858-859, 1985.
91. Odell, B. & Earlam, G. DISSOLUTION OF PROTEINS IN ORGANIC SOLVENTS USING MACROCYCLIC POLYETHERS: ASSOCIATION CONSTANTS OF A CITOCROME C-11,2-C1-19-CROWN-6 COMPLEX IN METHANOL. J.Chem.Soc.Chem.Comm.: 359-361, 1985.
92. Ohnishi, T. MECHANISM OF ELECTRON TRANSPORT AND ENERGY CONSERVATION IN THE SITE I REGION OF THE RESPIRATORY CHAIN., Biochim. et Biophys. Acta., 301: 105-128, 1973.
92. Ohnishi, T. MEMBRANE PROTEINS IN ENERGY TRANSDUCTION. Ed by Capaldi, R., NY, EUA, Marcel Dekker Ed., pp1-87, 1979.
93. Ohnishi, T., Ragan, I. & Hatefi, Y. EPR STUDIES OF IRON-SULPHUR CLUSTERS IN ISOLATED SUBUNITS AND SUBFRACTIONS OF NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE. J. Biol. Chem., 260 (5): 2782-2788, 1985.
94. Ohnme-Johnson, W.H. & Ohnme-Johnson, N.R. OVERVIEW OF IRON-SULFUR PROTEINS. in Methods in Enzymology, vol LIII: Biomembranes. Part D.: Biological Oxidations, Mitochondrial and Microbial Systems. Ed. Fleischer, S. & Packer, L., NY, EUA, pp 259-268, 1978.
95. Otsuka, H., Nakamura, H., Takagi, M. & Ueno, K. EXTRACTION OF ALKALI METAL PICRATES BY CROWN ETHERS HAVING UNCHARGED COORDINATING FLEXIBLE CHAINS., Anal.Chim.Acta., 147: 227-233, 1983.
96. Pannell, K.H., Rodriguez, B.J., Chiocci, S., Jones, L.P. & Molinar, J. BIBENZO CROWN FACILITATED TRANSPORT ACROSS A CHCL LIQUID MEMBRANE. J.Membr.Sci., 11: 169-175, 1982.
97. Pannell, K., La Neave, C.K., Rico, E. & Arkles, B. CONCERNING WITH THE RELATIVE NON-TOXICITY OF SILACROWN IONOPHORES. Pharm.Biochem.& Behaviour., 21 (1): 77-80, 1984.
98. Pannell, K.H., Rico, E., La Neave, C., Rahimian, K. & Amaya, A. SILACROWN IONOPHORES. J.Membr.Sci., 32: 83-91, 1987.
99. Pedersen, C.J. CYCLIC POLYETHERS AND THEIR COMPLEXES WITH METAL SALTS. J.Am.Chem.Soc., 89 (10): 2495-2496, 1967. (a)

100. Pedersen, C.J. CYCLIC POLYETHERS AND THEIR COMPLEXES WITH METAL SALTS. J. Am. Chem. Soc., 89 (10): 7017-7036, 1967. (b)
101. Pedersen, C.J. IONIC COMPLEXES OF MACROCYCLIC POLYETHERS. Fed. Proc., 27 (6): 1305-1309, 1968.
102. Pedersen, C.J. CRYSTALLINE SALT COMPLEXES OF MACROCYCLIC POLYETHERS. J. Am. Chem. Soc., 92 (2): 386-391, 1970. (a)
103. Pedersen, C.J. NEW MACROCYCLIC POLYETHERS. J. Am. Chem. Soc., 92 (2): 391-394, 1970. (b)
104. Pedersen, C.J. THE DISCOVERY OF CROWN ETHERS. Science., 214 (4865): 536-540, 1988.
105. Perlman, R.L., Cossi, A.F. & Role, L.W. MECHANISMS OF IONOPHORE-INDUCED CATECHOLAMINE SECRETION. J. Pharmacol. Exp. Ther., 213: 241, 1980.
106. Piedras, E., Rivera, B., Alva, R., Arzst, E., Toro, L., Toro, M. y Estrada-O, S. NIGERICIN INTERACTION WITH MONO-, DI- AND TRIVALENT CATIONS: Li^+ , Ca^{2+} AND Pr^{3+} . 30th Annual meeting of the Biophysical Society, SF. CAL, 1986.
107. Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. & Johnson, . ANTIBIOTIC MEDIATED TRANSPORT OF ALKALI IONS ACROSS LIPID BARRIERS., Proc. Natl. Acad. Sci., 58: 1947-1950, 1967.
108. Pressman, B.C. IONOPHOROUS ANTIBIOTICS AS MODELS FOR BIOLOGICAL TRANSPORT. Fed. Proc., 27 (6): 1283-1288, 1968.
109. Pressman, B.C. PROPERTIES OF IONOPHORES WITH BROAD RANGE SELECTIVITY., Fed. Proc., 32 (6): 1698-1703, 1973.
110. Rawle, S.C., Yagbasa, R., Prout, K. & Cooper, S.R. CROWN THIOETHER CHEMISTRY. SYNTHESIS AND STRUCTURE OF [BIS (1,4,7-TRITHIACYCLONONANE) RHODIUM] TRIS (TRIFLATE): STABILIZATION OF MONOMERIC Rh (II)., J. Am. Chem. Soc., 109: 6181-6182, 1987.
111. Reinhoudt, D.N., deBoer, J.A.A., Uiterwijk, H.M. & Harakema, S. COMPLEXATION OF POLYFUNCTIONAL ORGANIC GUEST MOLECULES BY MACROCYCLIC POLYETHERS. COMPLEXES OF S-TERT-BUTYLISOTHIOURONIUM SALTS WITH 18-CROWN-6 AND 1,3-XYLYL-18-CROWN-5., J. Org. Chem., 50: 4809-4812, 1985.
112. Reed, P. IONOPHORES. En Methods in Enzymology, vol LV, Ed. by Fleischer, S. & Packer, L., Academic Press, NY, EUA, pp 435-454, 1979.

113. Rodrigue, A., Bovenkamp, J.W., Lacroix, B.V., Barnard, R.A.B. & Buchanan, G.W. COMPLEXES OF 18-CROWN-6 MACROCYCLIC ETHERS OBTAINED FROM ETHEREAL SOLVENTS. COMPLEXES OF K AND Na SALTS WITH HOST-GUEST RATIOS OF 1:2 AND 1:3., Canadian.J.Chem., 64 (4): 808-815, 1986.
114. Schlafer, M. & Kane, J. SUBCELLULAR ACTIONS AND POTENTIAL ADVERSE CARDIAC EFFECTS OF THE CARDIOTONIC IONOPHORE MENENSIN, Pharmacol.Exp.Ther., 214: 567, 1980.
115. Shanzer, A., Felder, C.E. & Lifson, S. DESIGN SYNTHESIS AND CONFORMATION OF ION CARRIERS., Biopolymers, vol 22: 409-414, Ed. John Wiley & Sons, NY, EUA, 1983.
116. Shinar, H., Navon, G. & Klavi, W. NOVEL ORGANOMETALLIC IONOPHORE WITH SPECIFICITY TOWARDS Li^+ , J.Am.Chem.Soc., 108: 5005-5006, 1986.
117. Shirahama, K., Kamaya, H. & Ueda, I. ION SELECTIVE CROWN ETHER ELECTRODES FOR LOCAL ANESTHESIC CATIONS . Anal. Lett., 16 (b19): 1485-1494, 1983.
118. Singer, S.J. & Nicoloson, G.L. THE FLUID MOSAIC MODEL OF THE ESTRUCURE OF MEMBRANES. Science, 175: 720-731, 1972.
119. Singer, T.P. MITOCHONDRIAL ELECTRON-TRANSPORT INHIBITORS. En Methods in Enzymology. Vol 55, Ed by Fleischer, S & Packer, L, Academic Press., N.Y., pp 454-462, 1979.
120. Skuce, P.J. & Fairweather, I. FASCIOLA HEPATICA: PERTURBATION OF SECRETORY ACTIVITY IN THE VITELLINE CELLS BY THE SODIUM IONOPORE MONENSIN. Exp. Parasitol. 65:20-30, 1988.
121. Slater, E.C. APPLICATION OF INHIBITORS AND UNCOUPLERS FOR STUDY OF OXIDATIVE PHOSPHORILATION. En methods in Enzymology, Vol 10, Ed by Estabrook, R.W. & Pullman, M., Academic Press., N.Y., pp 48-57, 1968.
122. Somani, P. & Saini, R.K. A COMPARISON OF THE CARDIOVASCULAR, RENAL, AND CORONARY EFFECTS OF DOPAMINE AND MONENSIN IN ENDOTOXIC SHOCK. CIR.sHOCK, 8: 451, 1981.
123. Strzelbicki, J. & Bartsch, R.A. EXTRACTION OF ALKALINE EARTH CATIONS FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY CROWN ETHER CARBOXYLIC ACID. Anal. Chem. 53: 2247-2250, 1981. (a).
124. Strzelbicki, J. & Bartsch, R.A. SOLVENT EXTRACTION OF ALKALY METAL IONS FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY HIGHLY

LIPOPHILIC CROWN ETHER CARBOXYLIC ACIDS. Anal. Chem. 53: 2251-2253, 1981, (b).

125. Szabo, G. STRUCTURAL ASPECTS OF IONOPHORE FUNCTION. Fed. Proc., 40 (8): 92-97, 1981.

126. Tabeta, R., Aida, M. & Saito, H. A HIGH-RESOLUTION SOLID STATE ²³Na-NMR STUDY OF SODIUM COMPLEXES WITH SOLVENTS, SMALL LIGANDS MOLECULES, AND IONOPHORES. ²³Na CHEMICAL SHIFT AS MEANS FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ION-ION, ION-SOLVENT & ION-LIGAND INTERACTIONS. Bull. Chem. Soc. Jpn., 59: 1957-1966, 1986.

127. Taguchi, K., Hiratani, K., Sugihara, H. & Iio, K. NEW SYNTHETIC IONOPHORES EXHIBITING SELECTIVITY FOR ALKALINE EARTH METAL IONS. Chem. Lett. Jpn. Chem. Soc.: 1457-1460, 1984.

128. Takayama, K., Hasegawa, S., Nambu, N. & Nagai, T. APPARENT ORAL TOXICITY OF 18-CROWN-6 IN DOGS. Chem. Pharm. Bull. 25: 3125-3127, 1977.

129. Tashmukhamedova, A.K., Stempnevskaya, I.A., Shkinev, A.V., Mirkhodgaev, U.Z., Gagelgans, A.I., Tasmukhamedov, V.A.. EFFECT OF MACRO CYCLIC POLYETHERS ON THE PROPERTIES OF BIOLOGICAL AND ARTIFICIAL MEMBRANES. Studia Biophysica, 74: 53-54, 1978.

130. Thomas, C., Savterey, C., Casteign, M., Gary-Bobo, C.M., Lehn, J.M. & Plumere, P. CATION PERMEABILITY INDUCED BY TWO 15C5 MACROCYCLIC POLIETHER CARRIERS IN PHOSPHOLIPIDIC LARGE UNILAMELLAR VESICLES. Biochem. & Biophys. Res. Commun., 116 (3): 981-987, 1983.

131. Tajiri, K., Uchida, N. & Tauzer, M.L. UNDERSULFURATED PROTEOGYCANs ARE SECRETED BY CULTURE CONDROCYTES IN THE PRESENCE OF THE IONOPHORE MONENSIN. J. Biol. Chem., 255: 6036, 1980.

132. Tsukube, H. PROTON-ASSISTED TRANSPOR OF AMINO ACID AND RELATED POLYCARBOXYLATE ANIONS VIA POLYAMMONIUM MACROCYCLES. J. Chem. Soc. Perkin. Trans I.: 615-619, 1985.

133. Tosteson, D.C. EFFECT OF MACROCYCLIC COMPOUNDS ON THE IONIC PERMEABILITY OF ARTIFICIAL AND NATURAL MEMBRANES. Fed. Proc. 27(6): 1269-1273, 1968.

134. Tschudin, D. & Kaden, A. KINETICS MECHANISM OF THE HYDROLYSIS OF FUNCTIONAL GROUPS IN THE SIDE CHAIN OF THE

MACROCYCLIC Cu^{2+} COMPLEXES. Pure and Appl. Chem. 6(4): 489-493, 1988.

135. Tsukube, H., Takagi, K., Higashigama, T., Iwachido, T. & Hagama, N. "TRIPODE"-TYPE IONOPHORE FOR SPECIFIC TRANSPORT OF Ag^+ ION. Chem. Lett. Chem. Soc. Jpn.: 1079-1080, 1986.

136. Tsukube, H., Takagi, K., Higashigama, T., Iwachido, T. & Hagama, N. CATION BINDING PROPERTIES OF NEW ARMED MACROCYCLIC HOST MOLECULES AND THEIR APPLICATIONS TO PHASE TRANSFER REACTIONS AND CATION MEMBRANE TRANSPORT. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.: 1033-1037, 1986.

137. White, B.D., Arnold, K.A., Fronczek, F.R., Grandour, R.D. & Gokel, G.W. COMPLEXATION BY N-(3,6,9-TRIOXADECYL) MONOAZA-12-CROWN-4 LARIAT ETHER: A "CALABASH" COMPLEX OF A POTASSIUM CATION BY A SYNTHETIC MACROCYCLE CONTAINING A TOTAL OF ONLY 7 DONOR ATOMS. Tetrahedron Lett., 26(34): 4035-4038, 1985.

138. Wilson, D.F., Erecinska, M., Owen, C.S. & Mela, L. DYNAMICS OF ENERGY TRANSDUCING MEMBRANES. Ed. by Ernster, L. et al., Elsevier Co., Amsterdam, pp 221-231, 1974.

139. Wong, K.H., Yagi, K. & Smid, J. ION TRANSPORT THROUGH LIQUID MEMBRANES FACILITATED BY CROWN ETHERS AND THEIR POLYMERS. J. Membr. Biol., 18: 379-397, 1974.

140. Yoshida, S. & Shigeo, H. RELATIONSHIP BETWEEN THE EXTRACTABILITY AND THE RATE OF TRANSFER OF POTASSIUM IONS BY MACROCYCLIC CARRIERS IN LIQUID MEMBRANE SYSTEMS. J. Am. Chem. Soc., 108: 3903-3907, 1986.

La autora del presente Trabajo fué becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de abril de 1986 a mayo de 1988.

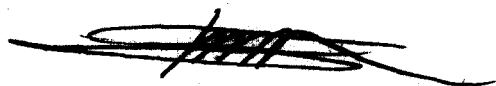
Este Trabajo recibió apoyo financiero proveniente del Fondo para Investigaciones "Ricardo J. Zevada", en 1986 y 1987.

AGRADECIMIENTOS.

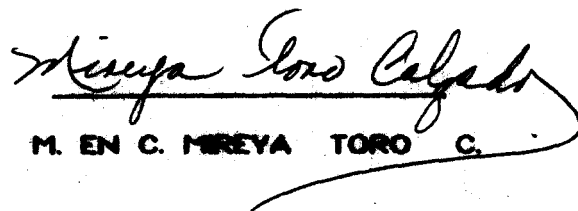
Al Dr. Segio Estrada Orihuela, a la M. en C. Mireya Toro Calzada y a la Dra. Ligia Toro Calzada, por su orientación y estímulo en mi formación académica.

A Julieta Piedras por su valiosa ayuda en la realización del material gráfico de este Trabajo.

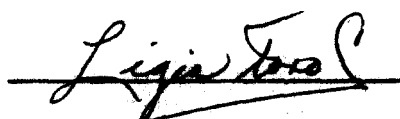
EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA
SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA APROBO EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, EL DIA 17
DE MARZO DE 1989.



DR. SERGIO ESTRADA-O.



M. EN C. MIREYA TORO C.



DRA. LIGIA TORO C.



DR. HELIODORO CELIS.