

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Obtención de los parámetros termodinámicos de la
formación de complejos de Cu^{2+} con un ciclofano y su
análogo de cadena abierta mediante calorimetría de titulación
isotérmica (ITC)**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

MELISSA BELTRAN TORRES

Hermsillo, Sonora

Marzo de 2017



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado para revisar la tesis profesional de **Melissa Beltran Torres**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico en Alimentos**.

Dra. Rocío Sugich Miranda
Directora de Tesis

Dr. Fernando Rocha Alonzo
Secretario

Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras
Vocal

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora y a los profesores por haberme otorgado el conocimiento necesario para poder llevar a cabo mi formación académica y esta tesis. De igual manera al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) por dejarme usar el equipo y materiales necesarios para realizar este trabajo.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada a través del proyecto de ciencia básica CD-B-2014-01(236216).

Agradezco a todos los estudiantes de posgrado del DIPM al igual que los profesores por guiarme al momento de realizar mis experimentos. De manera especial quiero agradecer a la Dra. Hisila Santacruz Ortega por siempre responder mis dudas. Al Dr. Fernando Rocha por aconsejarme y ser un gran maestro. También al Dr. Mario Sánchez por ayudarme con el cálculo en la optimización de las moléculas.

A mi directora de tesis, Dra. Rocío Sugich por confiar en mí y tener la paciencia suficiente y sobre todo por compartir su conocimiento conmigo. A mis hermanos esclavos Gustavo, Alfredo y Alberto.

A todos mis amigos de la carrera, Nallely, Estefanía, Marielos, Taco, Marianita y todos los demás que se volvieron como mi segunda familia durante 4 años de cansados pero divertidos días en los laboratorios de alimentos.

Y, por último, a todo químico, físico, científico que busca incansablemente la verdad.

DEDICATORIA

A mi familia por supuesto por siempre confiar en mí, a mis padres por ser un ejemplo a seguir y a mis hermanos, Karla Sofía y Sael.

A mis amigos quienes siempre me han escuchado y me han hecho sonreír en momentos difíciles.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Particulares	14
ANTECEDENTES.....	15
Ligantes Macrocíclicos.....	15
Ciclofanos	20
Antioxidantes en la Industria Alimentaria.....	22
Efecto Macrocíclico.....	23
Preorganización	25
Ligantes de cadena abierta.....	26
Compuestos de coordinación.....	29
Teoría ácidos y bases duros y blandos de Pearson.	30
Teoría del campo cristalino (TCC).....	30
Teoría del campo de los ligantes (TCL).....	31
Complejos de cobre	31
Factores que afectan la estabilidad de los complejos	32
Parámetros Termodinámicos	35
Equipo y Software	45
METODOLOGÍA.....	51
Materiales	51
Métodos.....	51
Preparación de soluciones de buffers	51
Preparación de soluciones de cobre	52
Preparación de soluciones de ligantes.....	52
Experimento ITC	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
Termogramas de Cu-OD.....	54
Termogramas de Cu-BZ	57
Estequiometría del complejo.....	60
Efecto de la geometría de coordinación sobre la estabilidad.....	63
Geometría Octaédrica.....	63
Geometría plana cuadrada.....	64
CONCLUSIÓN.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrios de coordinación de Cu(II) con poliaminas acíclicas y macrocíclicas derivadas de piperazina	12
Figura 2. Ligante macrocíclico edtaOD y ligante acíclico edtaBZ.....	13
Figura 3. Ejemplos de receptores moleculares.	16
Figura 4. Ejemplos de macrociclos con cuatro átomos de nitrógeno coplanares.....	17
Figura 5. a) Esquema ilustrativo de la unión de biotina a estreptavidina..	18
Figura 6. Estructuras químicas de los primeros ciclofanos reportados.....	20
Figura 7. Estructuras moleculares propuestas para los complejos tipo ciclofano de hierro (III) Fe ₂ PO y Fe ₂ PC.	21
Figura 8. Complejo con un ligante macrocíclico (1.15) y uno de cadena abierta (1.16)....	24
Figura 9. Estructuras de EDTA y CDTA y su respectiva separación de carga	25
Figura 10. Ejemplos de ligantes tipo podando	28
Figura 11. Ejemplos de ligantes de cadena abierta.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Estructura de las clorofilas a y b	29
Figura 13. Geometrías comunes de iones complejos.....	31
Figura 14. Distribución de especies de edtaOD	34
Figura 15. Distribución de especies de edtaBZ.	34
Figura 16. Modelo simplificado de una interacción receptor-ligante	35
Figura 17. Calorímetro de Titulación Isotérmica VP-ITC, Microcal, Inc.	46
Figura 18. Imagen ilustrativa dentro de un calorímetro de titulación isotérmica.....	46
Figura 19. Esquema ilustrativo de un experimento en ITC.....	47
Figura 20. Variación de la curva a medida que cambia el valor de c.....	48
Figura 21. Diagrama de flujo donde se resume los pasos seguidos durante el experimento	¡Error! Marcador no definido.
Figura 22. Termograma de la formación de complejo de Cu-OD a pH 5.0	55
Figura 23. Termograma de la formación de complejo de Cu-OD a pH 10.0.....	56
Figura 24. Termograma de la formación de complejo de Cu-BZ a pH 5.0.....	58
Figura 25. Termograma de la formación de complejo de Cu-BZ a pH 10.0.....	59
Figura 26. Bosquejo de los posibles modos de coordinación de los complejos.....	60
Figura 27. Estructura de rayos X de la molécula (edtaOD) ₂	61
Figura 28. Estructura de rayos X de la molécula edtaBZ	61
Figura 29. Estructuras optimizadas de la molécula edtaOD simuladas en GAUSSIAN 09.	62
Figura 30. Estructuras optimizadas de la molécula edtaBZ simuladas en GAUSSIAN 09.	62
Figura 31. Representación gráfica de los parámetros termodinámicos de la formación de complejo de edtaOD y edtaBZ con cobre a pH 5.0 y 10.0	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros termodinámicos para los complejos de Zn^{2+} de 1.15 y 1.16 (298K).	24
Tabla 2. Factores que influyen en la estabilidad de los complejos en solución.....	33
Tabla 3. Parámetros termodinámicos de la complejación de edtaOD con cobre (Cu-OD) a 25°C	54
Tabla 4. Parámetros termodinámicos de la complejación de edtaBZ con cobre (Cu-BZ) a 25°C	57

RESUMEN

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica ultrasensible que monitorea con precisión los cambios de calor en una reacción química la cual es ampliamente utilizada para estudiar la formación o disociación de complejos moleculares (Falconer, 2016; Hong y col, 2008) a través de la ITC se pueden obtener los parámetros termodinámicos, ΔH , ΔG , ΔS , K_a , al igual que la estequiometría (n) de la interacción ligante-sustrato. Por otra parte, es bien conocido que en general, los complejos con ligantes macrocíclicos pueden ser más estables, termodinámicamente, que sus análogos de cadena abierta. En este trabajo se realizó la caracterización termodinámica del complejo de Cu^{2+} de un ligante macrociclo (edtaOD) y otro de cadena abierta (edtaBZ), ambos se caracterizan por presentar diferentes geometrías de coordinación en función del pH (octaédrica a pH ácido y plano cuadrada a pH alcalino). La relevancia de estudiar el comportamiento de la formación de estos complejos, radica en que ambos presentan capacidad antioxidante y podrían ser utilizados en ciertos alimentos para evitar rancidez. Las mediciones se llevaron a cabo en un microcalorímetro MicroCal VP-ITC con soluciones de ligante 0.1mM y de CuCl_2 0.6mM a valores de pH 5.0 y 10.0. Los parámetros termodinámicos fueron exitosamente obtenidos a diferentes valores de pH. Independientemente de la geometría de coordinación la complejación ocurre de una manera espontánea y las constantes de asociación se encuentran en el orden de 10^7 - 10^8 lo que significa que la estabilidad del complejo es alta y que la afinidad del cobre por estos ligantes es alta también. Se esperaba que la preorganización del ciclofano favoreciera la formación de complejo, sin embargo, los resultados son similares respecto al podando. Además, la complejación a pH 10.0 con edtaOD es un sistema guiado por el factor entrópico y el fenómeno compensación entropía-entalpía se presentó. El valor de $n=0.5$ obtenido concluyó en la elucidación de que por cada dos ligantes un catión cobre se encuentra coordinado.

INTRODUCCIÓN

La química supramolecular, también conocida como la química más allá de la molécula, es el área de la ciencia que se encarga del estudio de las interacciones intermoleculares y los ensamblajes supramoleculares, que generalmente están constituidos por una molécula anfitriona y un huésped. Los inicios de la química supramolecular se deben, precisamente, a la química de coordinación en su sentido amplio, gracias a la síntesis de complejos de metales alcalinos con éteres de corona y criptandos, que dio lugar a lo que desde entonces se ha llamado reconocimiento molecular (Gispert, 2000).

El reconocimiento molecular biológico representa la expresión más compleja de reconocimiento molecular lo cual consiste en uniones altamente selectivas, reacciones, transporte, regulación entre otras cosas. También provee casos de estudio, ilustraciones e inspiración para revelar los principios básicos y la búsqueda de diseños de sistemas modelos como también de receptores abióticos. Las especies supramoleculares son caracterizadas por el ordenamiento en el espacio de sus componentes, su estructura o superestructura y por la naturaleza de sus enlaces intermoleculares, los cuales mantienen a los componentes juntos. Poseen propiedades conformacionales, termodinámicas, cinéticas, dinámicas y estructuras bien definidas (Lehn, 1995). Como ejemplo, Murakami y colaboradores han llevado a cabo estudios realizados con macrociclos con la finalidad de funcionar como modelos enzimáticos. Este grupo utilizó ciclofanos tipo pulpo con residuos de L-aspartato como receptores nobles solubles en agua (Murakami y col, 1990).

El estudio de los ensamblajes moleculares del tipo receptor-huésped ha llevado a la química supramolecular a estudios extensivos sobre las energías de unión al momento de formarse el complejo ya que el objetivo es de obtener sistemas con reconocimiento de alta afinidad (Turnbull y Daranas, 2000). Los complejos con ligantes macrocíclicos se distinguen por un ordenamiento específico de sitios de unión, los cuales controlan su ambiente de coordinación, lo que les confiere una buena estabilidad y selectividad. Además, se pueden presentar cambios significativos en las propiedades de la especie enlazada como consecuencia de la complejación (Inoue y col, 2001).

La estabilidad del complejo metal-ligante depende del tipo de átomos donadores, el tamaño de la cavidad, el catión en solución, el pH y las energías de unión de complejación. La investigación de los parámetros termodinámicos es esencial para tener un profundo entendimiento del efecto que tiene el anfitrión sobre la formación del complejo con el catión huésped y el solvente en que se lleva a cabo la reacción. En un estudio realizado por

Amisalan y colaboradores, la constante de estabilidad y los parámetros termodinámicos de la complejación de una diamida macrocíclica con metales de transición divalentes Co(II), Ni(II), Cu(II) y Zn(II) utilizando calorimetría de titulación isotérmica (ITC) fueron determinados en metanol a 25 °C. Mediante el uso de la ITC determinaron la estequiometría del complejo, la fuerza impulsora de cada sistema y la preferencia de la diamida macrocíclica por cierto metal de transición (Amisalan y col, 2010).

Debido a la funcionalidad que pueden presentar los macrociclos, en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) se han trabajado una serie de ciclofanos derivados de EDTA y sus complejos con cobre y hierro, en particular el complejo binuclear Fe_2PO el cual fue estudiado en aceite de pescado de arenque americano en donde se evaluó su efecto antioxidante resultando efectivo en retrasar la oxidación del aceite (López, 2016). Con la información recolectada sobre la capacidad antioxidante que estos compuestos de coordinación pueden tener, existe el interés de estudiar los parámetros termodinámicos de la formación de estos complejos debido a que nos aportaría valiosa información sobre el tipo de sistema, si son sistemas guiados entálpica o entrópicamente, así como también conocer la estabilidad de tal complejo.

Comúnmente, los complejos macrocíclicos presentan una mayor estabilidad termodinámica y cinética a diferencia de los complejos con ligantes de cadena abierta (Vafazadeh y Zare-Sadrabadi, 2015). El balance entre rigidez y flexibilidad es de particular importancia en las propiedades dinámicas y de unión de los ligantes. Se espera que los receptores rígidos que llevan a cabo el reconocimiento molecular del tipo llave-cerradura presenten reconocimiento muy eficaz: alta estabilidad y selectividad. Por otra parte, aquellos receptores flexibles que llevan a cabo la unión a través del proceso del ajuste inducido pueden presentar alta selectividad, pero baja estabilidad debido a que la mayoría de la energía de unión es usada para llevar a cabo el cambio conformacional del receptor (Lehn, 1995).

El concepto de “el efecto macrociclo”, el cual le aporta al ligante su respectiva estabilidad termodinámica se presenta en la figura 1. En la figura se ilustra la relación entre la conformación del ligante y la estabilidad del complejo. El dramático efecto macrociclo que se muestra en la reacción se debe a la muy desorganizada estructura de **A-14**. El anillo piperazínico de **A-14** domina en la conformación de silla en el ligante libre y debe convertirse a un bote energéticamente desfavorable o una conformación de bote torcido en el complejo. Esta complejación inducida por cambio conformacional reduce por mucho la constante de unión y esto es ausente en el macrociclo preorganizado.

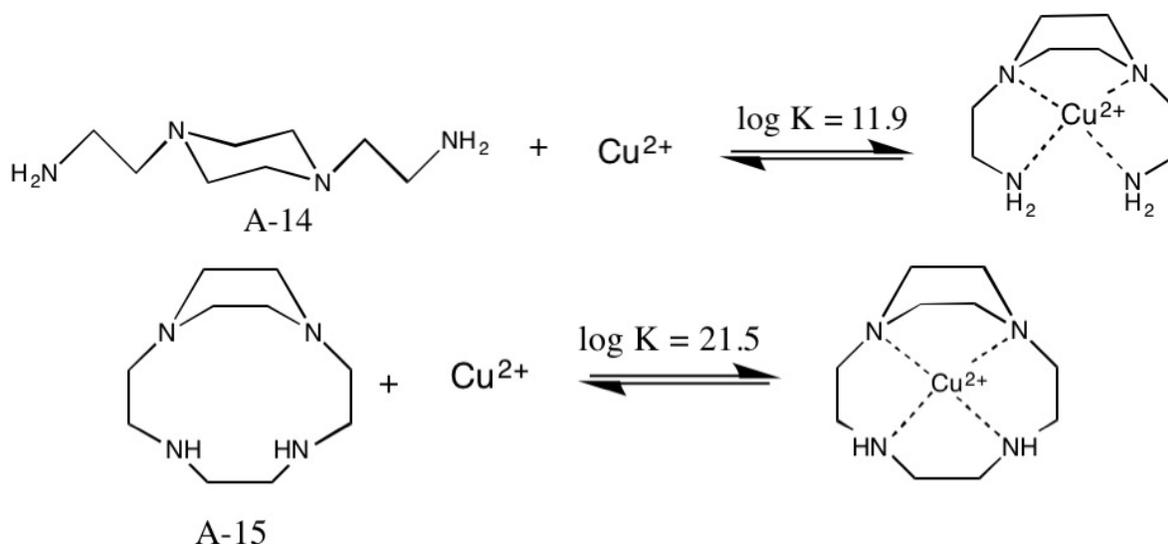


Figura 1. Equilibrios de coordinación de Cu(II) con poliaminas acíclicas y macrocíclicas derivadas de piperazina. Fuente: Schneider y Yatsimirky, 2000

Aunque los ligandos de cadena abierta se consideren menos estables que los macrociclos (Gispert, 2000), éstos presentan ciertas ventajas. Los receptores acíclicos sintéticos pueden ser más versátiles que los cíclicos en estudios de reconocimiento de biomoléculas complejas, principalmente debido a su fácil accesibilidad y funcionalidad con múltiples motivos (estructura secundaria superior) de unión. La dilución, pseudo-dilución o reacciones de larga duración no son necesarias y su alta libertad conformacional permite mayores ajustes inducidos (Rivera y col., 2013). Los procesos de intercambio, regulación, cooperatividad, y regulación alostérica requieren de flexibilidad. La flexibilidad es de gran importancia en interacciones biológicas del tipo receptor-substrato, en donde la adaptación es frecuentemente requerida para que ocurra la regulación (Lehn, 1995). Debido a la flexibilidad que presentan los podandos, estos son el tema central de varias investigaciones como el realizado Hosseini y su equipo en donde reportaron un interesante podando multifuncional. Demostraron que inclusive compuestos con estructuras simples pueden generar estructuras supramoleculares sorprendentes (Schamaltz y col, 2001).

Por otra parte, estudios realizados sobre ensamblajes moleculares tipo receptor-huésped son principalmente sobre trabajos relacionados con fármacos. La herramienta principal que se utiliza es calorimetría de titulación isotérmica (ITC) la cual provee cuatro parámetros termodinámicos: ΔH , ΔS , K_a y n (Falconer, 2016; Velázquez y col, 2015). El equipo provee los parámetros previamente mencionados, pero la energía libre de Gibbs (ΔG), que es otro parámetro importante al momento de caracterizar sistemas se puede

obtener mediante una simple ecuación. La ITC es una técnica muy conveniente debido que en un solo experimento se pueden obtener cuatro parámetros termodinámicos y de esta manera se puede obtener una caracterización termodinámica del sistema metal-ligante, es por este motivo y el interés que existe sobre las energías de unión que rigen a estos sistemas el objetivo del presente trabajo de obtener los parámetros termodinámicos de la formación de complejo de cobre a diferentes valores de pH con un ligante macrocíclico, edtaOD y su análogo de cadena abierta, edtaBZ (figura 2).

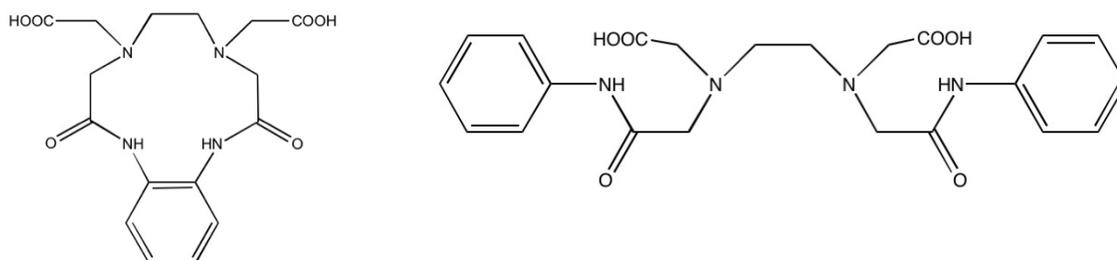


Figura 2. A la izquierda el ligante macrocíclico edtaOD y a la derecha el ligante acíclico edtaBZ

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener los parámetros termodinámicos de complejos de Cu^{2+} de un ciclofano y su análogo de cadena abierta a diferentes valores de pH mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Objetivos Particulares

1. Evaluar los parámetros termodinámicos, ΔH , ΔG , ΔS , K_a y n de la formación de los complejos de Cu^{2+} con un ligante macrocíclico (OD) y un ligante de cadena abierta (BZ) en medio ácido y básico.
2. Establecer si la preorganización del macrociclo favorece la complejación.
3. Elucidar los factores estructurales de los ligantes que influyen en la estabilidad de los complejos Cu-OD y Cu-BZ¹ en solución.

¹ Cu-OD y Cu-BZ, siglas que representan el complejo metal-ligante OD y BZ con cobre.

ANTECEDENTES

A fin de explicar mejor el cumplimiento del objetivo del presente trabajo a continuación, se dará una breve descripción de los ligantes edtaOD y edtaBZ.

El ligante OD ha sido previamente estudiado por técnicas espectrofotométricas, potenciométricas, ¹H NMR y cristalografía. La formación de complejo con cobre y otros metales a diferentes valores de pH se han estudiado. El estudio de este ligante proviene de una serie de macrociclos tipo ciclofanos (mono y binucleares) que el equipo de Inoue ha reportado anteriormente con el objetivo de funcionar como modelos enzimáticos sobre todo las propiedades redox de los complejos (Inoue y col, 2001a; Inoue y col, 2001b; Salazar y col, 2015, Sugich, 2001). Por otra parte, el ligante BZ forma parte de una familia de ligantes tipo podando con los que han trabajado Santacruz y colaboradores donde han evaluado las propiedades de emisión al momento de complejarse con diferentes metales como zinc y cadmio con la finalidad de proporcionar un nuevo quimiorreceptor fluorescente (Machi y col, 2006; Santacruz, 2007; Santacruz y col, 2011). Estos dos ligantes son derivados de etilendiaminatetracetato (EDTA) y son las estructuras más sencillas de su respectivo grupo de estudio.

Ligantes Macrocíclicos

Los ligantes macrocíclicos son un tipo de ligantes polidentados que pueden contener átomos donadores incorporados a su estructura o unidos al esqueleto del ciclo. Contienen al menos tres átomos donadores y el anillo macrocíclico debe estar formado por al menos nueve átomos; se caracterizan por contener cavidades estables y bien definidas. Esencialmente un ligante macrocíclico tiene la capacidad de enlazar a un átomo metálico dentro de su cavidad (Cotton y Wilkinson, 1988). Algunos ejemplos importantes de compuestos macrocíclicos son los éteres corona, calixarenos, ciclodextrinas y ciclofanos que se muestran en la figura 3.

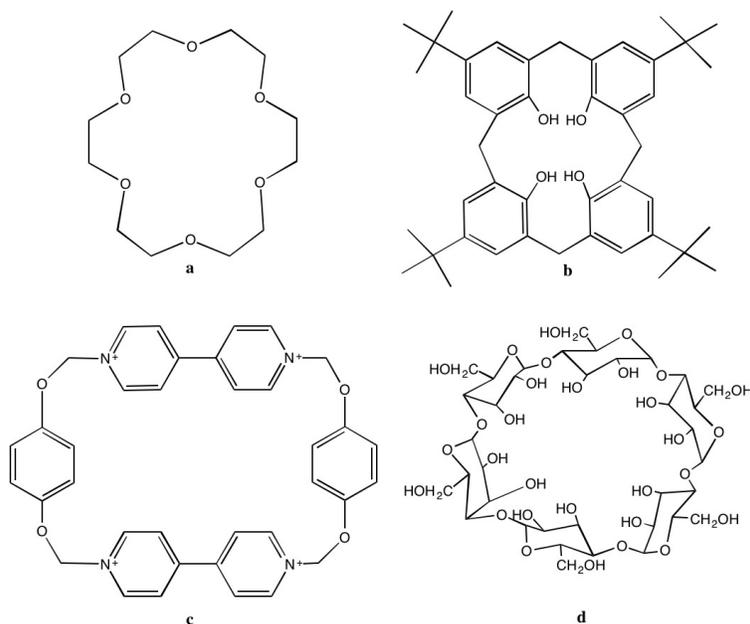


Figura 3. Ejemplos de receptores moleculares. (a) éter de corona (b) calixareno (c) ciclofano (d) α -ciclodextrina

Los complejos con ligantes macrocíclicos se distinguen por un ordenamiento especial y específico de sitios de unión, los cuales controlan su ambiente de coordinación y estereoquímica, esto les confiere una buena estabilidad y selectividad. Además, se pueden presentar cambios significativos en las propiedades de la especie enlazada como consecuencia de la complejación (Inoue, 2001). Como se mencionó anteriormente, en los macrociclos existe la presencia de átomos donadores que comúnmente son nitrógenos, también pueden ser átomos de oxígeno y azufre, o un grupo mezclado.

En los macrociclos nitrogenados los átomos dadores son nitrógeno (en número de tres o más), éstos son buenos ligantes para casi todos los elementos de transición, pueden contener únicamente enlaces sencillos, lo que les da gran flexibilidad, o enlaces dobles, que les confiere mayor rigidez (Gispert, 2000). Cabe resaltar que los macrociclos más estudiados han sido los que presentan un grupo de cuatro átomos de nitrógeno coplanares (figura 4), debido a que ocurren de forma natural como es el caso de las porfirinas, las ftalocianina y las corrinas (Cotton y Wilkinson, 1988).

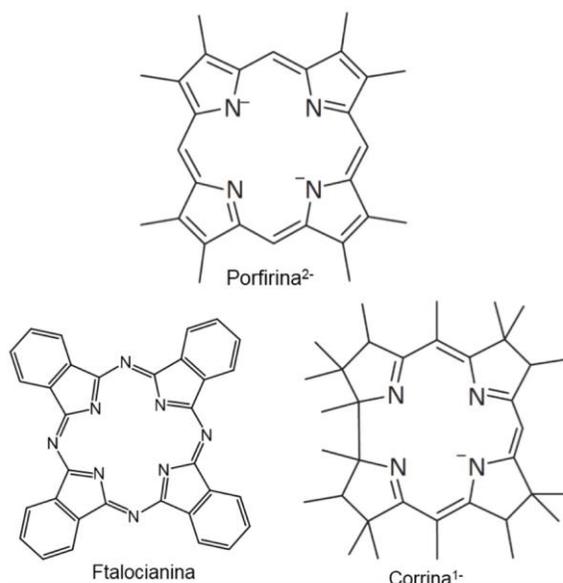


Figura 4. Ejemplos de macrociclos con cuatro átomos de nitrógeno coplanares

Se han diseñado diamidas macrocíclicas en donde los átomos de nitrógeno donadores son incorporados para coordinar con huéspedes cationes metálicos. Estos compuestos han sido exitosamente usados como ionóforos en el desarrollo de electrodos de iones selectivos (Shamsipur y col, 2002), como extracción o agentes complejantes de picrato conteniendo cationes tanto en medio acuoso como orgánico (Kimura y col, 1988), y como catalizadores en la reducción de cetonas a sus alcoholes correspondientes (Fonseca and König 2003).

Las propiedades anteriormente mencionadas, el ordenamiento espacial y la estabilidad, han generado un gran interés por el estudio de compuestos de coordinación con ligantes del tipo receptor. La cavidad que presentan éstos ligantes les confieren propiedades del tipo enzimática que, a diferencia de las enzimas no requieren de un pH específico, temperatura e inclusive concentración de sales en el medio para poder funcionar. Además, resultan ser relativamente más económicos de sintetizar y requieren menos cuidado de conservación. Sin embargo, las enzimas presentan la característica de ser altamente selectivas, es decir que tienen cierta afinidad a un sustrato en especial y que gracias a ellas se catalizan reacciones de grandes magnitudes en poco tiempo que, sin la ayuda de ellas, éstas reacciones tardarían años en realizarse.

Un ejemplo extremo de una eficiente unión biológica de varios sitios de unión ($K = 2.5 \times 10^{13} \text{M}^{-1}$) es la de biotina como huésped y su proteína receptora, estreptavidina (figura 5). Una alta energía libre de, -76 kJ mol^{-1} , resulta de las acciones simultaneas de más de

10 interacciones débiles que involucran fuerzas de van der Waals, electroestáticas, lipofílicas y puentes de hidrogeno, mientras que un receptor artificial utiliza solamente 4 puentes de hidrogeno para el reconocimiento molecular por lo tanto exhibe una $K = 9.3 \times 10^3 M^{-1}$. El objetivo al momento de diseñar receptores artificiales es obtener sistemas con altas constantes de asociación, tal es el caso de una azacorona protonada, la cual puede unir adenosina trifosfato (ATP) en agua con una constante de asociación de $10^{11} M^{-1}$ (Hosseini y Lehn, 1987).

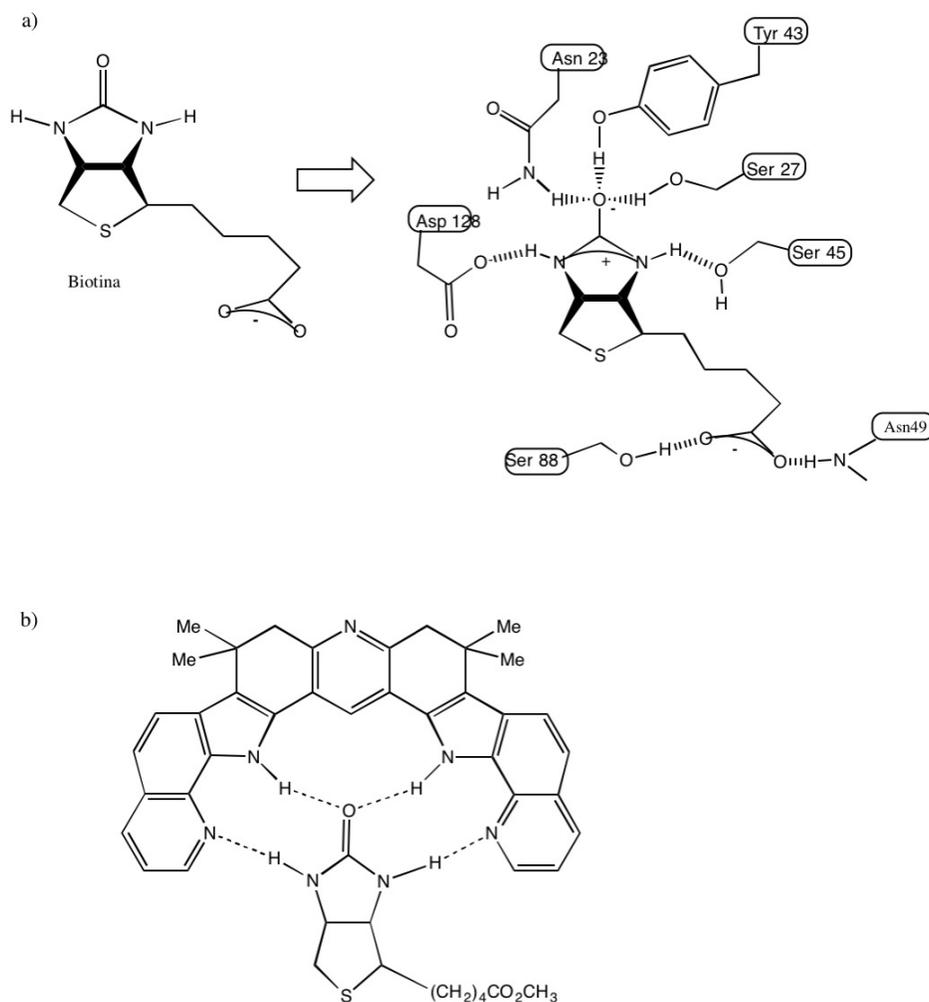


Figura 5. a) Esquema ilustrativo de la unión de biotina a estreptavidina. b) Biotina unida a un receptor artificial. Fuente: Schneider, H., & Yatsimirsky, A. K. (2000).

Es un hecho que los complejos de ligantes macrocíclicos están involucrados en un gran número de funciones dentro de la naturaleza. Factores de gran importancia, como por ejemplo el mecanismo de la fotosíntesis o el transporte de oxígeno en mamíferos y otros sistemas respiratorios, han motivado a los investigadores a estudiar la posibilidad de utilizar macrociclos sintéticos como modelos para los sistemas biológicos (Lindoy, 1990).

No es una coincidencia que la naturaleza eligiera derivados macrocíclicos para los complejos involucrados en las funciones ya mencionadas, donde una mayor estabilidad cinética y termodinámica que le son otorgadas al complejo por parte del ligante macrocíclico mientras que el ion metálico se mantiene firmemente unido en la cavidad del macrociclo de forma que la función biológica no se vea intervenida, por ejemplo, por reacciones de desmetalación competitiva (Lindoy, 1990).

Los ligantes macrocíclicos producen complejos más estables que sus análogos de cadena abierta, debido a que presentan una estructura preorganizada de alta rigidez con una geometría complementaria bien definida y por lo tanto no requieren un cambio conformacional para unirse a un ion metálico de la forma más estable. El hecho anterior se conoce convencionalmente como "efecto macrociclo", concepto que se explicara más adelante (Steed y col., 2007).

Como se puede apreciar, el diseño de receptores artificiales que imiten el comportamiento de enzimas no es fácil. La necesidad de varios sitios de unión es muy evidente: las interacciones no covalentes son en general débiles y la interacción entre muchos sitios de unión es la única manera de adquirir una complejación fuerte y específica. El principio de una complejación a través de varios sitios de unión es muy general en sistemas biológicos, donde asegura la replicación eficiente de interacciones del tipo enzima-substrato y antígeno-anticuerpo. Por otra parte, si generalizamos, se puede visualizar la complejación a través de varios sitios de unión como un efecto quelato, el cual es bien conocido para los compuestos de coordinación (Schneider y Yatsimirsky, 2000).

Ciclofanos

Los ciclofanos abarcan la serie completa de macrociclos conformados por enlaces con grupos aromáticos, por lo tanto, la definición incluye a los calixarenos, ciclootrimeratrileno y otros sistemas relacionados. El ciclofano original reportado en 1899 el cual fue sintetizado por Pellegrin, consiste de dos anillos bencénicos unidos a través de las posiciones 1,3 por puentes etílicos y más tarde Cram y Steiberg obtuvieron el isómero del ciclofano obtenido por Pellegrin. En la figura 6 se muestran los primeros ciclofanos sintetizados (Cragg, 2005).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se le designa ciclofano a los compuestos que tienen anillos-mancude o ensamblados de sistemas de anillo-mancude, y átomos y/o de cadenas saturadas o insaturadas como componentes alternos de un gran anillo (macrocíclico) (IUPAC y col, 1997). Los anillos aromáticos de los ligantes macrocíclicos de tipo ciclofano son multifuncionales ya que su rigidez resulta de gran importancia para lograr una preorganización del sitio de unión además de que la estabilidad del complejo se favorece con las interacciones específicas que se dan entre los anillos aromáticos altamente polarizables del ciclofano y el huésped (Diederich, 1991).

Por otro lado, los anillos aromáticos otorgan sitios idóneos para la introducción de grupos funcionales en sistemas catalíticamente activos. Generalmente los grupos aromáticos son parte estructural de unidades espaciadoras las cuales definen la anchura del sitio de unión. La cavidad es generada por medio de puentes de cadena alifática de longitud elegida a medida del tamaño específico de los huéspedes. La solubilidad en agua de los ligantes es inducida generalmente añadiendo un número adecuado de centros de carga a la molécula, por ejemplo, residuos de carboxilato o centros de amonio (Diederich, 1991).

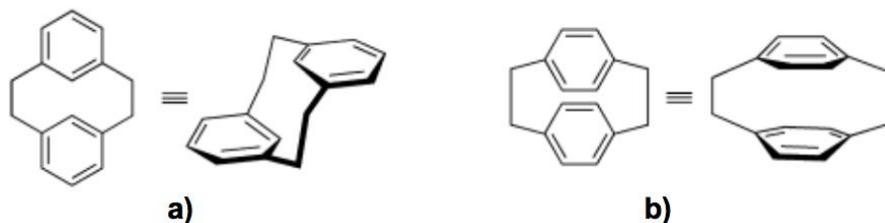


Figura 6. Estructuras químicas de los primeros ciclofanos reportados a) [2.2]metaciclofano b) [2.2]paraciclofano. Fuente: Gispert (2000)

Una serie de estudios han usado ciclofanos funcionalizados para desarrollar catálisis supramolecular y modelos enzimáticos (Tabushi, I., & Yamamura, K., 1983, Franke, J., & Vögtle, F., 1986, Davis, A. P, 1993, Diederich, F. 1988). Su comportamiento catalítico se basa en la implementación de características electroestáticas, hidrofóbicas y la coordinación con metales para efectuar varias reacciones en medio acuoso. Los ciclofanos que presentan una cavidad hidrofóbica y que contienen cadenas hidrocarbonadas presentan actividad parecida a la vitamina B₁₂ y/o B₆ (Murakami, 1983,1991,1992.) y también existen estudios sobre ciclofanos solubles en agua que muestran actividad transaminasa (Breslow y col, 1986), acetil transferasa (Whitlock y Whitlock Jr, 1988), piruvato oxidasa (Jiménez y Diederich, 1989) o de sustitución nucleofílica (Stauffer y col, 1990).

Los ciclofanos presentan propiedades físicas y químicas muy interesantes y estas pueden cambiar si se le agrega brazos colgantes a la molécula por lo que el hecho de que pueden ser funcionalizados es una ventaja, ya que se les puede conferir capacidad de complejar cationes, aniones y especies neutras tales como metales, aminoácidos, bases nitrogenadas y carbohidratos (Fuhrhop, 1980, Rebek, 1990, Steed et al., 2007). La presencia de anillos aromáticos le confiere a la molécula una estructura definida, con profundidad suficiente y la rigidez determinante para la organización de los sitios de enlace por lo que pueden presentar propiedades tipo enzimática. Tal es el caso de los complejos macrocíclico Fe₂PO y Fe₂PC (figura 7) los cuales mostraron actividad biomimética hacia las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasas (POx) reportados por Salazar y colaboradores_(Salazar-Medina, y otros, 2013).

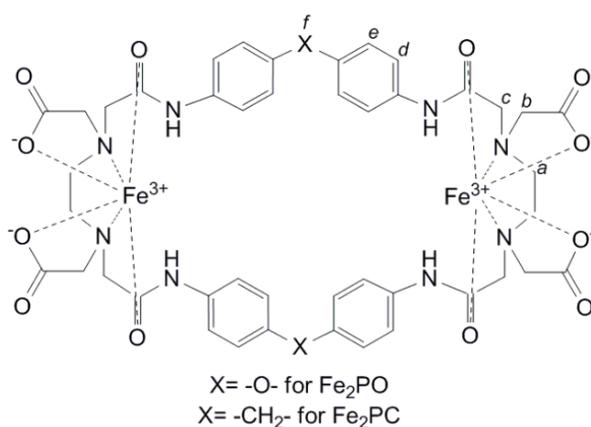


Figura 7. Estructuras moleculares propuestas para los complejos tipo ciclofano de hierro (III) Fe₂PO y Fe₂PC. Fuente: Salazar-Medina y col, 2013.

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) se han trabajado una serie de ciclofanos derivados de EDTA y sus complejos con diferentes metales. En particular los complejos binucleares Cu_2PO y Fe_2PO fueron estudiados en aceite de pescado de arenque americano en donde se evaluó su efecto antioxidante resultando efectivo en retrasar la oxidación del aceite de pescado (López, 2016; Torres, 2011). Estos resultados sugieren que los complejos con ligantes tipo ciclofano pueden ser utilizados en alimentos como agentes antioxidantes. Sin embargo, se podrían llevar a cabo más, estudios como la caracterización termodinámica para entender cómo se están llevando a cabo las interacciones en el complejo.

Antioxidantes en la Industria Alimentaria

El uso de antioxidantes en la industria alimentaria es sumamente importante pues después de la degradación del alimento por microorganismos, la oxidación es una de las principales causas de deterioro. El deterioro lipídico por oxidación es uno de los problemas que mayor impacto causan dentro de la industria alimentaria, debido a la disminución drástica en la vida de anaquel de muchos de los alimentos que son microbiológicamente estables, donde existe una modificación de las propiedades organolépticas del alimento generando olores y sabores desagradables, conocidos comúnmente como “rancio” y limitando la aceptación por parte del consumidor (Fennema, 2000). Además, muchos de los productos de oxidación no solo disminuyen la vida de anaquel, sino que algunos de ellos constituyen un riesgo para la salud de los consumidores. La generación de productos tóxicos y la destrucción de vitaminas esenciales durante la oxidación tienen un impacto negativo en la seguridad y salubridad de los alimentos (Johnson y Decker, 2015)

Los agentes quelantes han adquirido una gran importancia en el procesamiento de alimentos. La habilidad que tienen de complejar iones metálicos ha contribuido significativamente a la estabilidad del color, aroma y textura en los alimentos. Algunos de los constituyentes de los alimentos pueden actuar como agentes quelantes por ejemplo ácidos carboxílicos (oxálico, succínico), ácidos hidroxílicos (láctico, málico, tartárico y cítrico), ácidos polifosfóricos (ATP, pirofosfatos), aminoácidos, péptidos, proteínas y porfirinas. Trazas de iones de metales pesados pueden actuar como catalizadores de oxidación en grasas o aceites. La complejación por agentes quelantes incrementa la eficiencia antioxidante e inhibe la oxidación del ácido ascórbico y de las vitaminas

liposolubles. La estabilidad del aroma y el color de vegetales enlatados mejora substancialmente. (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009)

En virtud de que el único compuesto supramolecular examinado y aprobado por la FDA hasta el momento, son las ciclodextrinas, el uso de compuestos de coordinación en la industria alimentaria aun es escaso por lo que es un campo de estudio prometedor.

Efecto Macrocíclico

La mayoría de los complejos supramoleculares del tipo receptor-huésped son mucho más estables que los que se esperaría para el efecto quelato por sí solo. La mayoría de estos receptores son generalmente moléculas macrocíclicas, las cuales quelan a su huésped mediante un número de sitios de unión. La estabilidad de tales complejos es aumentada por el término conocido como el efecto macrocíclico. Este efecto no solamente relaciona los varios de sitios de unión del receptor sino también la organización de los sitios de unión en el espacio antes de que el huésped se una, tal energía de unión no es gastada en huésped para tratar de “rodear” (Steed y Atwood, 2009).

La primera teoría sobre la estabilidad adicional que presentan los ligantes macrocíclicos sobre sus análogos de cadena abierta se basó en la idea del ajuste entre la cavidad del macrociclo y el tamaño del catión central. La teoría actual sobre el origen del efecto macrocíclico se basa en los siguientes factores (Gispert, 2000):

- a) Preorganización del ligante, con número determinado de conformómeros, algunos de los cuales tienen la conformación requerida para la complejación del ión metálico.
- b) Efecto de la basicidad inductiva, la mayor alquilación es la causa de la mayor estabilidad de los ligantes macrocíclicos respecto a los ligantes análogos de cadena abierta.
- c) La repulsión entre los pares de electrones de los átomos dadores de la cavidad queda disminuida al formarse el complejo.

El efecto macrocíclico convierte a los receptores cíclicos como los corandos (un ejemplo son los éteres de corona) hasta un factor de 10^4 más estables que los podandos (acíclicos)

con los mismos sitios de unión. Tal efecto fue primeramente elucidado por Cabiness y Mangerum en 1969, quienes estudiaron los complejos de Cu(II) de **1.15** y **1.16** (figura 8). En el ejemplo ambos iones, Cu y Zn, se benefician de la estabilidad asociados a cuatro átomos donores. Sin embargo, el complejo macrocíclico **1.15** es aproximadamente 10^4 veces más estable que su análogo de cadena abierta **1.16** como consecuencia de la preorganización adicional del macrocíclico (Cragg, 2010).

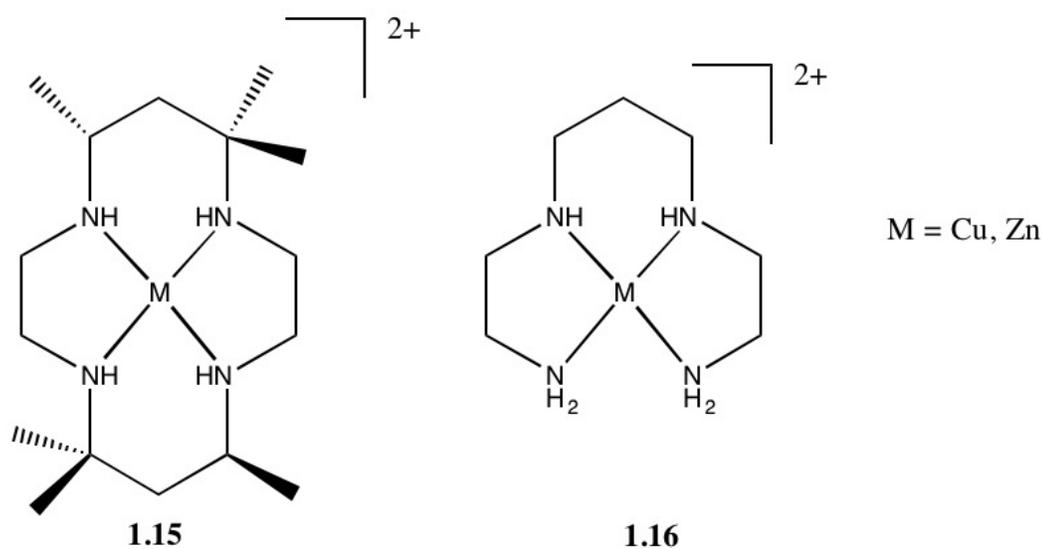


Figura 8. Complejo con un ligante macrocíclico (1.15) y uno de cadena abierta (1.16). Fuente: Steed y Atwood (2009).

Las mediciones termodinámicas de los análogos (no metiladas) de los complejos de Zn^{2+} revelan que la estabilización por la preorganización del macrocíclico contribuye de manera entálpica como entrópica (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros termodinámicos para los complejos de Zn^{2+} de 1.15 y 1.16 (298K)
Fuente: Cragg, 2010

	1.15	1.16
Log K	15.34	11.25
ΔH° (kJ mol⁻¹)	-61.9	-44.4
$-T\Delta S^\circ$ (kcal⁻¹mol⁻¹)	-25.6	-19.8

Preorganización

El término preorganización fue ideado por Cram en 1985 para indicar que cuanto mejor colocados espacialmente están los ligantes para coordinar al ion central, más preorganizados están. Los ligantes quelatos, por ejemplo, están mucho más preorganizados que los monodentados. La preorganización del ligante puede ser importante en la estabilidad de un complejo. El principio de la preorganización establece que entre más organizados se encuentren el receptor y el huésped y baja solvatación haya antes de la complejación, los complejos serán más estables (Schneider y Yatsimirsky, 2000).

Si se comparan los aniones tetranegativos del EDTA (etilendiaminatetracetato) y trans-ciclohexanodiaminatetracetato (CDTA) se puede observar en el ligante EDTA los grupos carboxilatos se alejan lo más posible uno del otro, mientras que en CDTA los dos nitrógenos están más cerca, lo que fuerza a los carboxilatos a estar más próximos. Por lo tanto, los carboxilatos del CDTA se adecuan más a la coordinación con un catión que los del EDTA (figura 9). Como resultado de esta preorganización las constantes de estabilidad para complejos con CDTA suelen ser 10^2 - 10^3 veces mayor que los complejos con EDTA (Gispert, 2000).

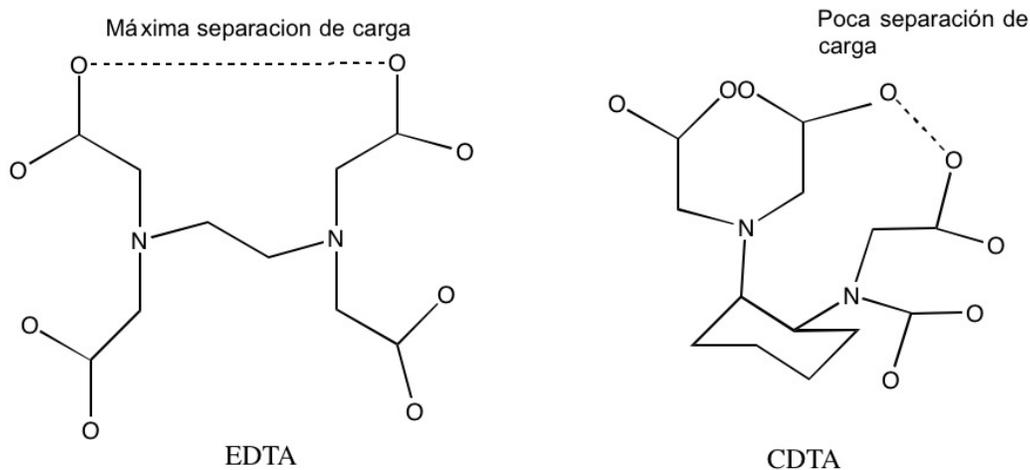


Figura 9. Estructuras de EDTA y CDTA y su respectiva separación de carga. Fuente: Gispert, 2000

Aunque el concepto de preorganización en teoría parece sencillo de entender no es fácil materializarlo para cada caso en particular por lo que aún existen un número limitado de receptores con una preorganización altamente eficiente. Una estrategia que se utiliza

para diseñar receptores preorganizados es la rigidez, la cual tiene como propósito una única conformación óptima para la complejación (Schneider y Yatsimirsky, 2000; Sugich, 2001).

El diseño de ligantes rígidos es una opción de obligar a la molécula de estudio de “entrar” al sitio de unión siguiendo la teoría de Fischer del reconocimiento del tipo llave-cerradura, sin embargo, a través de estudios como el mencionado anteriormente de estreptavidina y biotina se encuentra que el reconocimiento se puede llevar a cabo por la teoría del ajuste inducido, la cual propone que una serie de cambios conformacionales y varias fuerzas de enlaces son necesarias para llevar a cabo el reconocimiento molecular por lo que los ligantes deben presentar cierta flexibilidad como lo podrían ser los podandos o algún ligante acíclico. Por lo previamente mencionado, aún existe la difícil tarea de diseñar receptores artificiales que puedan mimetizar con eficiencia las actividades biológicas de las enzimas.

Ligantes de cadena abierta

A través de los años, la química supramolecular se ha enfocado en receptores cíclicos por las grandes ventajas que poseen para mimetizar las actividades intrínsecas de las enzimas, además que la preorganización de éste permite un ahorro en energía. Sin embargo, el origen de la química supramolecular se encuentra ligado a los trabajos realizados por Pederson con éteres de corona. El descubrimiento accidental del dibenzo-18-corona-6 en 1967 ocurrió cuando intentaba sintetizar un poliéter flexible con fenoles terminales. El objetivo principal de Pederson consistía la creación de poliéteres acíclicos con capacidad de coordinar metales. Los inicios de muchas investigaciones fueron realizados gracias a los polietilenglicoles que se encontraban ampliamente disponibles los cuales se podían modificar fácilmente.

Se pueden definir a los ligantes abiertos lo que se ramifican a partir de un átomo central (o grupo de átomos) los cuales se les denomina polipodales y estos a su vez se pueden dividir según su carácter dentado. Dentro del grupo de los hexadentados hay que destacar el ligante etilendiaminatetracetato (EDTA), de gran versatilidad, que puede unirse a un único ión metálico a través de los dos nitrógenos y cuatro de los oxígenos de los carboxilatos por lo que tienden a formar complejos mononucleares (Gispert, 2000). Generalmente los ligantes polidentados (figura 10) abiertos son aquellos en donde los grupos dadores están todos unidos a un átomo central (que puede ser dador como N o no dador como C), el número de brazos que cuelgan del átomo central es tres, pero puede ser

mayor y se caracterizan por su tendencia a dar coordinación semicerrada dejando abierta una única posición (Gispert, 2000).

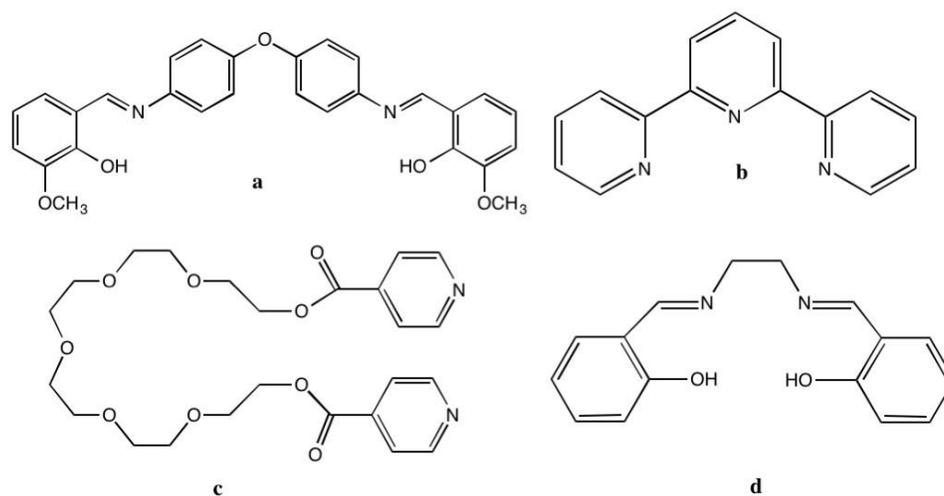


Figura 10. Ejemplos de ligantes de cadena abierta (a) ligante con base de Schiff (b) terpidina (c) ligante tipo podando (d) salicilideniminato

Entre la gama de diferentes poliéteres funcionalizados que fueron sintetizados, fueron Vogtle y Weber quienes le adjudicaron el termino podando a sus ligantes (Cragg, 2005). Se encontró que los grupos hidroxilo terminales permitían la introducción de grupos tosilo y con reacciones consiguientes con nucleófilos se podrían introducir una serie de grupos de ligantes donadores. Vogtle y colaboradores, sobre todo Weber usaron esta ruta para incorporar grupos de ácidos benzoicos y quinolinas. Los nuevos derivados poliéteres fueron clasificados como podandos en reconocimiento a sus dos “pies” ligantes. Una serie de variaciones, como se ilustra en la figura 11, han sido preparados con el objetivo de ampliar el rango de metales que se puedan unir. El ligante de cadena abierta edtaBZ utilizado en este trabajo, entra dentro de esta denominación debido a que en su estructura cuenta con una molécula de EDTA, por lo que se espera que tenga un potencial de coordinación alto y gran versatilidad.

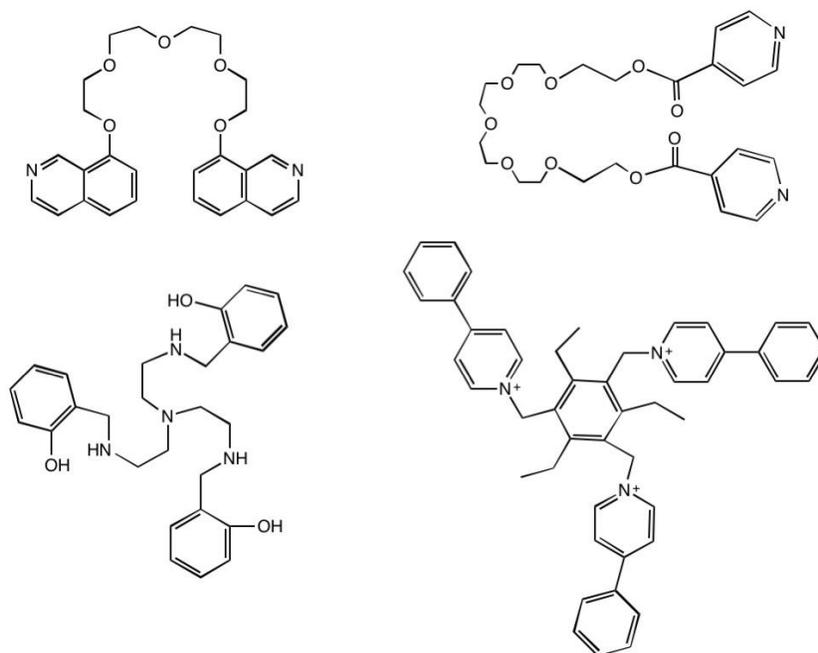


Figura 11. Ejemplos de ligantes tipo podando

Aun y cuando la bibliografía reporta que los ligantes macrocíclicos son termodinámicamente más estables que los ligantes acíclicos (Gispert, 2000; Schneider y Yatsimirsky, 2000; Lehn, 1995; Steed y Atwood, 2009), éstos últimos presentan ventajas y propiedades que pueden ser útiles. Los receptores acíclicos sintéticos pueden ser más versátiles que los cíclicos en estudios de reconocimiento de biomoléculas complejas, principalmente debido a su fácil accesibilidad y funcionalidad con múltiples motivos (estructura secundaria superior) de unión. La dilución, pseudo-dilución o reacciones de larga duración no son necesarias y su alta libertad conformacional permite mayores ajustes inducidos (Rivera y col., 2013).

A diferencia de los ligantes macrocíclicos, la síntesis de ligantes acíclicos es relativamente más fácil de llevar a cabo. Un ejemplo son los ligantes tipo bases de Schiff los cuales se preparan mediante condensación al hacer reaccionar aminas y aldehídos. Se consideran una de las reacciones más simples y viejas de la química orgánica. Debido a la síntesis sencilla, buena estabilidad y a la alta química de coordinación que poseen los ligantes con bases de Schiff, la síntesis con metales de transición con estos ligantes ha sido explorada profundamente (Yao y col, 2016).

Además otras investigaciones han utilizado polímeros para preparar sistemas de coordinación a través de la incorporación de metales de transición. La inherente flexibilidad

de los enlaces éter se acopla a la geometría de preferencia de ciertos metales, lo que abre la investigación de complejos a nanoescala muy interesante, de los cuales muchos contienen motivos helicoidales (Amaya y Rebek, 2004).

Compuestos de coordinación

Los compuestos de coordinación han sido utilizados a través de la historia para un sinnúmero de aplicaciones tanto como para el bienestar humano como en la industria. Gracias al conocimiento que se tiene de los compuestos de coordinación, la terapia de quelación ha sido posible. Esta rama de la medicina existe para corregir los desequilibrios en los niveles homeostáticos de metales esenciales (Cragg, 2010). Por otra parte, un ejemplo importante de un complejo metálico es la clorofila (figura 13). Las clorofilas se encuentran en todas las plantas que realizan la fotosíntesis. Desde el punto de vista de la tecnología de alimentos, el interés por las clorofilas se centra en las reacciones poscosecha que degradan a estos pigmentos, incluso los que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento. Paralelamente, se conoce que la clorofila tiene efectos sobre la salud, tales como la reducción de algún tipo de tumores en animales de laboratorio (Badui, 2006).

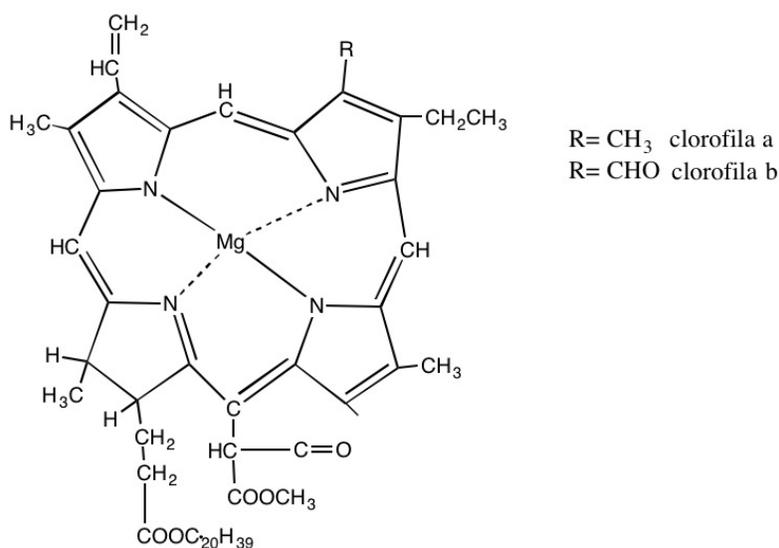


Figura 12. Estructura de las clorofilas a y b. Fuente: Badui, 2006

En 1893, Werner propuso la teoría de coordinación, en la que postuló que la mayoría de los elementos presentan dos tipos de valencia: una primaria y una secundaria que representan al número de oxidación (valencia primaria), que corresponde al número de

electrones que un átomo pone en juego cuando forma un compuesto determinado, y el número de coordinación (valencia secundaria) que corresponde al número de ligantes unidos al ion metálico central (Chang, 2010).

Un complejo de coordinación se forma por interacción de un ligante con un catión, particularmente, un metal de transición. Los ligantes son moléculas o iones que rodean al metal formando un compuesto de coordinación, las interacciones que existen entre el metal y el ligante se pueden ver como reacciones ácido-base de Lewis; la base de Lewis es una sustancia capaz de donar uno o más pares de electrones, y el ion metálico actúa como ácido de Lewis. De esta manera, los enlaces metal-ligante casi siempre son enlaces covalentes coordinados (Chang, 2010).

La estabilidad de un complejo del tipo metal-ligante depende de varios factores como el tipo de ligante y el metal de transición que está en juego. Para entender la formación y la estabilidad de estos compuestos varias teorías han surgido. Debido que no es el objetivo principal de este trabajo adentrarse sobre las teorías de estabilidad de los complejos la explicación será breve, sin embargo, se sugiere al lector a consultar la bibliografía para un mejor entendimiento.

Teoría de ácidos y bases duros y blandos de Pearson. En 1963 Pearson sugirió una denominación para identificar cuales sustancias forman los complejos más estables y las dividió en dos grupos, en duros y blandos. Las especies duras (ácidos o bases) tienden a ser pequeñas, poco polarizables, mientras que las especies blandas tienden a ser grandes y polarizables. Los cationes duros son "similares" al protón: relativamente pequeños, carga alta y con pocos electrones de valencia que pueden ser polarizados. Los metales blandos son grandes, poca carga y con electrones de valencia que pueden ser polarizados. Pearson sugirió la siguiente regla; ácidos duros tienden a combinarse con bases duras y ácidos blandos tienden a combinarse con bases blandas (Gispert, 2000).

Teoría del campo cristalino (TCC). La TCC considera a un complejo como una identidad formada por un catión central rodeado de ligantes aniónicos polares que están electrostáticamente atraídos por el catión. La idea esencial del modelo aplicado a los complejos es suponer que la esfera de coordinación de los aniones o ligantes alrededor de un ion metálico se comporta como un conjunto de cargas negativas puntuales que interaccionan repulsivamente con los electrones del catión metálico central (Gispert 2000, Chang, 2010).

Teoría del campo de los ligantes (TCL). Esta teoría representa una aplicación de la teoría de los orbitales moleculares (TOM). La TCL describe el enlace en los complejos en términos de orbitales moleculares constituidos por los orbitales d del átomo metálico y por los orbitales de los ligantes. En contraposición de la TCC, que asume un enlace iónico, la TCL considera que los ligantes se encuentran unidos al átomo o ion central mediante un enlace covalente (Steed y col, 2007)

Al estudiar la geometría de los compuestos de coordinación, a menudo se encuentra que existen varias maneras de acomodar los ligantes alrededor del átomo central. Cada una de las estructuras tiene distintas propiedades químicas y físicas. En la figura 13 se muestran cuatro formas geométricas diferentes para los átomos metálicos con ligantes monodentados. En estos diagramas se aprecia que la estructura y el número de coordinación se relacionan entre sí. Para un número de coordinación (n.c) 2 la estructura suele ser lineal, para un n.c 4 la estructura de complejo suele ser tetraédrica o plana cuadrada y cuando el n.c es 6 la estructura suele ser octaédrica (Chang, 2010).

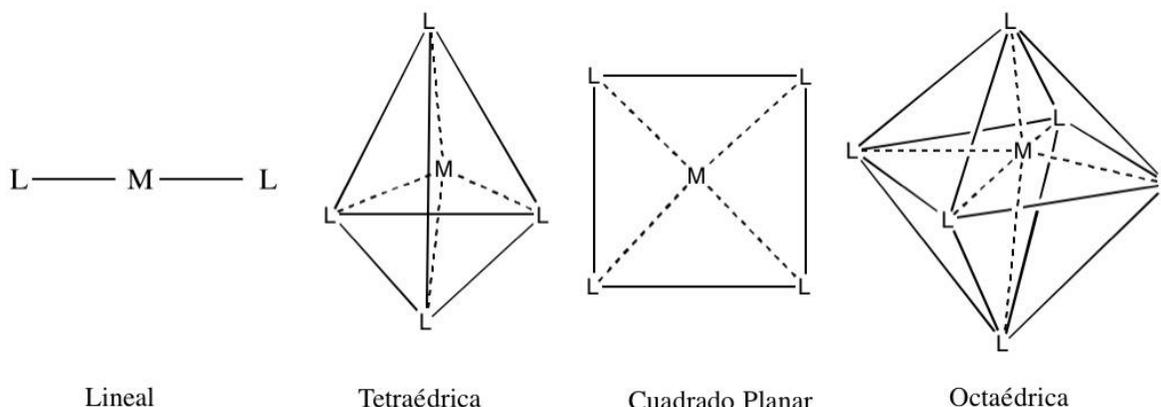


Figura 13. Geometrías comunes de iones complejos. En cada caso, M es un metal y L representa el ligante monodentado.

Complejos de cobre

En la naturaleza existen una gran variedad de metales con los que se puede trabajar, sin embargo, en el presente trabajo se decide estudiar la formación de complejos con cobre, específicamente aquel con un estado de oxidación de 2+, esto radica en la alta estabilidad

que presentan la mayoría de sus complejos. La tendencia de estabilidades para iones metálicos divalentes del primer período, observada en la serie de Irving-Williams:

$Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$ (Haas y Franz, 2009) describe que, en general, la estabilidad del complejo aumenta a medida que el radio iónico disminuye en toda la serie, pero Cu^{2+} muestra un agudo aumento en la estabilidad, que se puede atribuir a la Energía de Estabilización de Campo del Ligante (EECL) obtenida a través de la distorsión de Jahn-Teller² que puede presentar debido a su llenado d^9 .

Factores que afectan la estabilidad de los complejos

Dada las relaciones termodinámicas entre K , ΔG , ΔH y ΔS , los factores que influyen en la estabilidad de un complejo en solución implican efectos entálpicos y entrópicos. El principal efecto entálpico es la energía de la formación del enlace coordinado entre el ión metálico y el ligante. También es importante la energía de “neutralización de la carga”, especialmente para las combinaciones de iones positivos y ligantes negativos. También se debe considerar que hay un efecto entálpico de sentido contrario, como es la entalpía de desolvatación del ion metálico y del ligante al formarse el complejo, ya que la formación del mismo supone desplazamiento de moléculas del disolvente. Las repulsiones mutuas de los ligantes en solución se debilitan al coordinarse con el ion central, por lo que el calor de formación es favorable. (Gispert, 2000)

Los efectos entrópicos son debidos a la combinación de especies aisladas (metal y ligantes) que implican cambios en el movimiento y libertad de las especies en solución. La libertad de movimiento del ion metálico es esencialmente libertad de traslación que puede cambiar al formarse el complejo. El disolvente está “unido” al metal lo que hace que su entropía total sea baja. Los ligantes tienen considerable libertad de movimientos [esto dependerá de la naturaleza de la molécula], que disminuye al coordinarse al ion metálico. Generalmente el ligante tiene mucho menos libertad cuando está coordinado que cuando está libre: la entropía disminuye al perder libertad (Gispert, 2000). En la Tabla 1 se presentan los factores que influyen en la estabilidad de un complejo de acuerdo a lo reportado en 1978, por R.T. Meyers.

² El teorema de Jahn-Teller predice que el sistema experimentará una distorsión, de forma que algunos de los niveles de energía se estabilizarán y otros se desestabilizarán. Al no estar todos los niveles igualmente ocupados, los desestabilizados serán los más vacíos, y el sistema tendrá una ganancia neta de energía.

Tabla 2. Factores que influyen en la estabilidad de los complejos en solución. Fuente: Gispert, 2000

<i>Efectos debido a la entalpía</i>	<i>Efectos debido a la entropía</i>
Variación de la fuerza de enlace con el carácter duro-blando de los iones metálicos y los átomos dadores del ligante	Número y tamaño de los anillos quelatos
Efecto del campo ligante	Entropía de solución de los iones metálicos y de los ligantes
Repulsión estérica y electrostática entre los ligantes en el complejo.	Cambios de solvatación en la formación del complejo
Entalpía de solución de los ligantes	Variación en la entropía de los ligantes no coordinados
Efectos de la entalpía relacionados con la conformación del ligante no coordinado y coordinado	Efectos que resultan de las diferencias en las entropías de configuración del ligante en el complejo

Otro factor a tomar en cuenta es el pH. En algunos casos este puede tener un efecto en la formación del complejo, debido a que a diferentes valores de pH se tendrán diferentes especies químicas del ligante, protonada y/o desprotonada y en algunos casos se tendrá una mezcla de ambas, afectando con esto el modo de coordinación del metal.

En el presente estudio se utilizó cobre(II), el cual, en trabajos previos reportados por el grupo de trabajo de Inoue M. (Inoue y col, 2001; Navarro y col, 2007; Sugich 2001) mostró la particularidad de presentar una geometría octaédrica en medio ácido y una geometría cuadrado planar en medio básico para el ligante edtaOD. Como se mencionó anteriormente, la especie química que se encuentre presente al momento de llevar a cabo la complejación tendrá un efecto en la formación del complejo, es por este motivo que es importante conocer que al momento de realizar el experimento sola una especie química este presente y no una mezcla. En las figuras 15 y 16 se presentan las distribuciones de especies de los ligantes edtaOD y edtaBZ, misma que fue tomada en cuenta al momento de elegir los valores de pH de estudio.

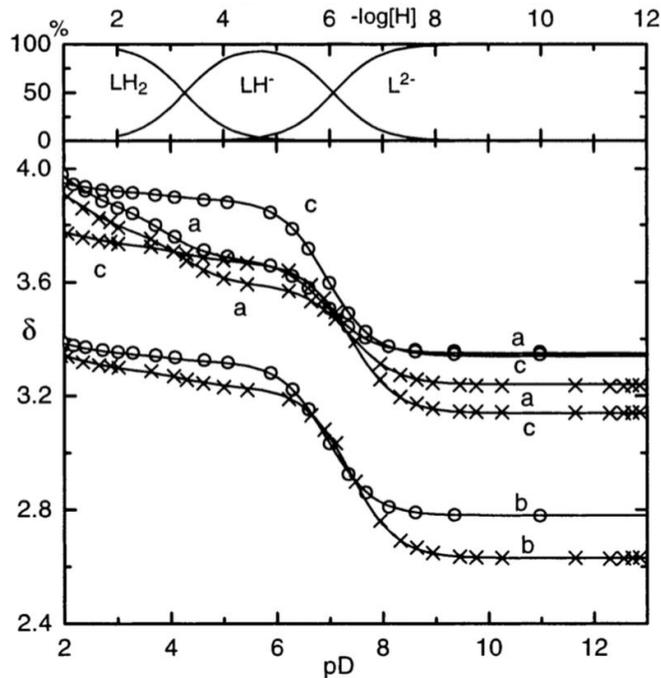


Figura 14. Distribución de especies de edtaOD y desplazamiento químico 1H NMR observado para $(edtaod)H_2$ (representado en círculo) a diferentes valores de pD. Los ejes de los valores de pD se encuentran desplazados una unidad para ayudar a la comparación de los datos de NMR y potenciométricos. Fuente: Inoue y col, 2001.

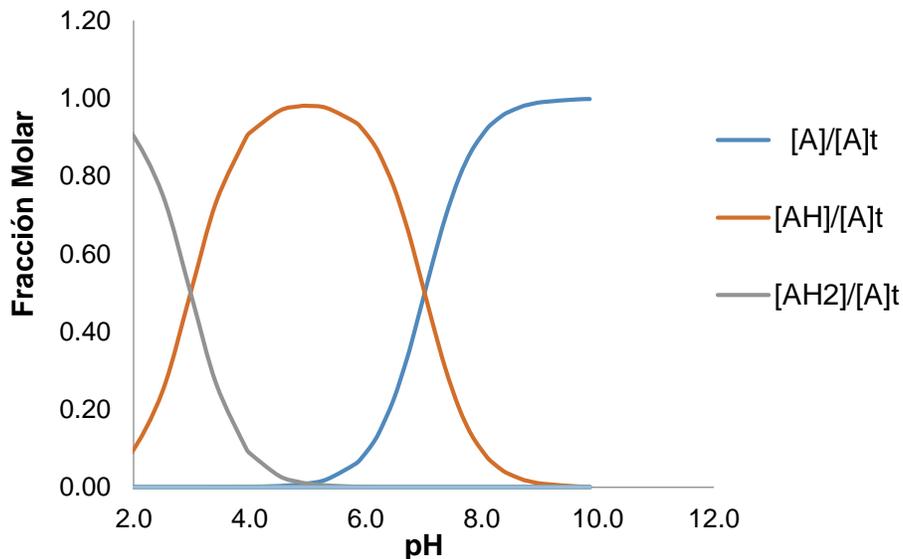


Figura 15. Distribución de especies de edtaBZ a través de potencimetría. Fuente: Santacruz y Machi (trabajo no publicado).

Parámetros Termodinámicos

Para entender las energías implicadas en la formación de un complejo metal-ligante es importante comprender los fundamentos de la termodinámica. Estos fundamentos están plasmados en tres leyes, que se les conoce como "Leyes de la termodinámica" las cuales tratan de generalizar las energías involucradas al momento de llevarse a cabo una reacción y toma en cuenta factores como la presión, la temperatura y el volumen al igual que la naturaleza de las sustancias.

Casi todas las reacciones químicas absorben o liberan energía, por lo general en forma de calor. Un proceso exotérmico es cualquier proceso que cede calor, es decir, que transfiere energía térmica hacia a los alrededores, y cuando los alrededores suministran calor al sistema se le denomina como un proceso endotérmico.

En una típica interacción de unión entre un ligante y una molécula receptora se muestra a continuación (figura 16).

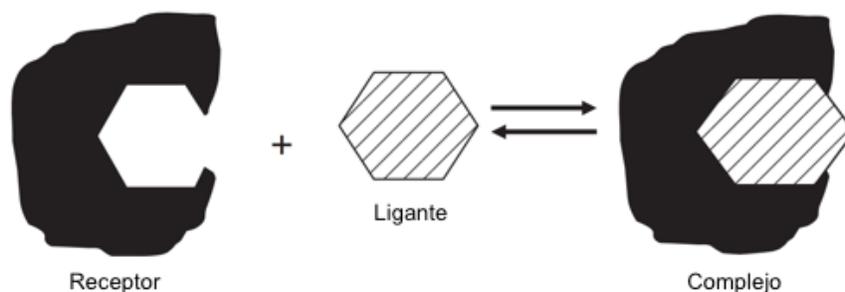


Figura 16. Modelo simplificado de una interacción receptor-ligante. Fuente Freyer y Lewis, 2008.

En el caso del presente trabajo, el receptor es el ligante y el sustrato es el cobre para dar lugar al complejo Cu-OD y/o Cu-BZ. Para entender el sistema y las interacciones intramoleculares que se están llevando a cabo es necesario tener conocimiento sobre conceptos fundamentales sobre entalpía, entropía, energía libre de Gibbs, equilibrio y como es que se relacionan o se aplican a un sistema. A continuación, se dará una explicación sobre las ecuaciones utilizadas en fisicoquímica.

Los cambios térmicos a presión constante se expresan mediante la entalpía (H) o contenido calorífico de un sistema. Esta función se define por la relación:

$$H = E + PV \quad (1)$$

donde P y V son la presión y el volumen del sistema. Como E y PV se encuentran totalmente caracterizadas por el estado del sistema, H es también una función de estado. Por lo tanto, el cambio de entalpía, ΔH , puede escribirse así:

$$\Delta H = H_2 - H_1 \quad (2)$$

Para determinar directamente la variación de calor comprendida en una reacción, se usa el calorímetro, que en un aspecto general consiste en un recipiente aislado de agua en la cual se sumerge la cámara de reacción. Cuando ocurre una reacción exotérmica, el calor generado se transfiere al agua, lo cual provoca un ascenso en temperatura que se lee con un termómetro, pero si la reacción es endotérmica ocurrirá lo contrario en vez de un aumento en la temperatura del agua habrá un descenso de esta.

Al llevar a cabo mediciones termoquímicas hay dos condiciones generales bajo las cuales se efectúan, una es a volumen constante y la otra a presión constante. Dependiendo bajo que parámetro se efectuaran las mediciones las magnitudes de los cambios térmicos obtenidos difieren en general. A volumen constante cualquier cambio térmico que tiene lugar se debe únicamente a la diferencia entre la suma de las energías de los productos y los reactivos. Por otra parte, a presión constante no sólo hay variación de energía interna, sino además de un trabajo que modifica la proporción de calor observada en el calorímetro a volumen constante (Maron y Prutton, 2011).

De acuerdo a la primera ley de la termodinámica, cualquier calor (q) agregado al sistema incrementará la energía interna de éste, y al realizar un trabajo externo (w),

$$q = \Delta E + w = \Delta E + \int_{V_1}^{V_2} p dV \quad (3)$$

A volumen constante $dV = 0$, no se realiza trabajo, entonces,

$$(q)_V = \Delta E \quad (4)$$

Por otra parte, cuando la presión se mantiene constante, y es la misma fuera y dentro del sistema, $p = P$ y

$$w = \int_{V_1}^{V_2} P dV = P(V_2 - V_1) = P\Delta V \quad (5)$$

Por lo tanto, tendremos que

$$(q)_p = \Delta E + P\Delta V \quad (6)$$

De acuerdo a la ecuación anterior, el cambio térmico observado en el calorímetro comprende la variación de energía interna y el trabajo de cualquier expansión o contracción del sistema, por lo que la ecuación puede escribirse de nuevo de esta forma:

$$\begin{aligned} (q)_p &= (E_p - E_r) + P(V_p - V_r) \\ &= (E_p - PV_p) - (E_r + PV_r) \end{aligned} \quad (7)$$

donde los subíndices p y r hacen referencia a los productos y reactivos respectivamente. Pero si recordamos H , que está definida por $H = E + PV$, $H_p = E_p + PV_p$, $H_r = E_r + PV_r$, y la ecuación se transforma en

$$(q)_p = H_p - H_r = \Delta H \quad (8)$$

Las ecuaciones anteriores definen que bajo condiciones de volumen constante el calor de la reacción es igual a la cantidad termodinámica ΔE y cuando es bajo condiciones de presión constante el calor de la reacción es igual a ΔH . La relación entre ambas se puede expresar como

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V \quad (9)$$

Un valor positivo de ΔH o ΔE muestra que el calor es absorbido durante el proceso, mientras que uno negativo significa que se cede calor.

Otro término importante de entender es el de entropía (S). J.W. Gibbs se refiere a la entropía como una medida de “desorden” de un sistema. La energía en forma útil, la eléctrica, mecánica o química está organizada y dirigida, y puede utilizarse para realizar un trabajo. Por otro lado, el calor es aquella forma de energía debido al libre movimiento de los átomos o moléculas en un cuerpo y es de carácter caótico. Entonces, cuando se utiliza energía organizada para realizar un trabajo se convierte en calor, incrementará el caos o el desorden del sistema, y por lo tanto la entropía debe aumentar (Maron y Prutton, 2011).

La entropía de un sistema depende sólo de sus estados inicial y final, el cambio entrópico se escribe

$$\Delta S = S_2 - S_1 \quad (10)$$

Si especificamos que el cambio de S, dS , está dado por

$$dS = \frac{dq_r}{T} \quad (11)$$

donde dq_r es una cantidad infinitesimal del calor absorbido en un proceso reversible a una temperatura T . En un cambio finito reversible $T = \text{constante}$, dS se hace igual a ΔS , dq_r es entonces q_r ,

$$\Delta S = \frac{q_r}{T} \quad (12)$$

El cambio entrópico en un sistema aislado a una temperatura constante donde se realiza una expansión isotérmica y reversible desde el V_1 al V_2 . Durante este proceso la

sustancia absorberá cierta cantidad de calor q_r , de manera que el cambio entrópico de la sustancia ΔS_s se expresa de la siguiente manera

$$\Delta S_s = \frac{q_r}{T} \quad (13)$$

Al mismo tiempo el recipiente pierde una cantidad de calor, y de aquí que el cambio de entropía del recipiente es

$$\Delta S_r = \frac{\overline{q_r}}{T} \quad (14)$$

donde la barra arriba de q_r , indica una pérdida de calor. Por lo que el cambio total entrópico de la sustancia y el recipiente es

$$\Delta S_1 = \Delta S_s + \Delta S_r = \frac{q_r}{T} + \frac{\overline{q_r}}{T} = 0 \quad (15)$$

Si se comprime del V_2 a V_1 de manera isotérmica y reversible, el calor desprendido por la sustancia será q_r y también será el calor ganado por el recipiente

$$\Delta S'_s = \frac{\overline{q_r}}{T} \quad (16)$$

$$\Delta S'_r = \frac{q_r}{T}$$

Entonces el cambio total de entropía para la sustancia y el recipiente, ΔS_2 ,

$$\Delta S_2 = \Delta S'_s + \Delta S'_r = \frac{\overline{q_r}}{T} + \frac{q_r}{T} = 0 \quad (17)$$

y el cambio total de entropía para el ciclo completo es la suma de ΔS_1 y ΔS_2

$$\Delta S = \Delta S_1 + \Delta S_2 = 0 \quad (18)$$

Las ecuaciones anteriores se explicaron para un proceso reversible, pero si ahora el cambio es irreversible. Como la expansión es irreversible, el calor absorbido por la sustancia será q , donde $q < q_r$. El valor actual de q en un proceso irreversible depende de la manera de llevar a cabo dicho proceso y puede variar desde $q = 0$ a $q = q_r$ cuando se obtiene la reversibilidad completa. Es por eso que para un proceso irreversible ΔS no puede ser igual a q/T , porque si ΔS fuese igual a dicho valor se obtendría una serie de diferentes valores de ΔS en dos estados dados y esto es imposible para una propiedad de función de estado, donde solamente importa el estado inicial y final. Se llega a la conclusión que ΔS debe estar dado por q_r/T . Sin embargo, la pérdida de calor por el recipiente puede considerarse que tiene lugar reversiblemente y también el cambio de entropía del recipiente es $\Delta S_r = \bar{q}/T$. El cambio total de entropía del sistema aislado es

$$\Delta S_1 = \frac{q_r}{T} + \frac{\bar{q}}{T} \quad (19)$$

Pero, $q_r > \bar{q}$ y $q_r/T > \bar{q}/T$, se obtiene lo siguiente

$$\Delta S_1 = \frac{q_r}{T} + \frac{\bar{q}}{T} > 0 \quad (20)$$

Para un proceso irreversible que tiene lugar isotérmicamente en un sistema aislado conduce a un incremento de la entropía total del sistema. Si se recomprime la sustancia desde su estado original y reversiblemente a una temperatura T , el cambio entrópico es $\Delta S_2 = 0$. De esta manera, el cambio total de entropía para un ciclo irreversible será la suma de $\Delta S_2 = 0$ y ΔS_1 ,

$$\Delta S = \frac{q_r}{T} + \frac{\bar{q}}{T} > 0 \quad (21)$$

Para llevar a cabo cualquier cambio de forma totalmente reversible exige un tiempo infinito y por tanto aquel que se realiza en un finito será irreversible e irá acompañado de un aumento de entropía total de los cuerpos comprendidos. Todo proceso natural se verifica con un incremento entrópico y la dirección del cambio es aquella que conduce a tal aumento es el concepto general de la segunda ley de la termodinámica. Se concluye que en un sistema aislado y en condiciones no isotérmicas $\Delta S = 0$ en cualquier proceso o ciclo reversible y $\Delta S > 0$ en cualquier proceso irreversible. Estas conclusiones son idénticas a las obtenidas para un proceso isotérmico (Maron y Prutton, 2011).

El concepto de entropía puede ser difícil de comprender. La entropía se puede describir como una medida de desorden en el sistema como también la energía de estado del sistema. Para interpretación en sistemas acuosos, como en el que se presenta en este trabajo, el concepto de energía viene siendo el movimiento de un estado ordenado a uno desordenado (y viceversa), sin embargo, la idea de un estado de alta energía que cambia a un estado de baja energía es probablemente más adecuado (Falconer, 2016).

El trabajo máximo que un proceso puede proporcionar, no es necesariamente igual a la cantidad de energía disponible para realizar un trabajo útil, aunque el proceso se efectúe reversiblemente. De la cantidad total de trabajo, una parte se emplea en realizar uno de presión-volumen, ya sea debido a una expansión o contracción del sistema durante el proceso. Para obtener con mayor precisión el máximo de energía disponible en un proceso, se define otra función de estado G , denominada energía libre de Gibbs, mediante la ecuación

$$\Delta G = H - TS \quad (22)$$

En una reacción cualquiera $\Delta G = G_p - G_r$ que a una temperatura cualquiera T

$$\begin{aligned} \Delta G &= (H_p - TS_p) - (H_r - TS_r) \\ &= (H_p - H_r) - T(S_p - S_r) \\ &= \Delta H - T\Delta S \end{aligned} \quad (23)$$

donde ΔH y ΔS son respectivamente la variación de la entalpia y entropía de la reacción. La energía libre de Gibbs nos proporciona información sobre si la reacción se da de manera espontánea. Cuando la tendencia impulsora de una reacción va de izquierda a derecha se

emite energía en la reacción y el signo de ΔG es negativo. Esto significa que la reacción procede espontáneamente. Cuando la tendencia es de derecha a izquierda, un trabajo equivalente a ΔG tiene que ser absorbido a fin de que la reacción ocurra en la dirección indicada y entonces ΔG es positivo lo cual significa que la reacción en la dirección dada no es espontánea. Y, por último, cuando el sistema se encuentra en equilibrio no hay ninguna tendencia en cualquiera de las direcciones por lo que ΔG es igual a cero.



Pocas reacciones químicas se dan en una sola dirección. La mayoría son reversibles, al menos en cierto grado. Al inicio de un proceso reversible, la reacción lleva a la formación de productos. Tan pronto se forman algunas moléculas de producto, comienza el proceso inverso: estas moléculas reaccionan y forman moléculas de reactivo. Se alcanza lo que se conoce como equilibrio químico donde las rapidezces de las reacciones en un sentido y en otro se igualan, y las concentraciones de los reactivos y productos permanece constante (Chang, 2010).

En una reacción, tal como la que se presenta a continuación



el cambio de energía libre, ΔG , a cualquier temperatura, está dada por la isoterma de reacción

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{a_C^c a_D^d \dots}{a_A^a a_B^b \dots} \right) \quad (28)$$

Las actividades señaladas son las de los productos al final de la reacción y de los reactivos al comienzo de la misma. Sin embargo, como se mencionó anteriormente el criterio de

equilibrio químico es el de $\Delta G = 0$ a presión y temperatura constante por lo que la ecuación se transforma en

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{a_C^c a_D^d \dots}{a_A^a a_B^b \dots} \right) \quad (29)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \left(\frac{a_C^c a_D^d \dots}{a_A^a a_B^b \dots} \right)$$

Los reactivos y productos se encuentran en equilibrio. A cierta temperatura ΔG° , el cambio de energía en el estado tipo es una constante para una reacción dada, se sigue que la relación de actividades de la ecuación anterior debe ser también constante,

$$K_a = \frac{a_C^c a_D^d \dots}{a_A^a a_B^b \dots} \quad (30)$$

Por lo que el cambio de energía libre puede escribirse así,

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (31)$$

La ecuación define a K_a , la constante de equilibrio termodinámico de la reacción. Esta ecuación simplifica el cálculo de la variación de energía libre, y permite la predicción de conducta de las reacciones químicas bajo diferentes condiciones sin tener que recurrir a la experimentación (Maron y Prutton, 2011).

Las relaciones de energía y el estado de cualquier sistema durante un proceso dependen no solamente de la manera en que el trabajo se ha efectuado, sino también de ciertas condiciones experimentales impuestas sobre el sistema como un todo. Dos restricciones tales, de importancia especial involucran procesos efectuados bajo (a) condiciones isotérmicas (b) adiabáticas. Un proceso isotérmico es cualquiera realizado de manera que la temperatura permanece constante durante toda la operación. A su vez, un proceso adiabático es aquél en que no hay absorción ni desprendimiento de calor por parte del sistema. En el caso del presente trabajo, el proceso de la formación del complejo es isotérmico, debido a que se lleva a cabo a una temperatura constante de 25°C que lo lleva a cabo el calorímetro de titulación isotérmica (ITC), el cual se hablará a continuación.

Calorimetría de titulación Isotérmica (ITC)

En 1780, Lavoiser diseñó un calorímetro de hielo y lo utilizó para medir el calor metabólico de un cuyo el cuál se encontraba confinado dentro de una cámara de medición (Freyer y Lewis, 2008). Desde 1780 hasta la fecha, el avance de la calorimetría es tal que ahora somos capaces de medir cantidades de calor sumamente pequeñas.

La calorimetría de titulación isotérmica se puede considerar como un detector universal. Casi cualquier reacción química o cambio físico es acompañado por un cambio en calor o entalpía. La cantidad de calor tomada por los alrededores (para un proceso endotérmico) o la cantidad de calor liberada hacia los alrededores (para un proceso exotérmico) es simplemente igual a la cantidad de la reacción que ha tomado lugar y el cambio de entalpía para la reacción, ΔH . Por lo tanto, un calorímetro es un instrumento ideal para medir que tanto de la reacción ha tomado lugar o la velocidad en que la reacción ocurre. En contraste a los métodos ópticos, las mediciones calorimétricas se pueden llevar a cabo con reactivos que son espectroscópicamente silenciosos (un cromóforo o fluoróforo no es requerido), el experimento se puede realizar en soluciones opacas, turbias o heterogéneas, por ejemplo, en suspensiones celulares y se pueden llevar a cabo bajo una serie de condiciones biológicamente relevantes como temperatura, salinidad, pH, etc (Freyer y Lewis, 2008).

La calorimetría de titulación fue por vez primera descrita como un método para la determinación simultánea de K_{eq} y ΔH aproximadamente hace más de 40 años por Christensen e Izatt (Christensen y col, 1966; Hansen y col, 1965). El método original fue aplicado a una variedad de reacciones de equilibrio de ácidos y bases débiles y complejación a iones metálicos (Christensen y col, 1965; Eatough, 1970). No fue hasta 1989 que el primer calorímetro de titulación fuera disponible comercialmente a través de MicroCal, diseñado específicamente para el estudio de sistemas biológicos con el slogan de "Determinación de K en minutos" (Wiseman y col, 1989).

Hoy en día, la ITC es rutinariamente usado para la caracterización termodinámica directa de las interacciones de unión de biopolímeros (Freire y col, 1990). Gracias al mejoramiento en la instrumentación de los equipos de ITC y en el desarrollo de mejores programas de análisis de datos, los equipos de ITC modernos hacen posible la medición de calores tan pequeños como $0.1 \mu\text{cal}$ ($0.4 \mu\text{J}$) lo que permite la determinación de constantes de asociación en magnitudes grandes como 10^8 - 10^9 M^{-1} (Freyer y Lewis, 2008).

La ITC puede ser aplicada a una amplia variedad de interacciones intermoleculares: desde interacciones con baja afinidad características de interacciones transitorias asociadas con mecanismos fisiológicas a interacciones con alta afinidad características asociadas a la regulación funcional de proteínas o de ensamblado molecular, o interacciones con muy alta afinidad frecuentemente enfrentadas en el descubrimiento y desarrollo de drogas (Freyer y Lewis, 2008). Además, no solamente los parámetros termodinámicos se pueden determinar sino también los cinéticos (Bianconi, 2007; Burnouf y col, 2012; Meulen y Butcher, 2011; Todd y Gomez, 2001)

Alrededor de 600 a 700 artículos científicos donde hacen uso de la ITC son publicados anualmente. El campo de estudio de proteínas es el que más se ha beneficiado de esta herramienta sin embargo los químicos que se basan en el estudio de moléculas sintéticas han hallado a la ITC una herramienta valiosa (Falconer, 2016), tal como se muestra en el presente trabajo, pues obtener tres parámetros termodinámicos (n , K_a y ΔH) en un solo experimento es la ventaja de esta técnica.

Un experimento convencional de ITC consiste en colocar un determinado volumen de solución de receptor en la celda de reacción y agregar una serie de inyecciones de solución de sustrato, separada cada una por un intervalo de tiempo suficiente para llegar al equilibrio y asegurar que se ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido. La solución del receptor se agita permanentemente a velocidad constante girando la jeringa cuya punta posee una paleta especial que permite la mezcla de soluciones. Al acercarse a la saturación, la señal del calor disminuye hasta que solo se observa el fondo del calor de dilución.

Equipo y Software

El calorímetro modelo VP-ITC fabricado por Microcal, Inc, el que se utilizó en esta investigación, es fácil de usar, compacto y controlado por computadora (figura 18). El calorímetro consiste de dos celdas, la de referencia y la de reacción embebidas en una cámara adiabática (figura 18). El sistema mantiene la celda de referencia a una temperatura constante. Un potencial constante es aplicado a la celda de reacción para activar una respuesta al mecanismo de control el cual tiene el propósito de mantener la diferencia de temperatura entre las dos celdas lo más cerca posible a cero.



Figura 17. Calorímetro de Titulación Isotérmica VP-ITC, Microcal, Inc.

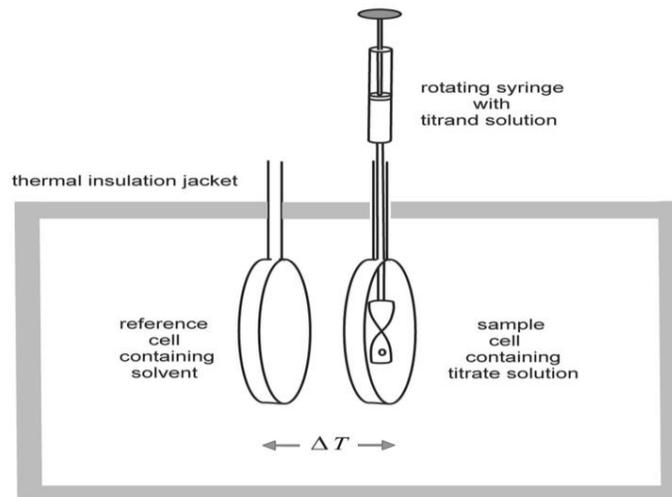


Figura 18. Imagen ilustrativa dentro de un calorímetro de titulación isotérmica. La celda de referencia se muestra a la izquierda y la celda de reacción a la derecha. El rectángulo en gris representa la "chaqueta" de aislamiento. Fuente: Schmidtchen, 2007.

En la figura 19 se puede apreciar la logística de un experimento en ITC. En el inciso A se muestra una ilustración de la celda de reacción la cual contiene un volumen de 1.4mL que inicialmente se llenó con la solución receptora (dependiendo del experimento a realizar, la solución que va en la celda y en la jeringa se pueden invertir). Una vez llenada la celda de reacción, se procede a llenar la jeringa con la solución huésped. A un tiempo específico de intervalo, el volumen del titulante es inyectado a la celda lo que desencadena la reacción y produce una secuencia de picos característicos que es registrado por el equipo como en el inciso B.

Cuando el sistema llega a la saturación, esto quiere que decir que ya no hay más moléculas de ligante disponible para reaccionar, el calor residual, los llamados picos de dilución, si es que hay, se deben a fenómenos mecánicos y de dilución. Después, se lleva a cabo la integración del área debajo de cada pico y el calor individual se grafica contra la relación molar como se muestra en el inciso C. A partir de esta grafica se pueden estimar los parámetros termodinámicos n , K_a y ΔH son posibles de estimar.

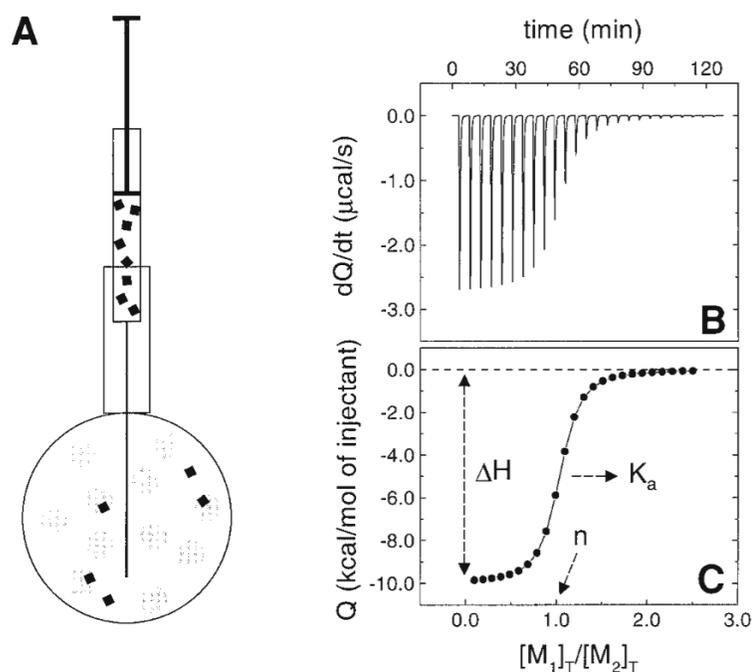


Figura 19. Esquema ilustrativo de un experimento en ITC. Fuente: Velázquez y col, 2015.

El software que viene acompañado del equipo permite la modificación de varios parámetros como el número de inyecciones, el tiempo entre inyecciones, el volumen del titulante, la duración de la inyección, las revoluciones con la que se agitará la solución y la temperatura los cuales se programan desde el inicio.

Al momento de realizar un experimento en ITC, un parámetro importante en tomar en cuenta es el valor de c . El valor de c se puede expresar a través de la siguiente ecuación:

$$c = n \times [A] \times K_a$$

Donde n , es el factor estequiométrico, $[A]$ es la concentración del compuesto en la celda $[M]$ y K_a es la constante de asociación $[M^{-1}]$. En general el valor de c debe ubicarse

en el rango de 10-500, con lo cual se logra obtener una curva de titulación claramente sigmoïdal (Figura 20), que es lo más recomendable para el cálculo de ΔH , K_a y n .

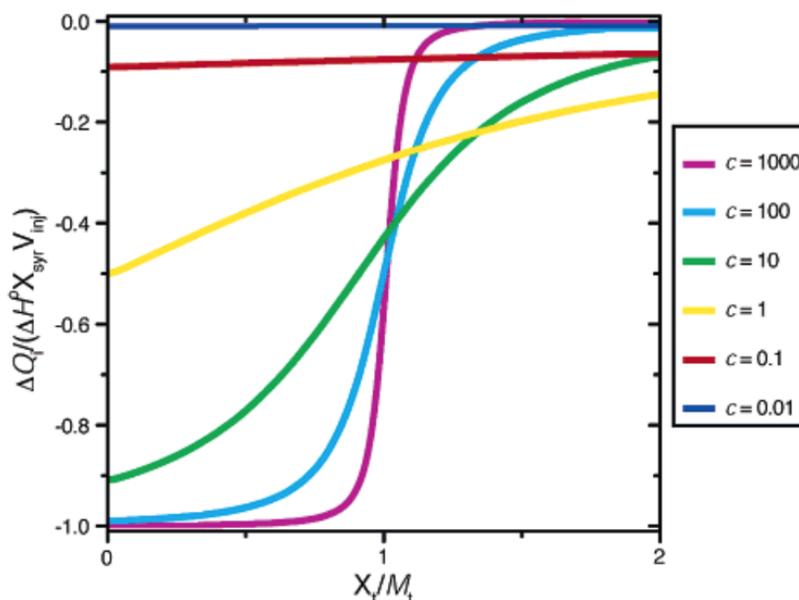


Figura 20. Variación de la curva a medida que cambia el valor de c . Fuente: Turnbull y Daranas, 2000

Las mediciones calorimétricas se pueden llevar a cabo de tres diferentes maneras en instrumentos comerciales que se encuentran disponibles y que emplean las tres técnicas. Los tres métodos de medición son (i) cambio de temperatura, ya sea adiabático u isoperibólico, (ii) compensación de potencia, comúnmente llamado isotérmica, y (iii) conducción de calor (Hansen et al., 1985). En el caso particular de este trabajo, el calorímetro de titulación isotérmica utiliza el método de compensación de potencia que se explicara a continuación.

En un instrumento de compensación de potencia, la celda de medición calorimétrica es controlada a una temperatura constante. Esto es realizado mediante el enfriamiento constante aplicado a la celda y luego usando un controlador de temperatura y de calor para mantener la celda a una temperatura constante. Mientras la reacción química se lleva a cabo, cualquier calor generado por la reacción química es detectado y la potencia aplicada al calentador se reduce para que otra vez la temperatura permanezca constante.

La potencia calorífica de las dos fuentes, de la reacción y del calentador controlado, son mantenidos a un nivel constante para que el calor generado por la reacción sea compensado por la caída del calor proporcionado por el calentador controlado. La señal no

procesada en el calorímetro de compensación de potencia es la energía (mcal/seg o mJ/seg) aplicado al calentador controlado que se requiere para mantener la celda calorimétrica de cambiar de temperatura como una función del tiempo. El cambio de calor es luego simplemente calculado integrando la energía del calentador sobre el tiempo (seg) de la medición (Freyer y Lewis, 2008).

En este modo de operación, el flujo de calor o potencia térmica $P = dQ/dt$ es medida una vez que los reactantes hayan sido mezclados y el calor Q producido o consumido durante la reacción es calculado mediante el uso del respectivo parámetro de calibración. Bajo condiciones del estado estacionario, P es directamente proporcional al potencial del detector de la termopila U : $P = \varepsilon_c U$ donde ε_c es la constante de calibración, y el calor producido durante un intervalo de tiempo es igual a $Q = \varepsilon_c U \Delta t$ (Schneider y Yatsimirsky, 2000).

El calor se libera o absorbe como resultado de la redistribución y formación de enlaces no covalentes cuando las moléculas que interactúan pasan de estado libre a enlazadas. El ITC supervisa estos cambios de calor mediante la medición del diferencial de potencia que se aplica a los calentadores de celdas, necesarios para mantener en cero la diferencia de temperatura entre la celda de referencia y la celda de muestra cuando se mezclan los componentes de enlace. Es por éste motivo, que a través de ITC se puede llevar acabo la caracterización termodinámica de los sistemas anfitrión-huésped y de esta manera obtener los parámetros termodinámicos que rigen a este tipo de reacción.

Las investigaciones científicas han aprovechado esta herramienta para todo tipo de estudios, pero la mayor cantidad se enfocan en interacciones proteína-proteína o proteína-metal (Falconer, 2016). El estudio de compuestos sintéticos a través de ITC es relativamente escaso a comparación de los estudios realizados con proteínas. Los compuestos de coordinación pueden ser estudiados a través de esta técnica con resultados importantes para entender las interacciones intermoleculares de la formación de complejo.

El uso de la ITC en estudios relacionados con alimentos es un área aún nueva por explorar, sin embargo, existen algunos trabajos donde utilizan esta herramienta. Un ejemplo es el estudio realizado por Arroyo y McClements (2015) en el cual presentan un resumen de aplicaciones de la ITC en alimentos con enfoque de entender el destino de los lípidos dentro del tracto gastrointestinal humano. La ITC se puede utilizar para estudiar la micelación de las sales biliares, inclusión, formación de complejo, las interacciones de las moléculas activas en la superficie con proteínas, carbohidratos y lípidos y las interacciones con gotas de lípidos. Otro estudio por Canabady y col (2009) donde llevaron a cabo la

caracterización termodinámica de la interacción de calcio con proteína de la leche y compararon sus resultados con otras técnicas. El futuro de complejos de coordinación en alimentos estudiados a través de ITC es un área prometedora para entender sistemas tan complejos.

METODOLOGÍA

Materiales

Los reactivos para la síntesis y las mediciones analíticas, se utilizaron tal y como fueron adquiridas de fábrica.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) marca Sigma-Aldrich
- Anilina marca Sigma-Aldrich
- N,N-dimetilformamida (DMF) marca Fisher Scientific
- Buffer MES marca Sigma-Aldrich
- Buffer CAPSO marca Sigma-Aldrich
- Cloruro de cobre, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ marca Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sodio, lentejas, 98% NaOH
- Ácido clorhídrico marca Sigma-Aldrich
- Filtros para jeringas Acrodisc®, diámetro de 25mm y porosidad $0.45\mu\text{m}$ marca Sgima-Aldrich

Equipo

- Microcalorímetro MicroCal VP-ITC
- Balanza analítica, Explorer OHAUS
- Potenciómetro, THERMO SCIENTIFIC. Orion Dual STar pH/ISE

Métodos

El ligante edtaOD se obtuvo de acuerdo al método de alta dilución reportado por Inoue y colaboradores (2001). El ligante edtaBZ se obtuvo mediante la condensación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con anilina en solvente N,N-dimetilformamida (DMF) (Santacruz, 2007).

Preparación de soluciones de buffers

Se llevaron a cabo soluciones de los buffers MES y CAPSO a una concentración de 0.1M. Se ajustó el pH con NaOH 0.5M y HCl 0.5M. Una vez ajustado el pH de cada buffer, éstas

se filtraron con la ayuda de filtros. La selección de los buffers se basó en el estudio realizado por (Ferreira y col, 2015).

Preparación de soluciones de cobre

Es importante tener en cuenta que la solución de cloruro de cobre tiene que ser valorada para conocer la concentración real. Para llevar a cabo la valoración de cobre se utilizó EDTA disódico como titulante y negro de ericromo T como indicador. Se preparó una solución stock, la cual se valoró con el método anteriormente explicado y a partir de ésta se tomaron alícuotas para preparar soluciones de cobre de 0.6mM. Éstas fueron aforadas con los buffers previamente mencionados.

Preparación de soluciones de ligantes

Se prepararon soluciones stock de los ligantes edtaOD y edtaBZ. Una vez realizada las soluciones stock, se tomaron alícuotas y se aforaron con los buffers con una concentración de 0.1mM, las cuales se filtraron para eliminar fibras o cualquier residuo sólido.

Experimento ITC

La elección de las concentraciones de las soluciones de cobre y de ligante se basaron en reportes experimentales realizados anteriormente en el DIPM y utilizando la ecuación del valor de c , la cual se abordó en la parte de antecedentes. Las soluciones se desgasificaron por aproximadamente 20 minutos a 20°C, con la ayuda de una bomba de vacío para remover el oxígeno presente o burbujas de aire. Después, se llenó la celda de referencia con buffer (MES o CAPSO). La celda de reacción se llenó con la solución de ligante (1.45 mL de edtaOD o edtaBZ), mientras que la jeringa se cargó con la solución de cobre (250 μ L). En la figura 21 se resumen los pasos seguidos durante el experimento.

Las mediciones se llevaron a cabo en un microcalorímetro MicroCal VP-ITC a 25°C con soluciones de ligante 0.1mM y de CuCl₂ 0.6mM a valores de pH= 5.0, y 10.0. Se inyectaron 25 alícuotas de solución de cobre de 10 μ L con un tiempo de inyección de 20 s cada 120 s con una agitación de 307 rpm. Las variables dependientes del instrumento: temperatura, número de inyecciones, volumen por inyección, velocidad de rotación del agitador, tiempo entre inyecciones, entre otros, se programaron desde el programa VP Viewer 2000 que incluye el equipo.

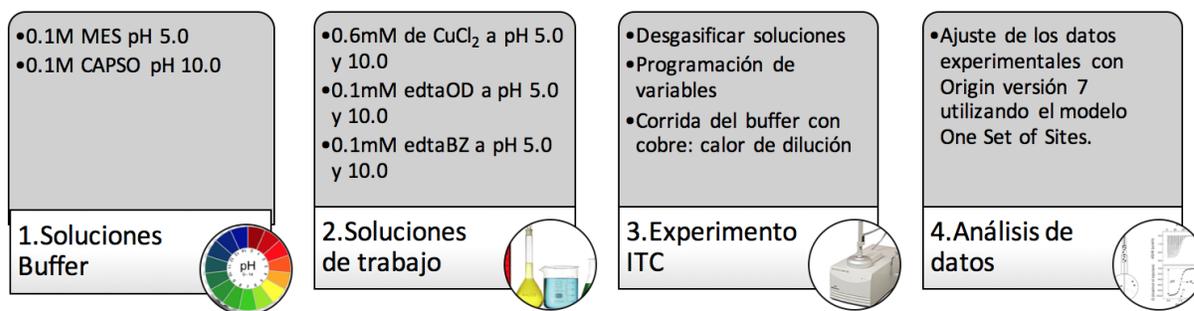


Figura 21. Diagrama de flujo donde se resume los pasos seguidos durante el experimento

Debido a que el equipo solo mide el calor liberado o absorbido durante el proceso, debe tomarse en cuenta que no es capaz de distinguir entre el calor de asociación y calor de dilución que se genera en cada inyección, por lo que se realizó una corrida en donde se inyectó la misma cantidad y tamaño de alícuota de cobre a cada buffer. Los datos obtenidos se restaron de los datos experimentales y cada titulación se realizó por triplicado.

La obtención de los parámetros termodinámicos se obtuvo a partir del ajuste de la curva resultante de cada termograma, con ayuda del programa Origin Versión 7 diseñado para MicroCal, utilizando el modelo de ajuste One Set of Sites.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Termogramas de Cu-OD

Los termogramas obtenidos de la formación de complejos Cu-OD (figura 22 y 23), resultaron en constantes de asociación (K_a) del orden de 10^7 M^{-1} a pH 10.0, y de 10^8 M^{-1} a pH 5.0. A pH 5.0 el sistema es guiado entálpicamente, mientras que a pH 10.0 la reacción es guiada por el factor entrópico. La estequiometría, (n), fue de ~ 0.5 lo que sugiere que por cada dos ligantes se encuentra coordinado un catión cobre. En la tabla 3 se presentan los parámetros termodinámicos de la formación del complejo del ligante OD con cobre (Cu-OD).

Tabla 3. Parámetros termodinámicos de la complejación de edtaOD con cobre (Cu-OD) a 25°C

	pH	
	5.0	10.0
n	0.54 ± 0.05	0.56 ± 0.02
$K_a(\text{M}^{-1})$	$1.24(\pm 0.20) \times 10^8$	$2.67(\pm 0.19) \times 10^7$
$\Delta H^\circ (\text{kcal mol}^{-1})$	$-9,330 \pm 168$	$7,350 \pm 781$
$T\Delta S^\circ (\text{kcal}^{-1}\text{mol}^{-1})$	$1,700 \pm 237$	$17,400 \pm 316$
$\Delta G^\circ (\text{kcal mol}^{-1})$	$-11,000 \pm 93$	$-10,000 \pm 465$

Valores promedio basados en una $c=50$. Los errores de las desviaciones estándares fueron calculadas a partir de tres réplicas por cada titulación.

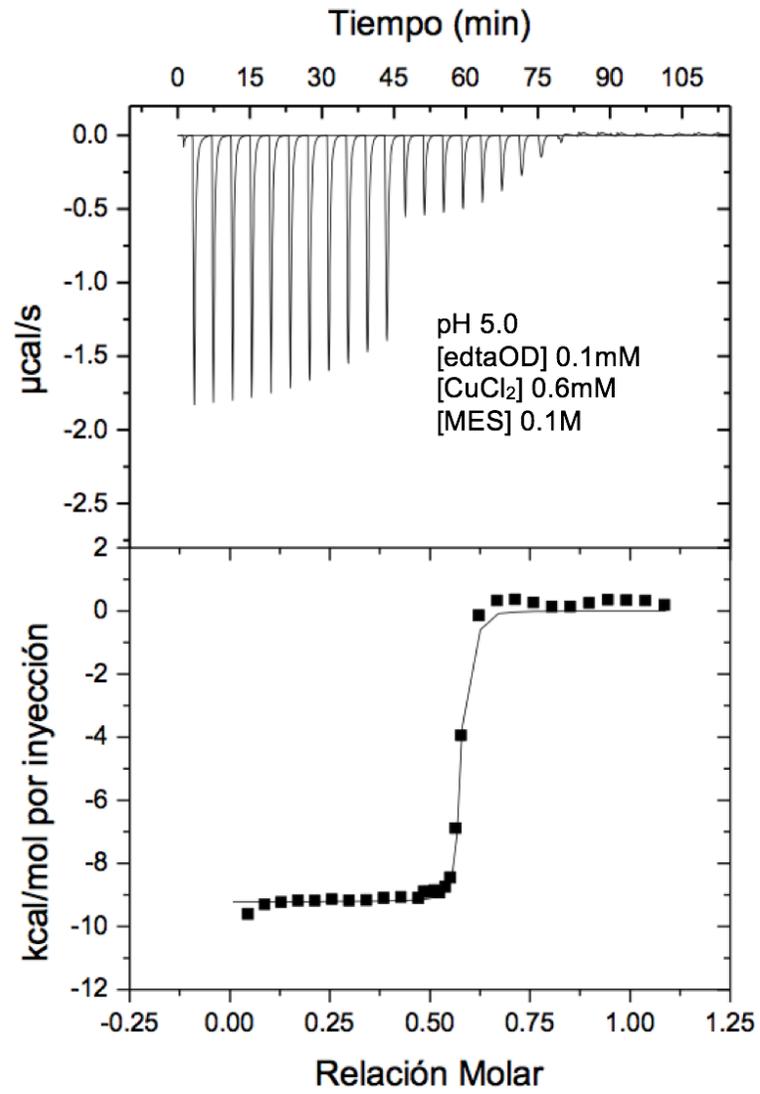


Figura 22. Termograma de la formación de complejo de Cu-OD a pH 5.0

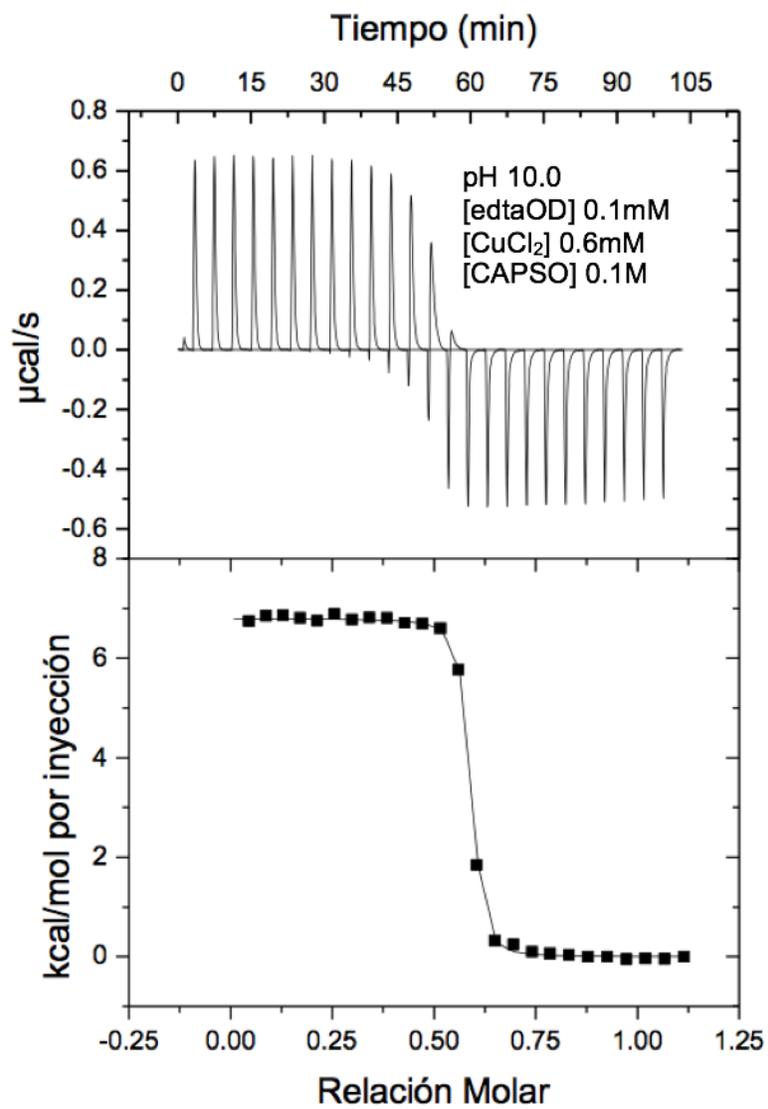


Figura 23. Termograma de la formación de complejo de Cu-OD a pH 10.0

Termogramas de Cu-BZ

Los termogramas obtenidos de la formación de complejos Cu-BZ (figura 24 y 25), resultaron en constantes de asociación (K_a) del orden de 10^8 M^{-1} independientemente del tipo de geometría de coordinación. En medio ácido (5.0) el sistema es guiado entálpicamente, mientras que en medio básico (10.0) la reacción es guiada por el factor entrópico al igual que el caso del ligante OD. Ambas reacciones presentan un ΔG° negativo, lo que significa que la formación del complejo se da espontáneamente. La estequiometría(n), fue de aproximadamente 0.5 lo que de nueva cuenta sugiere que por cada dos ligantes se encuentra coordinado un catión cobre. En la Tabla 4 se presentan los parámetros termodinámicos de la formación del complejo de edtaBZ con cobre.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos de la complejación de edtaBZ con cobre (Cu-BZ) a 25°C

	pH	
	5.0	10.0
n	0.56 ± 0.03	0.46 ± 0.01
$K_a(\text{M}^{-1})$	$1.76(\pm 0.27) \times 10^8$	$1.13(\pm 0.11) \times 10^8$
$\Delta H^\circ (\text{kcal mol}^{-1})$	$-10,400 \pm 72$	-4680 ± 24
$T\Delta S^\circ (\text{kcal}^{-1}\text{mol}^{-1})$	849 ± 149	$6,310 \pm 63$
$\Delta G^\circ (\text{kcal mol}^{-1})$	$-11,200 \pm 91$	$-11,000 \pm 39$

Valores promedio basados en una $c=50$. Las desviaciones estándar fueron calculadas a partir de tres réplicas por cada titulación.

Es interesante analizar el termograma a pH 10.0 donde se puede apreciar un pico endotérmico al momento de llegar a la saturación. Este mismo fenómeno se puede observar en el trabajo de investigación de Kano y colaboradores al momento de obtener los parámetros termodinámicos de la formación de complejo de Calix-tBu con zinc(II) en acetonitrilo. En la presencia de un 0.5% de agua, picos endotérmicos aparecen después de que el proceso exotérmico se haya completado (Kano y cols, 2011). Aunque las condiciones experimentales no son las mismas, es interesante observar que en otras investigaciones también ocurre este fenómeno y que no se deben a problemas mecánicos ni error humano.

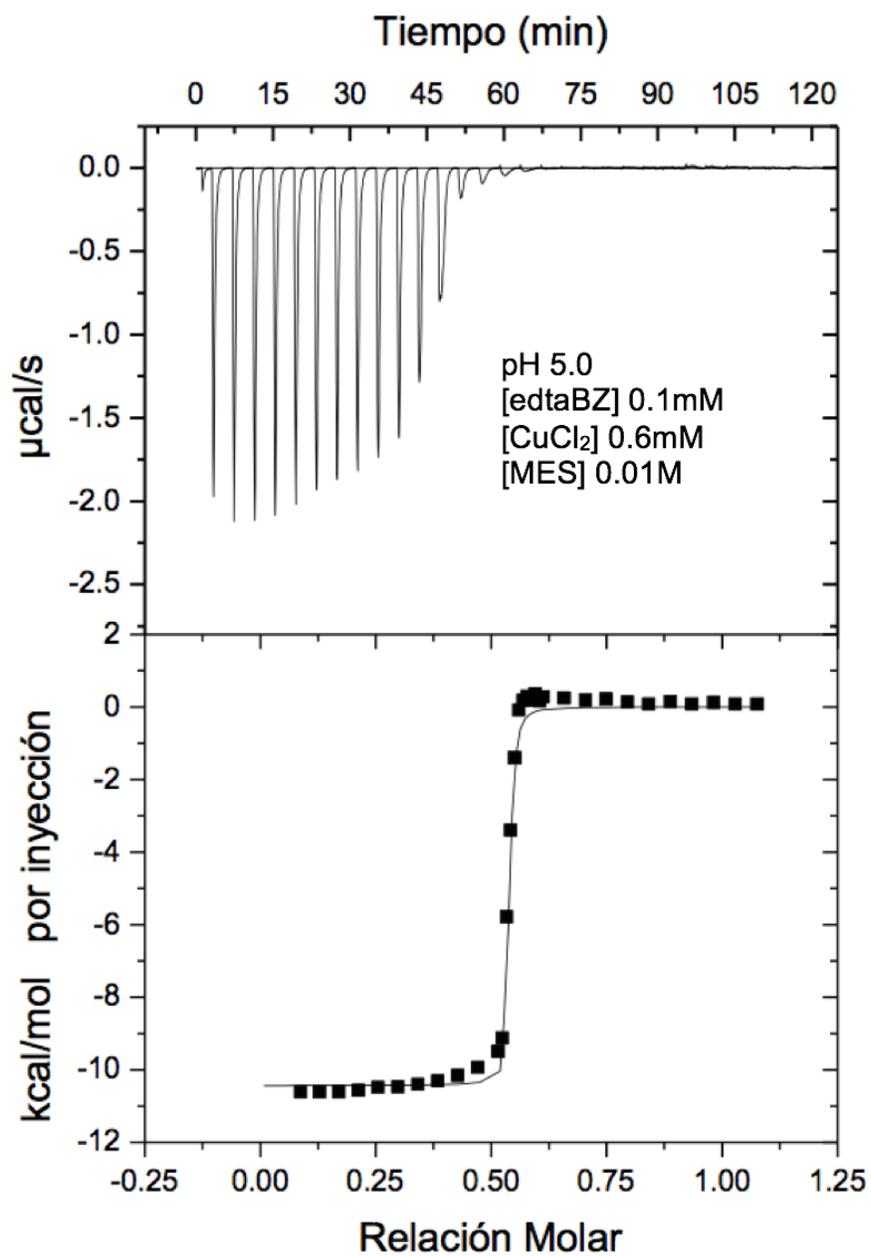


Figura 24. Termograma de la formación de complejo de Cu-BZ a pH 5.0

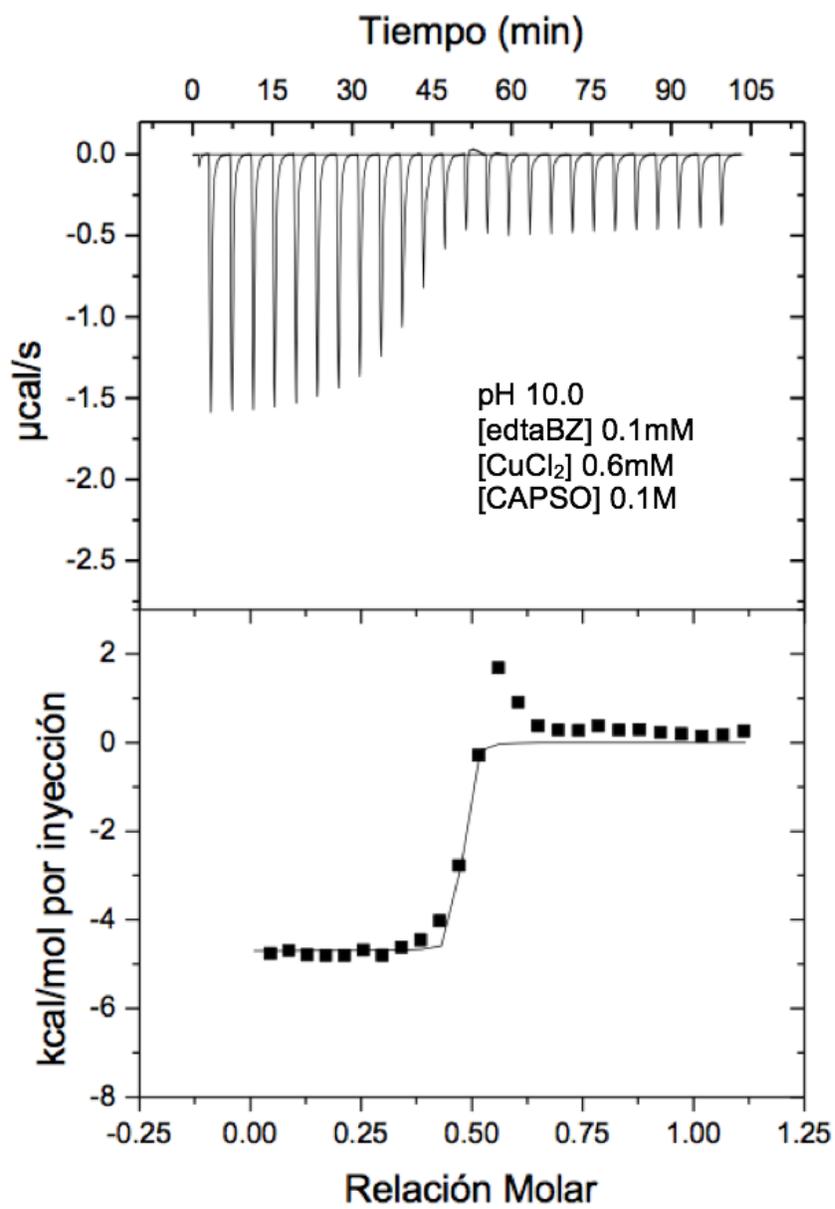


Figura 25. Termograma de la formación de complejo de Cu-BZ a pH 10.0

Estequiometría del complejo

Como se me mencionó anteriormente, el valor de $n=0.5$ estaría indicando que por cada dos moléculas de ligante se encuentra coordinado un catión cobre. La técnica ITC no aporta información estructural por lo que no es posible establecer con precisión los sitios de coordinación, sin embargo, para fines de discusión de los parámetros termodinámicos, pensaremos en la formación de los complejos como los bosquejos que se presentan en la figura 26.

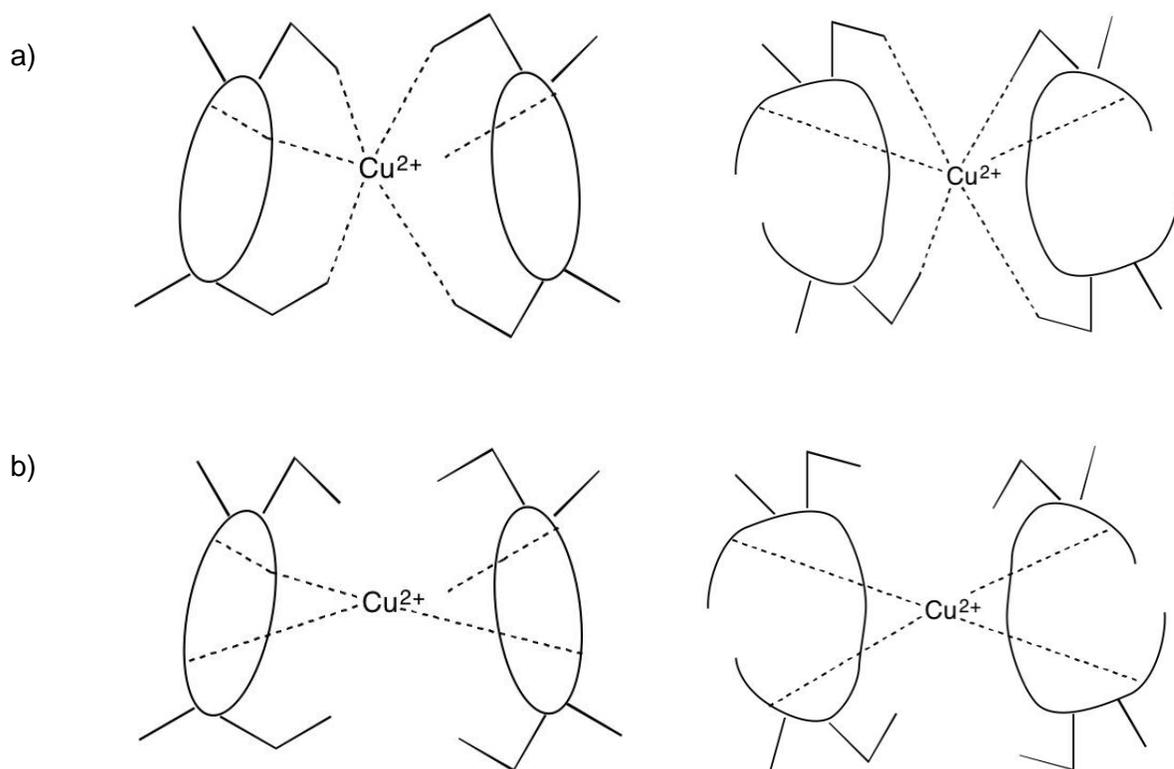


Figura 26. Bosquejo de los posibles modos de coordinación de los complejos estudiados con base en los valores obtenidos de estequiometría por la técnica ITC (a) Geometrías octaédricas de los ligantes macrocíclico (izquierda), y de cadena abierta (derecha). (b) Geometrías plana cuadrada de los ligantes macrocíclico (izquierda, y de cadena abierta(derecha).

La elucidación de los posibles complejos de coordinación de los ligantes se basa en los estudios anteriormente realizados de estos ligantes y de igual manera de los cristales obtenidos que fueron estudiados a través de rayos X (Figura 27 y 28). La forma semicerrada presentada en el bosquejo, se puede apreciar en la forma cristalina que presenta el ligante edtaBZ.

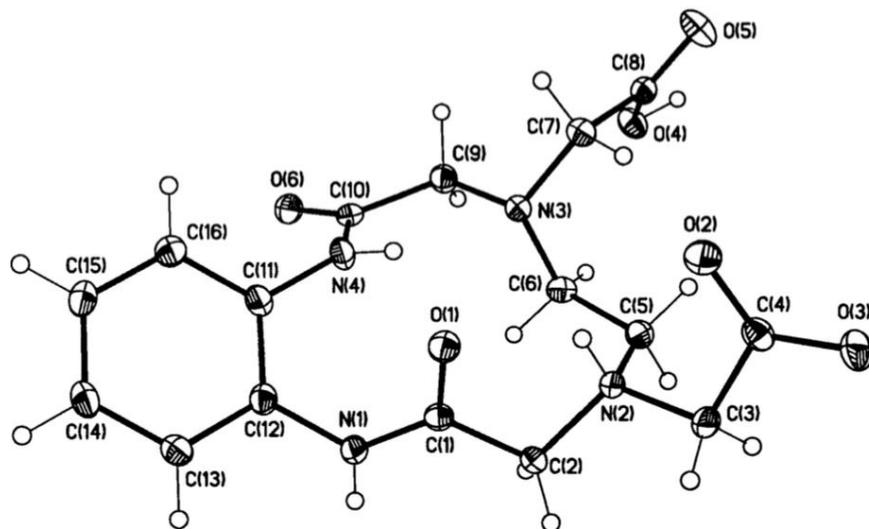


Figura 27. Estructura de rayos X de la molécula (edtaOD) H_2 . Fuente: Inoue y col, 2001

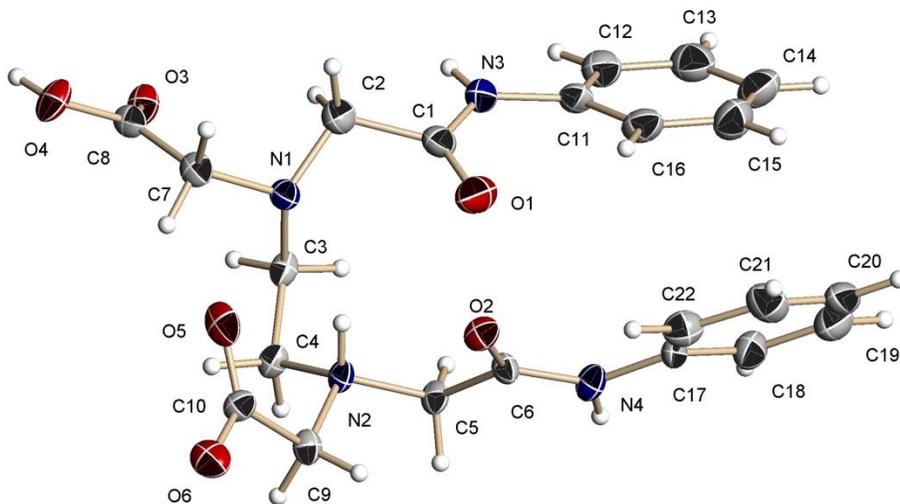


Figura 28. Estructura de rayos X de la molécula edtaBZ. Fuente: Santacruz, 2007.

Para un mejor entendimiento sobre el valor de n que ITC provee se decidió analizar la naturaleza de los ligantes y sus estructuras en solución por lo que se llevó a cabo una simulación molecular. Las estructuras de los ligantes fueron obtenidas por medio de cálculos de teoría funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) empleando el método híbrido PBE1PBE, utilizando en conjunto con una base de funciones de polarización

6-311G (d, p). Para ello se empleó el programa GAUSSIAN 09. Las estructuras presentadas a continuación (figura 29 y 30) son las geometrías optimizadas gracias al programa y simuladas en agua.

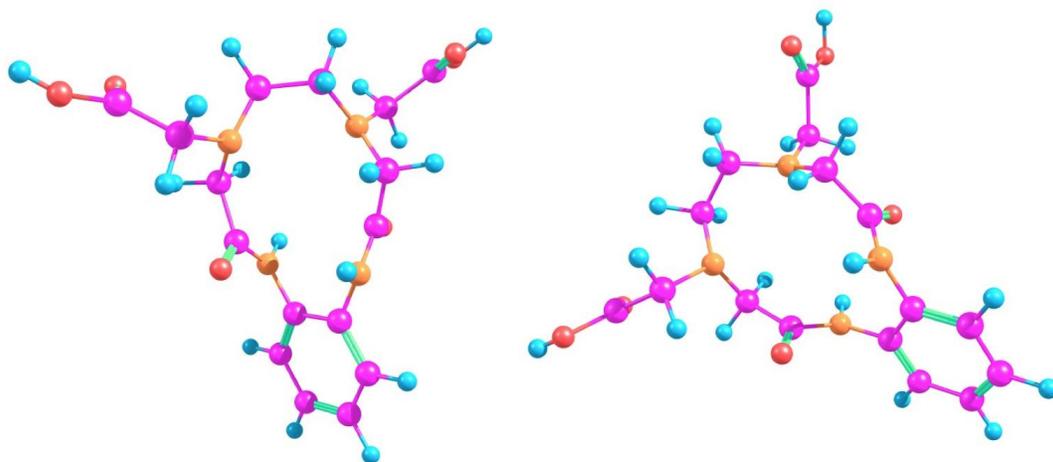


Figura 29. Estructuras optimizadas de la molécula edtaOD simuladas en GAUSSIAN 09.

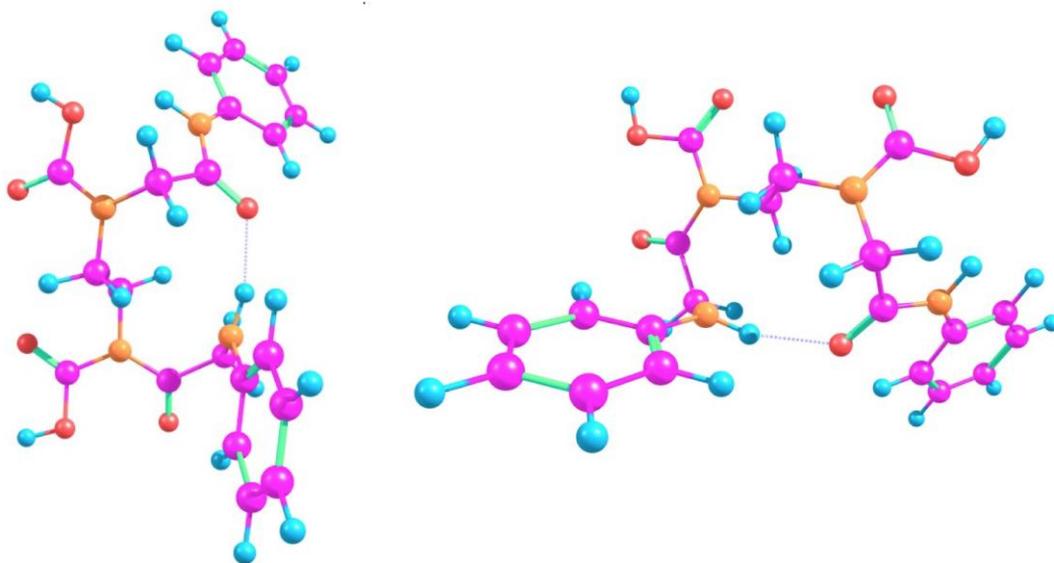


Figura 30. Estructuras optimizadas de la molécula edtaBZ simuladas en GAUSSIAN 09.

Gracias a la estructura optimizada del ligante BZ obtenida se puede apreciar que a diferencia de la estructura de rayos X de esta, la orientación de los anillos aromáticos difiere.

En solución, la orientación de los anillos aromáticos no se encuentra tan de frente como en la estructura de rayos X, pero la forma semicerrada se mantiene y un puente de hidrógeno se puede apreciar.

Efecto de la geometría de coordinación sobre la estabilidad

Para una mejor visualización de la contribución de los parámetros termodinámicos obtenidos de los cuatro experimentos realizados, se muestra en la figura 31. Como se puede apreciar, a pesar de que en todos los casos la magnitud de la energía libre de Gibbs es bastante similar, la contribución de los efectos entrópico y entálpico son muy diferentes. Las observaciones que resultan de esta gráfica se describen a continuación.

Geometría Octaédrica: en medio ácido, independientemente de la preorganización del ligante, la complejación está guiada principalmente por el efecto entálpico. Lo anterior es de esperarse si se considera que a este pH el complejo octaédrico formado involucra la formación de seis nuevos enlaces de coordinación. Aparentemente la energía liberada durante este proceso, rebasa la energía absorbida durante la disociación de las moléculas de agua que ocupaban el espacio reemplazado por el catión.

Por otra parte, aunque en ambos ligantes el factor entrópico es favorable, la contribución de este parámetro sobre la estabilidad es muy pequeño. Recordando lo citado en la sección de antecedentes, el concepto de entropía puede ser difícil de comprender. La entropía se puede describir como una medida de desorden en el sistema como también la energía de estado del sistema. Para interpretación en sistemas acuosos, el concepto de energía viene siendo el movimiento de un estado ordenado a uno desordenado (y viceversa), sin embargo, la idea de un estado de alta energía que cambia a un estado de baja energía es probablemente más adecuado (Falconer, 2016). Con base en este criterio, cualquier asociación debería tener un costo entrópico, sin embargo, la liberación de las moléculas de agua que rodeaban al ion cobre y al ligante antes de la complejación, podría ser la causa de la contribución entrópica observada en la gráfica.

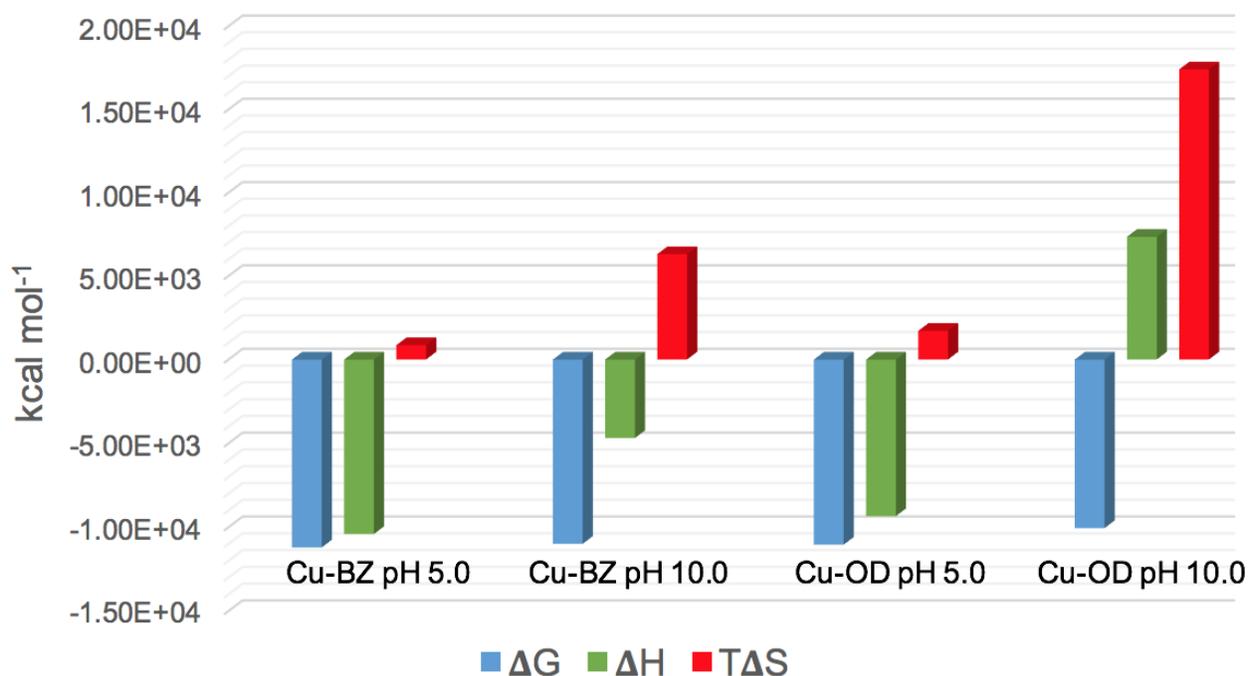


Figura 31. Representación gráfica de los parámetros termodinámicos de la formación de complejo de edtaOD y edtaBZ con cobre a pH 5.0 y 10.0

Geometría plana cuadrada: al contrario que en medio ácido, en medio básico para el caso de ambos ligantes la formación del complejo es guiado por la entropía. Debido a que el podando (edtaBZ), antes de la complejación, poseía mayor grado de libertad que el ciclofano (edtaOD), era de esperarse que tuviera una pérdida de entropía mayor al quedar restringido por la complejación y dado que, de acuerdo con lo reportado en investigaciones previas por Inoue y colaboradores, por cristalografía de rayos X, los cuatro enlaces formados, se dan específicamente con los átomos de nitrógeno (amina y amida) que no existen en los brazos pendientes. Lo anterior podría ser la causa de que a pesar de haber menos enlaces que a pH 5.0, la geometría plana cuadrada sí marque diferencia en la contribución entrópica respecto al complejo con el ligante macrocíclico el cual se encuentra preorganizado.

Resulta muy interesante la observación del factor entálpico en el caso del complejo con el ciclofano (edtaOD), ya que es en el único caso en que fue desfavorable para la estabilidad. Dado que en este caso el factor entrópico resultó ser el más grande, este parece ser el típico ejemplo del efecto conocido como “Compensación entalpía-entropía” (EEC, por sus siglas en inglés), el cual establece que, para un sistema químico similar o proceso a una temperatura fija, si los cambios de entalpia y entropía individuales se grafican se puede

encontrar una relación lineal. La pendiente de la línea provee una temperatura que es diferente a la temperatura experimental, y se le conoce como la temperatura de compensación. Existen algunas propuestas para tal efecto, pero ninguna de ellas ha sido aceptada, y EEC permanece siendo un fenómeno empírico, extra termodinámico y relacionado con un error de medición (Pan y col, 2016; Pan y col, 2015).

Es importante recordar que al momento de realizarse la complejación, cuando el catión comienza a ocupar el espacio destinado para la coordinación, la desolvatación de la cavidad ocurre. Esto quiere decir que las moléculas de agua deben salir para que el catión ocupe ese espacio. La liberación de estas moléculas de agua de solvatación puede dar paso a una ventaja entrópica y en un modelo complementario las moléculas de agua liberadas permiten interacciones cohesivas del tipo agua-agua, lo que puede llevar a tener una ganancia entálpica (Bierdeman y cols, 2014).

Una revisión sobre el efecto hidrofóbico con complejos supramoleculares realizado por Bierdeman y colaboradores abordan una nueva perspectiva que implica “agua de alta energía” como una fuerza impulsora no covalente. En esa investigación fue posible separar el efecto hidrofóbico de las interacciones dispersivas, las cuales son las más fuertes en sistemas acuosos. Inclusive alcanos muy hidrofóbicos solo se asocian significativamente en cavidades que contienen moléculas de agua con un número insuficiente de posibles uniones con hidrógenos. El remplazo de “agua de alta energía” en las cavidades por moléculas huésped es la fuerza impulsora esencial para la complejación como ha sido comprobado por los datos obtenidos de los complejos de ciclodextrinas, ciclofanos y cucurbiturilos, en donde entalpías de complejación de hasta -100kJ mol^{-1} se obtuvieron para residuos de alquilos encapsulados. Las cavidades de receptores artificiales son más aptas de mostrar el efecto entálpico de “agua de alta energía” que en proteínas o ácidos nucleicos porque contienen menos (o ningún) grupos funcionales en el interior de la cavidad para estabilizar moléculas de agua en el interior (Bierdeman y cols, 2014).

Tomar en cuenta factores como el agua es sumamente importante al momento de tratar de caracterizar termodinámicamente un sistema, pues la desolvatación es inherente al momento de formar un complejo y contribuye tanto entálpica como entrópicamente.

CONCLUSIÓN

La caracterización termodinámica del sistema metal-ligando presentado en este trabajo se realizó gracias a la calorimetría de titulación isotérmica. Los parámetros termodinámicos ΔH , ΔG , ΔS , K_a y n de la formación de complejo de Cu^{2+} fueron exitosamente obtenidos a valores de pH 5.0 y 10.0. Independientemente de la geometría de coordinación la complejación ocurre de una manera espontánea y las constantes de asociación se encuentran en el orden de 10^7 - 10^8 lo que significa que la estabilidad de los complejos es alta y que la afinidad del cobre por estos ligantes es alta también.

Se esperaba que la preorganización del ciclofano favoreciera la formación de complejo, sin embargo, los resultados son similares respecto al podando. Además, la complejación a pH 10.0 con edtaOD es un sistema guiado por el factor entrópico y el fenómeno compensación entropía-entalpía se presentó. El valor de $n=0.5$ obtenido llevó a la elucidación de que por cada dos ligantes un catión cobre se encuentra coordinado.

Finalmente, en este trabajo se presentan los parámetros termodinámicos obtenidos de la formación de complejo de un ciclofano y un podando con cobre en solución, los cuales son cruciales para entender el mecanismo detallado de la formación de los compuestos de coordinación.

RECOMENDACIONES

Realizar experimentos a diferentes valores de temperatura, solventes y metales con el fin de saber si estos factores afectan la estabilidad del complejo. De igual manera se pretende continuar con estudios por UV y por espectrometría de masas para corroborar la estequiometría. Comparar los parámetros termodinámicos obtenidos con ITC con alguna otra técnica como UV. Hacer uso de la química computacional para modelado molecular de los ligantes en estudio y la formación de su complejo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, Bruce et al. (2011). *Introducción a la Biología Celular*. 3ª ed. México, D.F. Médica Panamericana. 82-99 p.
- Amaya, T., & Rebek, J. (2004). Hydrogen-Bonded Encapsulation Complexes in Protic Solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 126(43), 14149-14156. doi:10.1021/ja0467770
- Amilasan, A. T., Solis, J. S., Arco, S. D., & Castriciones, E. V. (2010). Calorimetric Titration of Selected Divalent Transition Metal Cations with a Novel Macrocyclic Diamide. *Philippine Journal of Science*, 139(1), 1-4. ISSN 0031 - 7683
- Arroyo-Maya, I. J., & McClements, D. J. (2015). Application of ITC in foods: A powerful tool for understanding the gastrointestinal fate of lipophilic compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(5), 1026-1035. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.10.001
- Atkins, P. W., & Jones, L. L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana p. 638
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Education.
- Bianconi, M. L. (2007). Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. *Biophysical Chemistry*, 126(1-3), 59-64. doi: 10.1016/j.bpc.2006.05.017
- Biedermann, F., Nau, W. M., & Schneider, H. (2014). The Hydrophobic Effect Revisited-Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(42), 11158-11171. doi:10.1002/anie.201310958
- Breslow, R., Czarnik, A. W., Lauer, M., Leppkes, R., Winkler, J., & Zimmerman, S. (1986). Mimics of transaminase enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 108(8), 1969-1979. doi:10.1021/ja00268a040
- Burnouf, D., Ennifar, E., Guedich, S., Puffer, B., Hoffmann, G., Bec, G., . . . Dumas, P. (2012). KinITC: A New Method for Obtaining Joint Thermodynamic and Kinetic Data by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of the American Chemical Society*, 134(1), 559-565. doi:10.1021/ja209057d
- Campoy, A. V., & Freire, E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophysical Chemistry*, 115(2-3), 115-124. doi: 10.1016/j.bpc.2004.12.015

- Canabady-Rochelle, L., Sanchez, C., Mellema, M., & Banon, S. (2009). Thermodynamic characterization of calcium-milk protein interaction by isothermal titration calorimetry. *Dairy Science and Technology*, 89(3-4), 257-267. doi:10.1051/dst/2009006
- Chang, R. (2010). *Química*. D.F, México: McGraw-Hill.
- Christensen, J. J., Izatt, R. M., and Eatough, D. (1965). Thermodynamics of metal cyanide coordination. V. Log K, ΔH° , and ΔS° values for the Hg_2^{2+} -cn-system. *Inorg. Chem.* 4, 1278–1280.
- Christensen, J. J., Izatt, R. M., Hansen, L. D., & Partridge, J. A. (1966). Entropy Titration. A Calorimetric Method for the Determination of ΔG , ΔH , and ΔS from a Single Thermometric Titration. *The Journal of Physical Chemistry*, 70(6), 2003-2010. doi:10.1021/j100878a049
- Cotton, F. A., & Wilkinson, G. (1988). *Advanced inorganic chemistry*: John Wiley & Sons Incorporated.
- Cragg, P. J. (2010). *Supramolecular Chemistry: from biological inspiration to biomedical applications*. Dordrecht: Springer. pp. 18-19
- Cragg, P. J. (2005). A practical guide to supramolecular chemistry. Chichester: John Wiley & Sons pp. 9-10; 208
- Davis, A. P. (1993). Cholaphanes et al.; steroids as structural components in molecular engineering. *Chemical Society Reviews*, 22(4), 243. doi:10.1039/cs9932200243
- Diederich, F. (1991). *Cyclophanes*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Diederich, F. (1988). Complexation of Neutral Molecules by Cyclophane Hosts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27(3), 362-386. doi:10.1002/anie.198803621
- Eatough, D. J., Lewis, E. A., and Hansen, L. D. (1985). Determination of ΔH and K_{eq} values. In "Analytical Solution Calorimetry" (K. Grime, ed.), pp. 137–161. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Falconer, R. J. (2016). Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015. *Journal of Molecular Recognition*, 29(10), 504-515. doi:10.1002/jmr.2550
- Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. Zaragoza, España: Acriba Editorial.

- Ferreira, C. M., Pinto, I. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Adv.*,5(39), 30989-31003. doi:10.1039/c4ra15453c
- Fonseca, H. M., & König, B. (2003). Chiral Tetraaza Ligands in Asymmetric Catalysis: Recent Progress. *Advanced Synthesis & Catalysis*,345(11), 1173-1185. doi:10.1002/adsc.200303077
- Franke, J., & Vögtle, F. (1986). Complexation of organic molecules in water solution. *Biomimetic and Bioorganic Chemistry II Topics in Current Chemistry*,132, 135-170. doi:10.1007/bfb0018066
- Freire, E., Mayorga, O. L., and Straume, M. (1990). Isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.* 62, 950A–959A.
- Freyer, M. W., & Lewis, E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques Methods in Cell Biology*, 79-113. doi:10.1016/s0091-679x(07)84004-0
- Furhop, J.-H. (1980). Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds. Herausgegeben von G. A. Melson. Plenum Press, New York 1979. *Angewandte Chemie*, 92, 414-415.
- Gispert, J. R. (2000). *Química de coordinación*. Barcelona: Omega.
- Haas, K. L., & Franz, K. J. (2009). Application of Metal Coordination Chemistry to Explore and Manipulate Cell Biology. *Chemical Reviews*,109(10), 4921-4960. doi:10.1021/cr900134a
- Hansen, L. D., Christensen, J. J., and Izatt, R. M. (1965). Entropy titration. calorimetric method for the determination of DG⁻ (k), DH⁻ and DS⁻. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 3, 36–38.
- Hong, L., Bush, W. D., Hatcher, L. Q., & Simon, J. (2008). Determining Thermodynamic Parameters from Isothermal Calorimetric Isotherms of the Binding of Macromolecules to Metal Cations Originally Chelated by a Weak Ligand†. *The Journal of Physical Chemistry B*,112(2), 604-611. doi:10.1021/jp075747r
- Hosseini, M. W., & Lehn, J. (1987). Binding of AMP, ADP, and ATP Nucleotides by Polyammonium Macrocycles. *Helvetica Chimica Acta*,70(5), 1312-1319. doi:10.1002/hlca.19870700512

- Hua, Z. L., Na, W. W., Yuan, W., & Guang, S. (2013). Synthesis, characterization, DNA-binding, and antioxidant activities of four copper(II) complexes containing N-(3-hydroxybenzyl)-amino amide ligands. *Journal of Coordination Chemistry*,66(2), 227-242. doi:10.1080/00958972.2012.754018
- Inoue, M. B., Machi, L., Muñoz, I. C., Rojas-Rivas, S., Inoue, M., & Fernando, Q. (2001). Metal–ligand interactions in benzodioxotetraaza-macrocyclic metal chelates. *Inorganica Chimica Acta*,324(1-2), 73-80. doi:10.1016/s0020-1693(01)00536-9
- Inoue, M. B., Inoue, M., Sugich-Miranda, R., Machi, L., Velazquez, E. F., & Fernando, Q. (2001). High steric constraints and molecular distortion in methyl-substituted amide-based paracyclophanes and the binuclear Cu₂ complexes: X-ray structures, NMR and absorption spectra. *Inorganica Chimica Acta*,317(1-2), 181-189. doi:10.1016/s0020-1693(01)00362-0
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- Jimenez, L., & Diederich, F. (1989). Catalytic cyclophanes: A highly efficient model for pyruvate oxidase. *Tetrahedron Letters*,30(21), 2759-2762. doi:10.1016/s0040-4039(00)99118-4
- Johnson, D. R., & Decker, E. A. (2015). The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*,6(1), 171-190. doi:10.1146/annurev-food-022814-015532
- Kano, K., Kondo, M., Inoue, H., Kitagishi, H., Colasson, B., & Reinaud, O. (2011). Calorimetric Study on Coordination of Tridentate Imidazolyl Calix [6] arene Ligands to Zinc Ion in Organic Solvents. *Inorganic Chemistry*,50(13), 6353-6360. doi:10.1021/ic200809k
- Krainer, G., Broecker, J., Vargas, C., Fanghänel, J., & Keller, S. (2012). Quantifying High-Affinity Binding of Hydrophobic Ligands by Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Chemistry*,84(24), 10715-10722. doi:10.1021/ac3025575
- Kumar, S., Bhalla, V., & Singh, H. (1998). Synthetic ionophores part 19: Synthesis and ionophore character of 2-aminothiophenol based silver selective acyclic and cyclic receptors. *Tetrahedron*,54(21), 5575-5586. doi:10.1016/s0040-4020(98)00229-4

Lehn, J. (1995). *Supramolecular chemistry: concepts and perspectives*. Weinheim: VCH.

Lehn, J. (2002). *Supramolecular Polymer Chemistry— Scope and Perspectives*. *Polymer International*, 825-839. doi:10.1002/pi.852

Lindoy, L. F. (1990). *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*: Cambridge University Press.

López González, L. E. (2016). EFECTO ANTIOXIDANTE DE UN COMPLEJO DE Fe³ DE LIGANTE TIPO CICLOFANO EN ACEITE DE PESCADO DE ARENQUE AMERICANO. Universidad de Sonora.

Machi, L., Santacruz, H., Sánchez, M., & Inoue, M. (2006). Bichromophoric Naphthalene Derivatives of Ethylenediaminetetraacetate: Fluorescence from Intramolecular Excimer, Protonation and Complexation with Zn⁺² and Cd⁺². *Supramolecular Chemistry*, 18(7), 561-569. doi:10.1080/10610270600849996

Maron, S. H., & Prutton, C. F. (2011). *Fundamentos de fisicoquímica*. México: Limusa.

Meulen, K. A., & Butcher, S. E. (2011). Characterization of the kinetic and thermodynamic landscape of RNA folding using a novel application of isothermal titration calorimetry. *Nucleic Acids Research*, 40(5), 2140-2151. doi:10.1093/nar/gkr894

Murakami, Y. (1983). Functionalized cyclophanes as catalysts and enzyme models. *Topics in Current Chemistry Cyclophanes II*, 107-155. doi:10.1007/3-540-12478-0_3

Murakami, Y., Kikuchi, J., Ohno, T., Hayashida, O., & Kojima, M. (1990). Syntheses of macrocyclic enzyme models. 7. Octopus cyclophanes having L-aspartate residues as novel water-soluble hosts; aggregation behavior and induced-fit molecular recognition. *J. Am. Chem. Soc. Journal of the American Chemical Society*, 112(21), 7672-7681. doi:10.1021/ja00177a031

Murakami, Y. (1992). Molecular design and catalytic function of a B12-enzyme mimetic. *Trends in Biotechnology*, 10, 170-177. doi:10.1016/0167-7799(92)90206-b

Pan, A., Kar, T., Rakshit, A. K., & Moulik, S. P. (2016). Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: Decisive Role of Free Energy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(40), 10531-10539. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b05890

Pan, A., Biswas, T., Rakshit, A. K., & Moulik, S. P. (2015). Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: A Revisit. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(52), 15876-15884. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09925

- Rebek, J. (1990). Model studies in molecular recognition. *Journal of Heterocyclic Chemistry*,27(1), 111-117. doi:10.1002/jhet.5570270110
- Rekharsky, M., Inoue, Y., Tobey, S., Metzger, A., & Anslyn, E. (2002). Ion-Pairing Molecular Recognition in Water: Aggregation at Low Concentrations That Is Entropy-Driven. *Journal of the American Chemical Society*,124(50), 14959-14967. doi:10.1021/ja020612e
- Rivera, D. G., León, F., Concepción, O., Morales, F. E., & Wessjohann, L. A. (2013). A Multiple Multicomponent Approach to Chimeric Peptide-Peptoid Podands. *Chemistry - A European Journal*,19(20), 6417-6428. doi:10.1002/chem.201201591
- Salazar-Medina, A., Sugich-Miranda, R., Teran-Cabanillas, E., Hernández, J., González-Aguilar, G., Rudiño-Piñera, E. Velázquez-Contreras, E. (2013). Antioxidant Capacity of Two Novel Bioactive Fe(III)-Cyclophane Complexes. *Molecules*, 18(2), 1762-1774. doi:10.3390/molecules18021762
- Santacruz Ortega, H. D. (2007). *Síntesis y caracterización espectroscópica de agentes quelantes fluorescentes y sus complejos metálicos*. Hermosillo, Sonora, México. Universidad de Sonora.
- Santacruz, H., Navarro, R. E., Machi, L., Sugich-Miranda, R., & Inoue, M. (2011). Solution structures of fluorescent Zn(II) complexes with bis(naphthyl amide)-EDTA. *Polyhedron*,30(5), 690-696. doi: 10.1016/j.poly.2010.12.002
- Schmidtchen, Franz P. (2007) 'Isothermal Titration Calorimetry', *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 1:1, 1 — 10
- Schneider, H., & Yatsimirsky, A. K. (2000). *Principles and methods in supramolecular chemistry*. New York: Wiley.
- Schneider, H. (2012). *Applications of supramolecular chemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shamsipur, M. (2002). Uranyl-selective PVC membrane electrodes based on some recently synthesized benzo-substituted macrocyclic diamides. *Talanta*,58(2), 237-246. doi:10.1016/s0039-9140(02)00238-2
- Stauffer, D. A., Barrans, R. E., & Dougherty, D. A. (1990). Biomimetic Catalysis of an SN2 Reaction Resulting from a Novel Form of Transition-State Stabilization. *Angewandte Chemie International Edition in English*,29(8), 915-918. doi:10.1002/anie.199009151
- Steed, J. W., Turner, D. R., & Wallace, K. J. (2007). *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. Chichester, England: John Wiley.

Steed, J. W., & Atwood, J. L. (2009). *Supramolecular chemistry*. Chichester, UK: Wiley.

Sugich, M.R. (2001). Efecto de la Rigidez Estructural Sobre las Propiedades de Complejación de Ligandos Macrocíclicos tipo Ciclofano. Universidad de Sonora.

Tabushi, I., & Yamamura, K. (1983). Water Soluble Cyclophanes as Hosts and Catalysts. *Topics in Current Chemistry*, 113, 145-182.

Todd, M. J., & Gomez, J. (2001). Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? *Analytical Biochemistry*, 296(2), 179-187. doi:10.1006/abio.2001.5218

Torres Piña, F. A. (2011). Efecto Antioxidante de un Complejo Metálico Sintético en Aceite de Pescado. Universidad de Sonora.

Turnbull, W. B., & Daranas, A. H. (2003). On the Value of c : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14859-14866. doi:10.1021/ja036166s

Vafazadeh, R., & Zare-Sadrabadi, G. (2015). Kinetics and Mechanism of the Ligand Exchange Reaction Between Tetraaza Macrocyclic Ligand and Cu(II) Tetradentate Amine-Amide Complexes. *Acta Chimica Slovenica*, 889-894. doi:10.17344/acsi.2015.1611

Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., & Freire, E. (2015). Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Methods in Molecular Biology Protein-Protein Interactions*, 183-204. doi:10.1007/978-1-4939-2425-7_11

Villegas Osuna, C. A. (1994). Síntesis y caracterización de nuevos compuestos macrocíclicos de 12, 13 y 24 miembros con grupos acetato pendientes y sus complejos con Cu (II), Mn (II) y Pb (II). Universidad de Sonora

Whitlock, B. J., & Whitlock, H. W. (1988). Intracavity acetyl transfer. *Tetrahedron Letters*, 29(47), 6047-6050. doi:10.1016/s0040-4039(00)82261-3

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131–137.

Yao, Z., Li, K., Zhang, J., Wang, Y., & Deng, W. (2016). Synthesis, characterization and polymerization activity of copper complexes with N, O-chelate ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 450, 118-123. doi: 10.1016/j.ica.2016.05.032