

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

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

**Estudio de las propiedades termodinámicas del complejo  
Cu<sub>2</sub>PD, con potencial de actividad biomimética de la enzima  
SOD, por calorimetría de titulación isotérmica (ITC)**

**TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA**

**Que para obtener el Título de**

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

**Presenta:**

**ELIO ALBERTO MOLINA MARTINEZ**

**Hermosillo, Sonora**

**Agosto de 2017**

# Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



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

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado para revisar la tesis profesional de Elio Alberto Molina Martinez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

---

Dra. Rocío Sugich Miranda  
Directora de Tesis

---

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores  
Secretario

---

Dra. Hisila Santacruz Ortega  
Vocal

---

Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras  
Suplente

## DEDICATORIA

Esta tesis profesional practica está dedicada especialmente a mis padres Elio Alberto Molina y Lucila Martinez, estoy aquí gracias a ellos, me enseñaron que siempre se puede salir adelante y que todo es posible.

Agradezco a toda mi familia, en especial mis tíos Edilia Soto, Francisco Rodríguez, Reyna Angulo, a mi Abuela Guadalupe Soto y a mis hermanas Alejandra y Carolina, son parte fundamental en mi vida. A mi novia Zulma Rochin por su paciencia y apoyo en todo momento.

Agradecimiento especial para la Dra. Rocío Sugich Miranda por darme la oportunidad de unirme a su equipo y poder trabajar con ella, por todos los consejos y regaños a través de mi carrera, primero como profesora, como tutora y como directora de tesis. Y a mis hermanos Gustavo, Alfredo y Melissa.

Agradezco a la Universidad de Sonora, una gran institución, y a todos los profesores que a lo largo de mi carrera formaron bases fuertes para poder ser un gran profesionista. Agradezco también al Departamento de Investigación en Polímeros por dejarme utilizar las instalaciones para esta investigación.

Agradezco la Dra. Hisila Santacruz por el espacio brindado en su laboratorio para la realización de esta investigación y por siempre estar ahí para apoyarme con mis dudas. De igual manera a todos mis compañeros del Departamento de Investigación en Polímeros por su apoyo.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada a través del proyecto de ciencia básica

## CONTENIDO

FORMATO DE APROBACIÓN .....	2
DEDICATORIAS.....	3
CONTENIDO .....	4
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABLAS .....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS .....	12
Objetivos Generales .....	12
Objetivos Particulares.....	12
ANTECEDENTES.....	13
Compuestos de coordinación .....	13
Compuestos macrocíclicos .....	16
Ciclofanos.....	18
Sistemas Modelo.....	20
Superóxido Dismutasa .....	20
Parámetros termodinámicos y su interpretación .....	22
Entalpia.....	22
Entropía .....	23
Energía libre de Gibbs .....	24
Titulación de Calorimetría Isotérmica .....	27
Obtención de Ka en ITC.....	28
Valor de c .....	29
Instrumento.....	29
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31

Valores de pH .....	33
Buffers.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Materiales.....	36
Métodos .....	36
Síntesis y purificación del ligante .....	36
Preparación de soluciones de buffer .....	33
Preparación de soluciones de metales... ..	37
Preparación de soluciones de ligantes... ..	37
Método de Job .....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Geometría plano cuadrada (pH 10.0) .....	40
Geometría octaédrica (pH 6.0) .....	42
Mezcla de especies (pH 7.4) .....	43
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complejos con capacidad biomimética de SOR. (2) $[\text{FeII}(\text{Me}_4[15]\text{janeN}_4)(\text{SPh})]\text{BPh}_4$ (3) $[\text{FeII}(\text{Me}_4[15]\text{janeN}_4)(\text{OTf})_2]$ .....	10
Figura 2. Estructura del ciclofano PD en medio básico .....	11
Figura 3. Compuesto de coordinación. Dicloruro de hexa-amino níquelato .....	13
Figura 4. Diferentes tipos de geometría de coordinación. M es el metal y L representa un ligante monodentado.....	15
Figura 5. Ejemplo de un receptor tipo calixareno .....	16
Figura 6. Estructura de la $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -ciclodextrinas.....	17
Figura 7. Ejemplos de estructuras de éteres corona.....	18
Figura 8. Ciclofanos .....	19
Figura 9. Superóxido Dismutasa.....	21
Figura 10. Ejemplo de termograma obtenido por ITC .....	28
Figura 11. Microcalorímetro Microcal VP-ITC .....	30
Figura 12. Estructura del Sitio Activo de la CuZnSOD .....	31
Figura 13. Ciclofano PO: X=-O- PC: X=-CH <sub>2</sub> -. En solución básica.....	32
Figura 14. Ciclofano PO: X=-O- PC: X=-CH <sub>2</sub> -. En solución ácida.....	32
Figura 15. Resultados de la prueba antioxidante TEAC (gráfica de barras) y la prueba para demostrar actividad biomimética, NBT (gráfica dispersión) .....	33
Figura 16. Modelos propuestos para las geometrías de coordinación del ciclofano EDTA PD ....	34
Figura 17. Espectro electrónico de una solución del ciclofano EDTA PD a valores de pH; 4.8, 6.2, 7.5, 9.2 y 12.2.....	34
Figura 18: Tabla de interacción de buffers con metales.....	35
Figura 19: Modelo esquemático de un microcalorímetro.....	37
Figura 20. Termograma de la formación de complejo CuPD a pH=10.0.....	40
Figura 21. Gráfica obtenida por el método de Job para confirmar la relación molar del complejo CuPD en buffer POPSO de pH=10.0... ..	41
Figura 22. Termograma de la formación de complejo CuPD a pH 6.0... ..	42
Figura 23. Termograma de la formación de complejo de CuPD a pH 7.4 .....	44

## LISTA DE TABLAS

1. Parámetros termodinámicos de la complejación del ligante PD con cobre a 25°C .....35

## RESUMEN

Los compuestos de coordinación de macrociclos con metales de transición son considerados actualmente como una alternativa prometedora con la cual se podría apoyar en el tratamiento o prevención de padecimientos diversos (Ramadan, 2012). Actualmente las investigaciones, relacionadas con la salud han profundizado en el estudio de moléculas biomiméticas con actividad antioxidante potencial (Sugich-Miranda 2010, Fernández y col 2007, Salazar 2013) lo anterior debido a que el estrés oxidativo es un problema mayor en nuestra sociedad y se da cuando hay un desbalance en los radicales libres en nuestro organismo al no ser suficientes nuestras enzimas para metabolizarlo, siendo de importancia el desarrollo de nuevas alternativas para combatirlo. Imitar lo que ocurre en la naturaleza incrementa las posibilidades de que estos sistemas sean efectivos (Salazar 2013). Los ciclofanos pueden actuar como biomiméticos de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasas, debido a la similitud entre su geometría de coordinación a metales con el sitio activo de estas enzimas (Sugich-Miranda 2010). El ciclofano PD que se presenta en esta tesis muestra dos geometrías de coordinación en función de su pH, octaédrica en medio ácido y plano cuadrado en medio básico. Esta última es similar a la presentada por la enzima superóxido dismutasa, y dicha característica motivo la presente investigación. Para la formación del complejo CuPD se requieren interacciones supramoleculares que pueden producir o absorber calor. Por lo que evaluar los parámetros termodinámicos de la formación de estos complejos, puede contribuir a un mejor entendimiento y comprensión de cómo actúan estos sistemas. Por lo que este trabajo está enfocado a la determinación de  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $K_a$  y la estequiometría N de la formación del complejo Cu<sub>2</sub>PD por calorimetría de titulación isotérmica (ITC). En general, a los tres valores de pH evaluados (6.0, 10.0 y 7.4) la formación del complejo es espontánea, muy estable y dirigida favorablemente tanto por el factor entrópico, como por el entálpico, excepto para el caso de pH intermedio en el que prevalece mezcla de las especies ácida y básica. La estequiometría del complejo resultó ser 1:1, es decir, bajo las condiciones evaluadas, solamente un ion cobre es atrapado por el ligante PD para formar ya sea complejo octaédrico o plano cuadrado, según el pH evaluado.

## 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 (Steed y col., 2007). En la actualidad la química supramolecular es un área de investigación de gran interés y es considerada como pieza clave en el área de las ciencias analíticas. Es una ciencia interdisciplinaria ya que se complementa con otras áreas como la química orgánica, inorgánica y fisicoquímica (Steed y col., 2007).

A la rama de la química inorgánica relacionada con el comportamiento combinado de cationes y sus ligantes (moléculas con cavidades bi- o tridimensionales) a través de interacciones intermoleculares, se llama química de coordinación, y el resultado de la asociación ligante-cación recibe el nombre de complejo o compuesto de coordinación (Wu, 2013; Biradha, 2009; Lehn, 2002).

Se han reportado diversos ejemplos de complejos formados a partir de ligantes o receptores sintéticos que funcionan como sistema modelo para imitar procesos bioquímicos naturales que brindan resultados confiables y fáciles de comprender acerca de dichos procesos, como los complejos que se presentan en la Figura 1, los cuales mostraron actividad biomimética a la superóxido reductasa (SOR), estos complejos fueron estudiados con el fin de evaluar las implicaciones del estado de spin y la complejación al tiolato en función de la actividad biomimética de SOR. (Diederich, 1990, Namuswe y col, 2010, Fernandes, 2007).

También se conocen ventajas diversas de estos receptores artificiales, una de ellas es que se pueden diseñar y modificar de acuerdo a lo que se desee estudiar, por ejemplo, elegir los grupos funcionales para así variar las características de asociación. Un grupo muy importante de receptores o ligantes artificiales utilizados como sistemas modelo de enzimas son los compuestos macrocíclicos, entre estos se encuentran los ciclofanos, que son hidrocarburos aromáticos que consisten en una unidad (típicamente un anillo de benceno) y una cadena alifática que forma un puente entre dos posiciones del anillo aromático. (Diederich. 1991)

Los ciclofanos juegan un papel central en la actual línea de la química del huésped-anfitrión debido a la presencia de anillos aromáticos que le proveen rigidez, y puentes alifáticos para equilibrar la molécula en cuanto a flexibilidad además de la relativa facilidad para sintetizarlos.

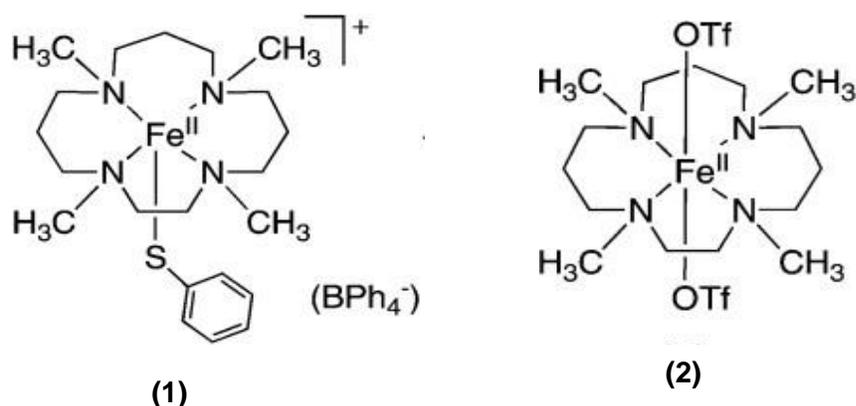


Figura 1. Complejos con capacidad biomimética de SOR. (1)  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Me}_4[15]\text{aneN}_4)(\text{SPh})]\text{BPh}_4$ .  
 (2)  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Me}_4[15]\text{aneN}_4)(\text{OTf})_2]$ . (Diederich, 1990, Namuswe y col, 2010, Fernandes, 2007).

Gracias a las características antes mencionadas de los ciclofanos, se les ha atribuido una alta estabilidad termodinámica y cierta flexibilidad de arreglo del ligante, siendo algunos complejos metálicos derivados de macrociclos de este tipo, propuestos para estudio como posible agente biomimético de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y como antioxidante (Salazar y col., 2013).

Por otra parte, cada vez crece más el número de publicaciones que hablan acerca de las condiciones patológicas asociadas con la sobreproducción del anión superóxido, provocado en muchos casos por el estilo de vida actual (condiciones de estrés, tabaquismo, dietas no balanceadas, entre otros), por lo que se buscan nuevas alternativas para contrarrestar estos padecimientos (Muscolini y col. 2003, Sheng, 2014, Aston, 2001).

Basados en el concepto que al remover al anión superóxido se puede modular el curso de una inflamación, miméticos sintéticos de la enzima superóxido dismutasa de bajo peso molecular, pueden sobresalir en comparación con las limitantes mostradas por el uso de enzimas nativas, como falta de inmunogenicidad, dificultad para su administración oral, costos menores, entre otros (Lippard 1994).

La manera en que actúa la SOD para eliminar al anión superóxido es a través de una reacción de dismutación a través del catión  $\text{Cu}^{2+}$  presente en el sitio activo de la enzima, el cual presenta una geometría plano cuadrada ligeramente distorsionada, muy similar a la que forman algunos ligantes sintéticos cuando se coordinan con  $\text{Cu}^{2+}$ , siendo esta la causa de que este tipo de complejos metálicos, sean considerados como candidatos para ser evaluados como agentes

biomiméticos de esta enzima. (Lippard 1994). A pesar que cada vez son más los reportes de complejos con potencial como agente biomiméticos, SOD, es importante establecer los mecanismos de cómo es que estos actúan, y si serán estables o no en diferentes condiciones.

Por lo anterior, este trabajo se enfoca en la caracterización termodinámica de la formación del complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  con el ciclofano etiquetado aquí como PD y que se muestra en la Figura. 2, con miras en una posible aplicación como imitador de la superóxido dismutasa, basándose en ciclofanos similares reportados previamente por el grupo de química Supramolecular del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, debido a la similitud de su geometría de coordinación con el sitio activo. Por lo anterior evaluar los parámetros termodinámicos de estos complejos, podría contribuir a un mejor entendimiento y comprensión de cómo actúan estos sistemas. Adicionalmente, el complejo  $\text{Cu}_2\text{PD}$  se caracteriza por presentar dos modos de coordinación distintos, en función del pH; cuando se encuentra a pH ácido el cobre está hexacoordinado con una geometría octaédrica, mientras que, a pH alcalino, la geometría cambia a plano cuadrado como se mostrara más adelante. Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se determinaron los parámetros  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $K_a$  y la estequiometría N del complejo formado por  $\text{Cu}^{2+}$  con el ligante macrocíclico derivado de EDTA, PD, a pH 6.0, 7.4 y 10.0, mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

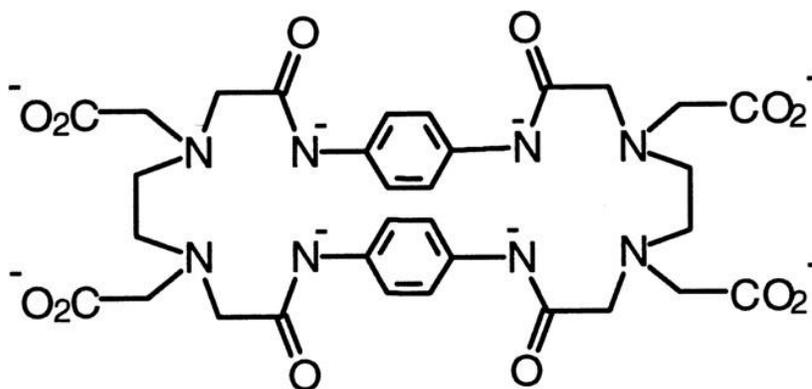


Figura 2. Estructura del ciclofano PD en medio básico (Inoue M. y col. 1998)

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar las propiedades termodinámicas de la formación del complejo  $\text{Cu}_2\text{PD}$ , por medio de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) a valores de pH 6.0, 7.4 y 10.0.

### **Objetivos Particulares**

1. Evaluar el efecto del modo de coordinación del cobre, sobre la estabilidad termodinámica del complejo  $\text{Cu}_2\text{PD}$ .
2. Sintetizar el ciclofano PD por el método reportado por Inoue y Col. (2008), y purificación del mismo por cromatografía por columna.

## ANTECEDENTES

### Compuestos de Coordinación

Los compuestos de coordinación a los que también se les puede denominar complejos metálicos o solamente complejos, contienen un átomo central o ion, usualmente un metal, rodeado por iones o moléculas. Los complejos tienden a retener su conformación aun en solución, a pesar de que puede ocurrir una disociación parcial. Pueden ser especies catiónicas, aniónicas o no iónicas, dependiendo de la suma de las cargas del átomo central y de las moléculas o iones que lo rodean. Estos compuestos de coordinación juegan un papel esencial en la industria química y en la vida. La importancia de los complejos metálicos se vuelve más clara cuando pensamos en la hemoglobina, que es vital para la vida al transportar el oxígeno a las células, donde el grupo hemo es un complejo de hierro (Basolo, 1986, Brown, 2009).

La justificación principal para la clasificación de muchas sustancias como compuestos de coordinación radica en que su química puede describirse convenientemente considerando la existencia de una especie catiónica central, esencialmente constante, alrededor de la cual puede situarse una variedad grande de moléculas o átomos unidos al metal central, llamados ligantes, mediante un número de combinaciones esencialmente ilimitado, en la figura 3 podemos ver un ejemplo. La carga total del complejo resultante, está determinada por la carga del metal y la suma de las cargas de los ligantes. (Cotton 1993).

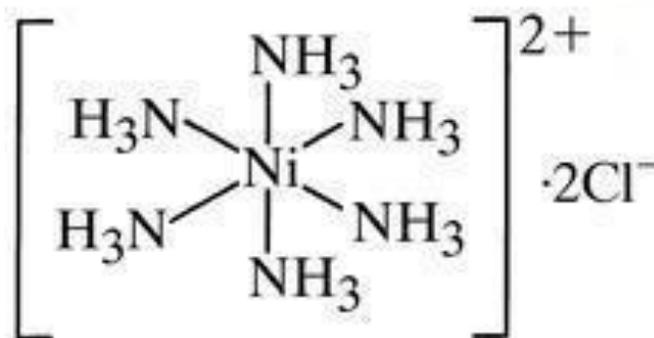


Figura 3. Compuesto de coordinación. Dicloruro de hexaamino niquelato

El número de coordinación lo podemos definir como el número de pares de electrones que acepta un ácido de Lewis (por lo general es un centro metálico), Además de conocer el número de ligantes que rodean a un catión, es importante conocer su disposición espacial o geometría de coordinación. (Basolo, 1986)

Los números de coordinación de los iones metálicos en complejos pueden ir de 2 hasta 9. En general, las diferencias en energía entre diferentes arreglos de ligantes son mayores para complejos con números de coordinación bajos y disminuye conforme el número de coordinación aumenta. Usualmente solo una o dos estructuras son posibles para complejos con número de coordinación bajo, mientras que estructuras equivalentes con varias diferencias energéticas son posibles para complejos con un número de coordinación alto ( $n > 6$ ). Compuestos con un número de coordinación bajo exhiben grandes diferencias en energía entre los diferentes arreglos del ligante. (FQUIM UNAM, 2009)

Los metales de transición forman complejos metálicos, especies poli atómicas en las cuales el ion metálico está unido a uno o más ligantes. Complejos iónicos son complejos metálicos eléctricamente cargados, y un compuesto de coordinación contiene uno o más complejos metálicos. Los números de coordinación dos y tres son comunes para iones metálicos  $d^{10}$ . Complejos tetraédricos y cuadrados planos tienen número de coordinación de 4, complejos trigonal piramidal y cuadrado piramidal tienen número de coordinación de 5, y los complejos octaédricos tienen número de coordinación de 6, al menos tres estructuras se han conocido para el número de coordinación de 7, que es generalmente encontrado solamente en iones metálicos grandes. Número de coordinación de 8 y 9 son también encontrados solamente en iones metálicos grandes, en la Figura 4, podemos apreciar los diferentes acomodos de las geometrías de coordinación (FQUIM UNAM, 2009).

Las interacciones que existen entre el átomo de un metal y los ligantes se pueden ver como reacciones ácido-base de Lewis. Recordemos que una base de Lewis es una sustancia capaz de donar uno o más pares de electrones. Cada ligante tiene al menos un par no compartido de electrones de valencia, por lo tanto, los ligantes funcionan como base de Lewis y por otra parte el átomo de un metal de transición actúa como ácido de Lewis al aceptar y compartir pares de electrones de la base de Lewis, siendo de esta manera que los enlaces metal-ligando casi siempre son enlaces covalentes coordinados (Chang, 2010).

En virtud de que en este trabajo se discutirán estructuras con geometrías plano cuadrada y octaédrica, a continuación, se dará una descripción más detallada de estas dos.

El número de coordinación seis es un número extremadamente importante puesto que casi todos los cationes forman complejos hexacoordinados. Prácticamente todos ellos poseen

una forma geométrica, el octaedro. Resulta esencial reconocer que el octaedro es una figura sumamente simétrica, aun cuando algunas de las maneras estilizadas de dibujarlo puedan no mostrar este hecho de un modo claro. La totalidad de los seis ligantes y todos los enlaces M-L resultan equivalentes en un complejo MLS octaédrico regular. Se describe a los complejos como “octaédricos” aun cuando estén presentes diferentes tipos de ligantes y, por tanto, la simetría completa del verdadero octaedro no se mantenga. Incluso en los casos en que todos los ligantes son químicamente iguales, los octaedros resultan distorsionados con frecuencia, debido a efectos electrónicos inherentes al ion metálico o por fuerzas procedentes de los contornos (Cotton y Wilkinson 2005).

Los complejos cuadrados son muy comunes en el caso de los iones  $\text{Cu}_2$ ,  $\text{Ni}_2$ ,  $\text{Pd}_2$ ,  $\text{Pt}_2$ ,  $\text{Au}_3$  e Ir. Los cationes que, como característica, forman complejos cuadrados son los que poseen ocho electrones d. Estos ocho electrones forman cuatro pares electrónicos que llenan todos los orbitales d excepto el  $\text{dx}^2$ ,  $\text{dy}^2$ . Este orbital junto con los orbitales s, px y py forman una serie de orbitales híbridos  $\text{dsp}^2$ , dirigidos hacia los vértices de un cuadrado (Cotton y Wilkinson 2005).

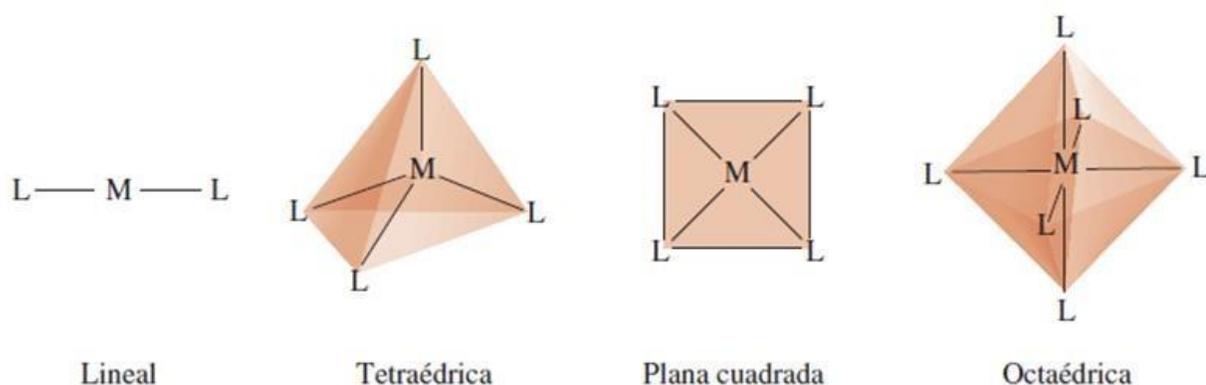


Figura 4. Diferentes tipos de geometría de coordinación. M es el metal y L representa un ligante monodentado (Chang 2010).

## Compuestos Macrocíclicos

Se han logrado sintetizar varios ligantes tipo receptores, entre estos se encuentran los compuestos macrocíclicos de los cuales destacan los calixarenos, las ciclodextrinas y los ciclofanos (Gutsche 2008).

Un calixareno (Figura 5) es un macrociclo u oligómero cíclico basado en el producto de la hidroxialquilación de un fenol y de un aldehído. La palabra calixareno se deriva de calix o chalice por el tipo de molécula que refiere a la base en forma de copa o cáliz y de la palabra areno que refiere al bloque aromático de la molécula. Los calixarenos tienen cavidades hidrofóbicas que pueden retener moléculas pequeñas o iones y pertenece a la clase conocida en la química como huésped-anfitrión (Gutsche 2008).

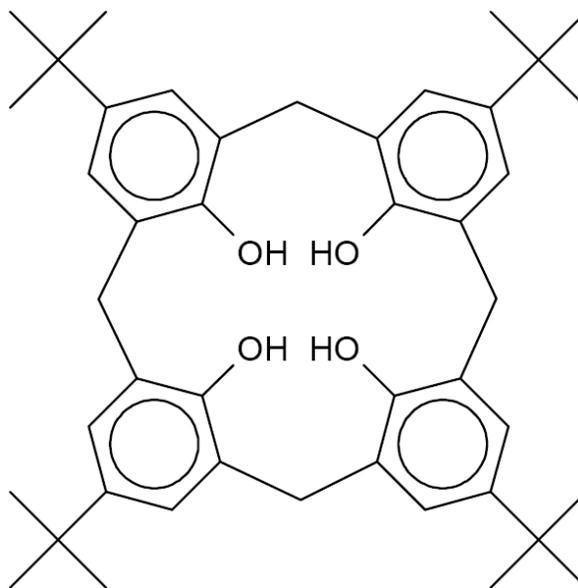


Figura 5. Ejemplo de un receptor tipo calixareno

Los calixarenos se caracterizan por una forma de canasta, taza o contenedor tridimensional. Poseen un ancho borde superior y un borde inferior estrecho y un anillo central, con un fenol como materia de inicio, los 4 grupos hidroxilo son intra anular en el borde inferior. Existen en diferentes conformaciones químicas debido a la fácil rotación alrededor del puente de metileno. (Gutsche 2008). Los 4 grupos hidroxilo interactúan por puentes de hidrogeno y estabilizan la conformación de cono. (McMahon 2003)

Las ciclodextrinas (Figura 6), son una familia de compuestos formados por moléculas de glucosa unidas en forma de anillo (oligosacáridos cíclicos). Se producen a partir de almidón por medio de conversión enzimática. A veces también son llamadas cicloamilos. Se utilizan en alimentos, productos farmacéuticos, sistemas de administración de fármacos y las industrias químicas, así como la agricultura y la ingeniería ambiental. Las ciclodextrinas se componen de 5 o más unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosido. Típicamente contienen un número de monómeros de glucosa que van de seis a ocho unidades en un anillo, creando una forma de cono. (Becket 1999)

Las ciclodextrinas pueden ser topológicamente representadas como toroides, con las aberturas más grandes y pequeñas expuestas al grupo hidroxilo secundario y primario respectivamente, esto en el disolvente. Debido a esta disposición, el interior de los toroides no es hidrofóbica, pero es considerablemente menos hidrofílica que el medio acuoso y por lo tanto capaz de albergar otras moléculas hidrofóbicas. (Thatiparti 2010)

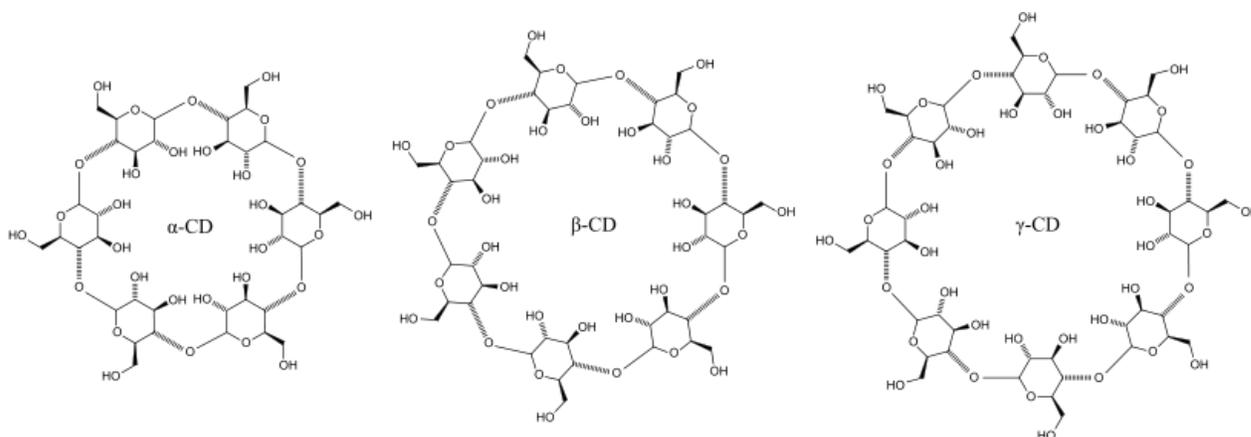


Figura 6. Estructura de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas

Los éter corona son compuestos químico cíclico cuya estructura consiste de un anillo que contiene varios grupos éter. Se ligan fuertemente con ciertos cationes, como los del grupo de los metales alcalinos y alcalinotérreos, formando complejos químicos. Los átomos de oxígeno se encuentran bien situados para coordinar con un catión ubicado en el interior de un anillo, mientras que el exterior es hidrofóbico. Los cationes resultantes a menudo forman sales que son solubles en solventes no polares, y por esta razón los éteres corona son útiles en la catálisis de transferencia de fase (Pedersen, C. J. 1967, Suzuki, 1995)

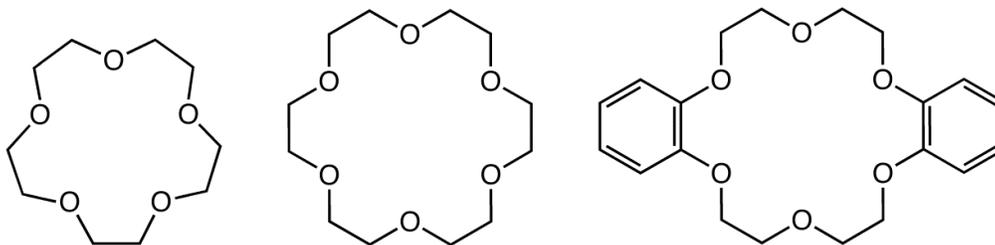


Figura 7. Ejemplos de estructuras de éteres corona

### Ciclofanos

Los ciclofanos (Figura 8) son moléculas orgánicas ramificadas que contienen anillo(s) aromáticos, así como unidades alifáticas. El anillo aromático provee rigidez a la estructura, mientras que la parte alifática forma “puentes” entre los anillos proveyendo flexibilidad a la estructura general (Kotha, 2015).

Se puede dividir a los ciclofanos en pequeños y grandes. En este trabajo nos enfocaremos en los ciclofanos grandes, que son compuestos macrocíclicos que contienen más de un anillo aromático, con el propósito de ampliar la molécula para que tenga la capacidad de capturar otra molécula pequeña o ion en la cavidad. En general esta molécula o ion es llamada, huésped, y la molécula que la captura es llamada anfitrión (Kotha, 2015).

Éstas moléculas están naturalmente equipadas con una fuerza de atracción débil llamada fuerzas de van der Waals en su superficie, los gases se condensan en líquidos, los líquidos en sólidos por enfriamiento, debido a esta fuerza que atrae a las moléculas entre ellas. Una molécula lineal puede ser muy flexible como una cuerda y atraerse entre sí, pero el movimiento provocado por esta misma flexibilidad es limitado en una molécula cíclica, que provee un espacio agradable para la molécula huésped (Cram, 1997).

Los ciclofanos juegan un papel central en la actual línea de la química del huésped-anfitrión debido a las siguientes características:

1. Los electrones pi en la superficie del anillo aromático tiende a atraer a iones y moléculas cargados positivamente.
2. Ya que los anillos aromáticos son planos y no muy flexibles, son los que confieren la rigidez a la estructura macrocíclica
3. La síntesis es relativamente fácil, así como los métodos para diseñar estructuras con anillos aromáticos están bien establecidas.

4. Además, se pueden introducir grupos funcionales en el esqueleto macrocíclico de manera que se les puede conferir solubilidad en medios acuosos.

Los ciclofanos deben cumplir ciertas características que les confieran estabilidad dentro de condiciones fisiológicas normales, como lo son la estabilidad termodinámica, química y metabólica, ya que de no ser así pueden ser ineficaces, o peor aún, ser potencialmente dañinos. Para lograr que un ciclofano adquiriera solubilidad en agua se introducen cierto número de grupos cargados ya sea en el borde de la cavidad o más cercanos a los sitios de enlace. Otra característica de los ciclofanos es que pueden manejarse en disolventes orgánicos como receptores de compuestos orgánicos o iones metálicos (Diederich, 1991).

Se considera que son el centro de los receptores artificiales pues tienen una gran capacidad de complejación hacia sustratos de diferente naturaleza: compuestos orgánicos e inorgánicos, en forma de cationes o aniones e inclusive moléculas neutras (Easton, 1999).

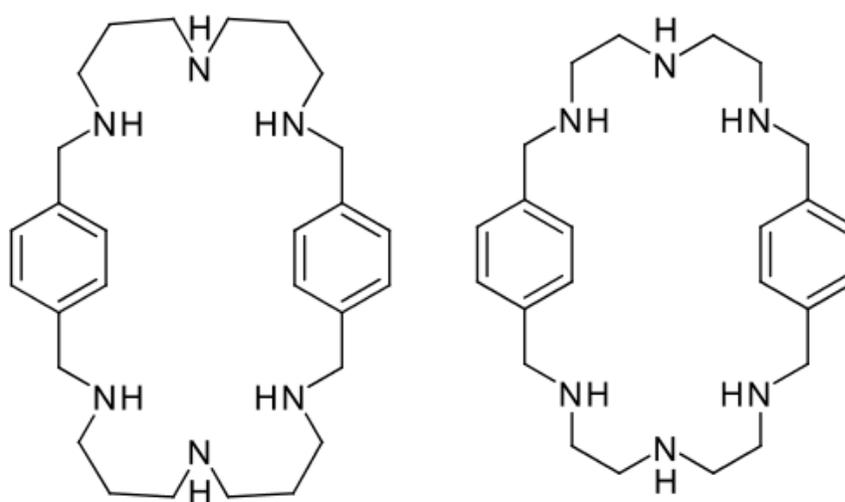


Figura 8. Ciclofanos

Algunas de las aplicaciones de los ciclofanos como receptores artificiales son: emplear con ellos nuevas técnicas de separación, síntesis de nuevos polímeros con propiedades electro-ópticas, proporcionar nuevas herramientas para el mapeo del genoma humano, profundizar en investigaciones del plegamiento de las proteínas así como en el transporte de moléculas en el cuerpo humano, ejemplo de esto último lo son los ciclofanos bis-piridina que tienen la capacidad

de atravesar la barrera hematoencefalica como un transportador de colina. (Lindoy L. 1989, Zhenfa 2012, Fernandes 2007).

Actualmente las investigaciones científicas relacionadas con la salud se han centrado en experimentar con más detalle las moléculas que poseen potencial actividad biomimética. Imitar lo que ocurre en la naturaleza incrementa las posibilidades de que estos sistemas sean efectivos. Entre las principales enzimas para las cuales se han presentado avances en el diseño de análogos sintéticos son la superóxido dismutasa (SOD) y las peroxidasas (POx) que representan la primera línea de defensa del organismo contra el estrés oxidativo (Szilágyi y col. 2005). Como se describirá más adelante, se han reportado ciclofanos similares al ciclofano PD que se presenta en esta tesis como biomiméticos de estas enzimas (Salazar-Medina 2013, Sugich-Miranda 2010, Fernandes 2007), debido a la similitud de su geometría de coordinación con el sitio activo.

### **Sistemas Modelo**

Un modelo enzimático es una molécula orgánica sintética que posee una o más características presentes en un sistema enzimático. Una ventaja muy notable del uso de estructuras artificiales es la posibilidad de manipular el compuesto de tal modo que permita el estudio de una propiedad específica.

La capacidad de imitar el comportamiento del sitio activo de una enzima utilizando materiales catalizadores sintéticos es altamente deseable (Agentes biomiméticos). (Breslow, 1972). Una enzima para la cual se han desarrollado sistemas modelos sintéticos es precisamente la SOD, por lo que a continuación se describirán detalles relacionados con su función y estructura,

### **Superóxido Dismutasa**

La SOD (Figura 9) constituye la primera línea de defensa del cuerpo humano contra el anión superóxido ( $O_2^-$ ) generado como parte del estrés oxidativo natural (McCord y Fridovich, 1969).

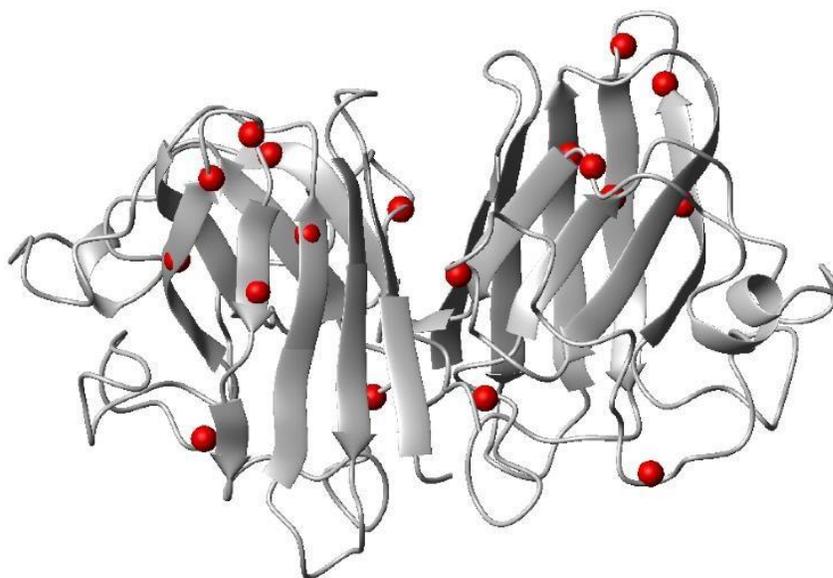
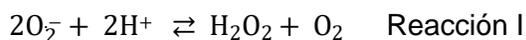
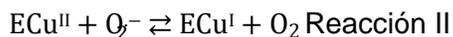


Figura 9. Superóxido Dismutasa (Banci y Col. 2008)

Lo anterior, así como la caracterización del sitio activo en su estructura, la hacen una fuente de investigación científica en búsqueda de análogos funcionales naturales o sintéticos que lleven a cabo la reacción de dismutación (Muller, 2006, Elchuri, 2005) del anión superóxido.



La forma Cu/Zn-SOD contiene un átomo de Cu y uno de Zn en su sitio activo, para la cual se estableció un mecanismo catalítico conformado por dos pasos:



Como se puede ver en la reacción (Ecuaciones II y III), el cobre cambia entre sus dos estados de oxidación más comunes; se genera peróxido de hidrógeno (sustancia potencialmente dañina) que posteriormente es degradada por otra metaloenzima, catalasa. Ambas conforman parte importante del sistema protector de los organismos cuyo metabolismo utiliza  $\text{O}_2$ .

## Parámetros Termodinámicos y su Interpretación

Un compuesto de coordinación o complejo, bien puede ser definido como un sistema supramolecular, en el cual la constante de afinidad ( $K_a$ ) es uno de los parámetros más importantes que se debe conocer. Esta constante indica la magnitud de la fuerza que une a un complejo supramolecular, por lo cual nos da una idea clara de la estabilidad de este. A partir de este valor es posible calcular la energía libre de Gibbs que a su vez da información clara acerca de la espontaneidad del sistema.

Los parámetros termodinámicos entalpía ( $\Delta H$ ), entropía ( $\Delta S$ ) y energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) nos dan la primera línea de entendimiento para cualquier sistema (Atkins 2006). Con la obtención de los parámetros termodinámicos  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$  es posible conocer si el sistema liberó o absorbió calor, o bien, podría darnos una idea de si durante el proceso se presentó el efecto hidrofóbico/solvatófóbico, de donde finalmente es posible determinar el parámetro termodinámico que dirige a dicha reacción. Para comprender mejor las caracterizaciones termodinámicas es necesario comprender un poco más detalladamente sus componentes.

### Entalpía

La entalpía es una función de estado que se representa en la Ecuación (1):

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

Esta fórmula la podemos traducir al cambio entre el estado inicial ( $H_i$ ) y el final ( $H_f$ ),  $\Delta H$  queda de la siguiente forma:

$$\Delta H = H_i - H_f \quad (2)$$

A presión constante la entalpía es igual al calor  $q$  que involucra el sistema y se describe de la siguiente forma:

$$\Delta H = q_p \quad (3)$$

En donde  $q_p$  es el calor a presión constante.

Por medio de la entalpia se determina si una reacción es exotérmica o endotérmica. Cuando la reacción es exotérmica, la entalpia es menor que cero y se considera como favorable para la reacción mientras que cuando absorbe calor, siendo endotérmica, con valor de entalpia positivo, se considera como una reacción desfavorable, esto con base en la primera Ley de la Termodinámica (Atkins 2006).

## Entropía

El cambio entropía ( $\Delta S$ ) es el grado de irreversibilidad que se alcanza después de un proceso dado en el que haya conversión de energía, o bien, se relaciona con la tendencia que tiene un sistema hacia el desorden. La entropía es una medida de la energía no disponible en un sistema; mientras mayor es la entropía de un sistema, menos disponible está la energía de ese sistema para efectuar trabajo o para transferir calor.

Dicho esto, significa que las especies desordenadas deben ser más probables que las ordenadas considerando como universo el sistema total, en el cual, si bien la mayoría de las especies se encuentran en desorden, no quiere decir que no puedan existir algunas especies que posean arreglos casi perfectos, pero el desorden total o neto del sistema tiende al máximo y esto se refleja en una entropía del universo mayor de cero.

El cálculo de entropía para procesos reversibles puede definirse por la siguiente ecuación:

$$\Delta S = \Delta q_{\text{rev}}/T \quad (4)$$

Los procesos reversibles son aquellos que hacen evolucionar a un sistema termodinámico desde un estado de equilibrio inicial a otro nuevo estado de equilibrio final a través de infinitos estados de equilibrio.

De una manera simplificada, se puede decir que un proceso reversible es aquel proceso que, después de ser llevado de un estado inicial a uno final, puede retomar sus propiedades originales. Sin embargo, hay que considerar que ningún proceso natural puede ser considerado reversible totalmente. Para procesos irreversibles o máquinas térmicas irreversibles, en todos los casos el cambio de entropía será positivo. Entonces, es claro que el cambio de entropía es un buen indicador de que un proceso sea o no reversible. Con la ecuación anterior podemos decir, que la entropía será igual al calor reversible añadido al sistema, entre el valor de temperatura al que se encuentra el mismo. Para interpretar de una mejor manera el término entrópico es: cuando se obtiene un valor positivo, significa que durante el proceso hubo una ganancia entrópica y el

desorden del sistema es mayor lo cual es favorable. En caso contrario, se dice que hay pérdida de entropía y que el sistema fue capaz de alcanzar un arreglo más ordenado, lo cual es desfavorable para la estabilidad de un sistema.

### **Energía libre de Gibbs**

La energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) es un término termodinámico que se caracteriza por dar la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción a presión y temperatura constantes. Dependiendo del valor y del signo del  $\Delta G$  de una reacción, se podrá establecer si un proceso es espontáneo o no, o bien si se encuentra en equilibrio. De acuerdo con esto un  $\Delta G < 0$  indica un proceso es espontáneo (favorable) mientras que un  $\Delta G > 0$  es desfavorable para una reacción. Cuando  $\Delta G = 0$  se dice que un sistema se encuentra en equilibrio, por lo tanto, no hay cambio. La energía libre de Gibbs es directamente proporcional a la magnitud de la constante de afinidad ( $K_a$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (5)$$

En donde R representa la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

La ecuación (5) concuerda con los términos de equilibrio y espontaneidad mencionados anteriormente, ya que, si el valor de  $K_a$  de un sistema es muy alto, quiere decir que el sistema es muy afín y por lo tanto espontáneo. Por otro lado, de acuerdo al producto de esta ecuación el resultado de un valor alto de  $K_a$  arrojaría un valor de  $\Delta G$  muy negativo y en consecuencia muy favorable lo cual es concordante por ambas explicaciones.

Podemos comprender mejor  $\Delta G$  con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

De acuerdo a la ecuación (6)  $\Delta G$  depende directamente de los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$ , si el valor en la entalpía es negativo y positivo en la entropía, será favorable e ideal para una reacción y el proceso es dirigido tanto entálpica como entrópicamente si los valores absolutos de los mismos son muy parecidos. Cuando los dos términos son favorables, pero uno de ellos es mucho más favorable que el otro, se dice que el parámetro que dirige la reacción, es el que posee el valor absoluto más alto. En algunos casos, la energía libre de Gibbs es favorable, pero uno de los dos parámetros involucrados en la ecuación es desfavorable (entalpía positiva o entropía

negativa). Cuando el signo negativo de  $\Delta G$  se debe al valor de  $\Delta H$ , se dice que el proceso es dirigido entálpicamente; de lo contrario, si el signo negativo se debe al término  $T\Delta S$ , se dice que es dirigido entrópicamente (Maron y col, 1982, Moran 2004).

La determinación de constantes de afinidad en el reconocimiento molecular, nos proporciona directamente la estabilidad para el complejo resultante. Se basa principalmente en el número de interacciones intermoleculares y su tipo que se presentan en el mismo. A mayor resultado en el valor de  $K_a$ , mayor afinidad entre los dos compuestos relacionados (Anfitrión - Huésped).

Los receptores artificiales se comportan de diferente manera de acuerdo a las condiciones en que se encuentren (presencia de metales, protones, medio alcalino, temperatura, entre otros). A partir de estas variaciones se establecen las condiciones óptimas de reconocimiento molecular, determinando las constantes de afinidad (asociación o disociación).

De manera muy general, para la determinación de  $K_a$ , debe de existir un sistema de equilibrio común, como se indica en la Ecuación (7), de la cual se obtiene  $K_a$  mediante la Ecuación (8).



$$K_a = \frac{[HR]}{[R][H]} \quad (8)$$

$$[R]_0 = [R] + [HR] \quad (9)$$

$$[H]_0 = [H] + [HR] \quad (10)$$

R: Receptor; H: Huésped; RH: Complejo (R-H)

$[R]_0$ : Concentración inicial del receptor.

$[H]_0$ : Concentración inicial del huésped.

[R], [H], [RH]: Concentración del receptor, huésped y el complejo respectivamente.

La ecuación 11 se obtiene despejando [R] y [H] de las Ecuaciones (9) y (10) y sustituyendo en la Ecuación (8).

$$K_a = \frac{[HR]}{([R]_0 - [HR]) ([H]_0 - [HR])} \quad (11)$$

$K_a$ : Constante de afinidad

$[R]_0$ ,  $[H]_0$ : Variables que pueden ser tomadas como condiciones iniciales.

[R], [H], [HR]: Variables dependientes en el equilibrio.

De la ecuación (11) podemos determinar  $K_a$  a las condiciones experimentales:  $[R]_0$  y  $[H]_0$ .  
[HR] es obtenida en el equilibrio.

## Titulación por Calorimetría Isotérmica

La titulación por calorimetría isotérmica (ITC) es actualmente usada de manera rutinaria para caracterizar la termodinámica de las interacciones de biopolímeros y las cinéticas de reacción catalizadas enzimáticamente. Una diferencia del calor inicial y el calor final medido por el equipo en el sistema, ya sea agregado o disminuido, es equivalente al utilizado o liberado por la reacción (Lewis y Freyer, 2008).

La técnica por ITC nos da las piezas fundamentales para comprender una reacción como lo es la constante de equilibrio de reacción  $K_a$  y la estequiometría de unión, es decir el número de ligantes que hay al momento de la saturación, a la misma vez permita conocer la entalpía ( $\Delta H$ ) y la entropía ( $\Delta S$ ) (Lewis y Freyer, 2008).

El éxito de la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se basa en dos aspectos prácticos: (1) cualquier interacción receptor – sustrato libera o absorbe calor; (2) permite la determinación simultánea en un solo experimento de los cambios de energía libre ( $\Delta G$ ), entalpía ( $\Delta H$ ), entropía ( $\Delta S$ ), la constante de asociación ( $K_a$ ) y la estequiometría ( $n$ ) del complejo receptor–sustrato. (Schmidtchen, 2007).

El calorímetro trabaja a temperatura y presión constante por lo que con esta técnica podemos obtener directamente la entalpía, el calor liberado o absorbido es proporcional a la afinidad de la interacción y se manifiesta en la intensidad de la señal de calor que depende específicamente de  $\Delta H$  del complejo formado. Por otra parte, la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de la formación del complejo puede calcularse de acuerdo a la ecuación (5).

A partir de estos datos también es posible determinar el  $\Delta S$  del proceso, despejando  $\Delta S$  de la ecuación (6). De esta manera tan sencilla se obtiene una caracterización termodinámica completa en una sola reacción, es necesario mencionar que cuando los procesos son dirigidos entrópicamente pueden no ser detectados por el equipo si no son lo suficientemente endotérmicos. (Castellan, 1998)

El valor de la constante de asociación (o afinidad de la unión),  $K_a$  gobierna el equilibrio, es decir, la partición entre las diferentes especies (libres y asociadas). El cambio en la composición del sistema dentro de la celda de reacción del instrumento, después de cada inyección del sustrato, desplaza el equilibrio y el reacomodo de la población dando lugar a la formación del complejo. El sistema pasará por diferentes estados de equilibrio, difiriendo en su composición según como proceda la secuencia de las inyecciones. El calor asociado a cada inyección es proporcional al incremento de concentración del complejo (avance de la reacción) y se calcula integrando el área debajo de la señal medida (equivalente a la cantidad de calor provista para

mantener la misma temperatura en la celda de referencia y en la de muestra, por unidad de tiempo) (Schmidtchen, 2007).

### Obtención de $K_a$ en la técnica de ITC

Durante la titulación se obtienen las señales correspondientes al calor liberado o absorbido de la interacción y la integración de las mismas se grafican contra la relación molar del compuesto inyectante, dando como resultado una curva de forma característica. En el caso de la Figura 10 la apariencia de la curva de titulación es sigmoïdal, de la cual pueden obtenerse los valores de entalpía molar ( $\Delta H$ ), estequiometría ( $n$ ) y la constante de afinidad ( $K_a$ ). El  $\Delta H$  se obtiene midiendo la altura de la curva sobre el eje "y" (indica las cal mol<sup>-1</sup>). Por otro lado, la estequiometria ( $n$ ) la proporciona el valor que indica el punto de inflexión sobre el eje "x" (relación molar). Finalmente, la constante de asociación ( $K_a$ ) se obtiene directamente con el valor de la pendiente en el punto de inflexión de la curva (Schmidtchen F. 2007). En los casos en donde la curva de titulación no posee una forma sigmoïdal, los valores ya mencionados se obtienen mediante un programa de ajuste de valores automático (ORIGIN Versión 7.0 de MicroCal Inc) el cual utiliza modelos matemáticos para dicha obtención.

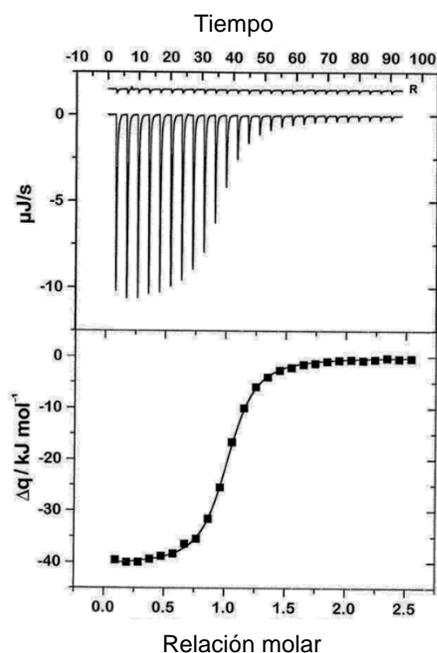


Figura 10. Ejemplo de termograma obtenido por ITC

**Valor de c.** La obtención de datos de buena calidad depende de una correcta selección de las concentraciones de receptor y el sustrato, para lo cual es importante conocer el valor de c, que es una constante adimensional conocida como parámetro de Wiseman.

El valor de c se obtiene multiplicando el valor de la constante de asociación ( $K_a$ ) por la concentración molar (M) del receptor y la estequiometría (n) de la interacción como se muestra en la Ecuación (12).

$$C = (K_a)(M)(n) \quad (12)$$

En general el valor de c debe ubicarse en el rango 10 – 500, con lo cual se logra obtener una curva de titulación claramente sigmoidea (Figura 10), que es lo más recomendable para el cálculo de  $\Delta H$ ,  $K_a$  y n. Estos valores de c restringen el uso de esta técnica para sistemas de alta afinidad ( $K_a > 10\,000\text{ M}^{-1}$ ). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible estudiar sistemas de baja afinidad mediante ITC si se cumple con lo siguiente (Bruce W. 2003):

- Una fracción suficientemente grande de la isoterma es utilizada para el análisis.
- La estequiometría de enlace es conocida.
- Se conocen con exactitud las concentraciones de receptor y huésped.
- El nivel de relación señal/ruido de los datos es adecuado.

## Instrumento

Cuando se trata de medir calores sumamente pequeños es necesario emplear calorímetros muy sensibles, los cuales se denominan microcalorímetros. El prefijo micro se refiere a la cantidad de calor y no a las dimensiones físicas del instrumento, incluso algunos equipos son de gran tamaño (Laidler, 1997). Existen microcalorímetros que detectan un mínimo de calor de 0.5 ncal (Schmidtchen y Franz, 2007).

Los calorímetros más modernos pueden operar con volúmenes de muestra muy pequeños, y a su vez detecta calores de reacción muy pequeños por lo que esta técnica es cada vez más utilizada para determinar constantes de asociación. En ITC, existen dos principios para determinar el calor de una interacción. El primero es mediante un calorímetro de elevada capacidad calorífica basado en la conducción de calor y el segundo funciona por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático.

Para este trabajo de investigación se utilizó un microcalorímetro adiabático, este posee una celda de referencia y una celda experimental. Durante el experimento, una pequeña potencia constante, inferior a un milivatio, se disipa en la termolamina de la celda de referencia y activa el sistema de compensación que iguala las temperaturas de las dos celdas y produce la línea base experimental. Un efecto exotérmico o endotérmico, producto de la interacción receptor – sustrato, modifica transitoriamente la potencia de compensación de calor y se produce un pico característico sobre la línea base de cuya integración se extrae el calor involucrado en el sistema.

Una de las partes más importantes del instrumento es el subsistema de inyección – agitación, ya que de esto dependen la exactitud de los volúmenes de inyección de las alícuotas y la homogenización de la mezcla de reacción, así como el nivel de ruido en los resultados. La jeringa de inyección es de vidrio, de alta precisión, con volúmenes entre 250 y 500  $\mu\text{L}$ , provistas de largas agujas de acero inoxidable y en su extremo posee una paleta para la agitación.

Una vez montadas las soluciones en celda y jeringa, todos los parámetros se programan a través del software de manera que es relativamente sencillo obtener la caracterización termodinámica de un sistema receptor-huésped.



Figura 11. Microcalorimetro Microcal VP-ITC

## DISEÑO EXPERIMENTAL

De acuerdo con lo reportado (Inoue y col. 2001), a pH alcalino el complejo ciclofano CuPD presenta una geometría de coordinación plano cuadrado (Figura 13); por otra parte, el sitio activo de la SOD es un plano cuadrado ligeramente distorsionado como se puede observar en la Figura 12, esta similitud nos permite divisar un posible uso como biomimético de esta enzima.

Ciclofanos similares a este que también presentan la misma geometría de coordinación ya han sido reportados con capacidad biomimética y un potencial antioxidante importante. Estos ciclofanos son los reportados por Sugich-Miranda en el 2010 (Sugich-Miranda 2010). Se puede observar en la Figura 14 como la estructura reportada para valores de pH ácido muestra una geometría de coordinación octaédrica, mientras que al encontrarse en una solución de carácter básico. Esta forma una geometría de coordinación del tipo cuadrado plana muy similar a la coordinación de la enzima CuZnSOD.

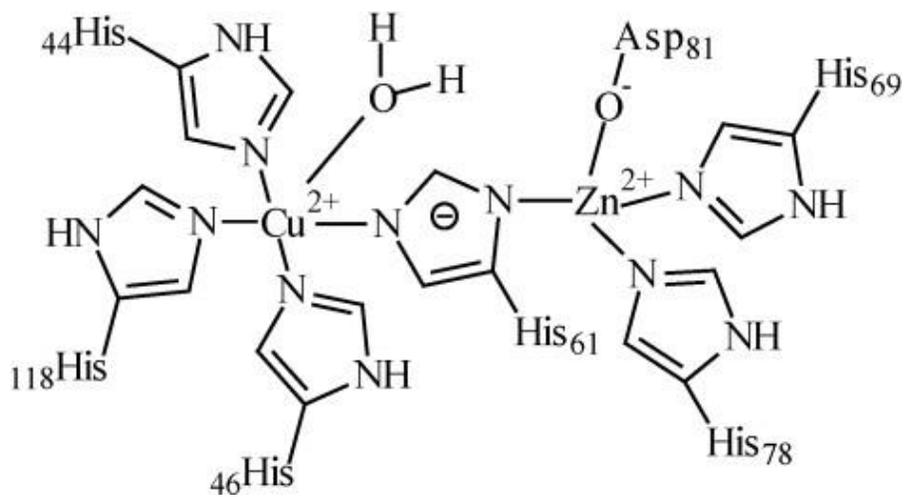


Figura 12. Estructura del Sitio Activo de la CuZnSOD (I. Szilágyi 2005).

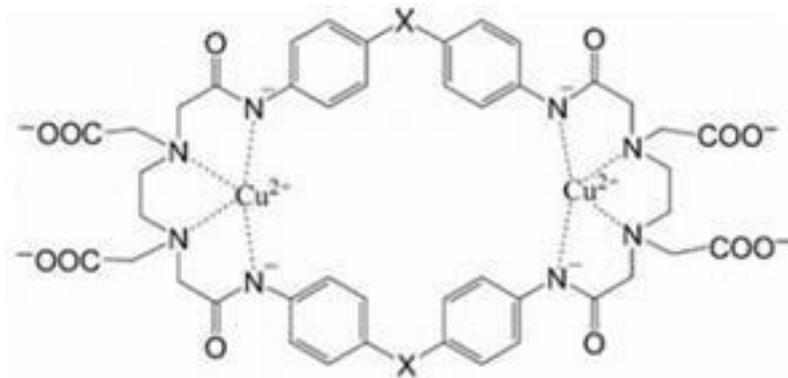


Figura 13. Ciclofano PO: X=-O- PC: X=-CH<sub>2</sub>-. En solución básica. (Sugich-Miranda 2010)

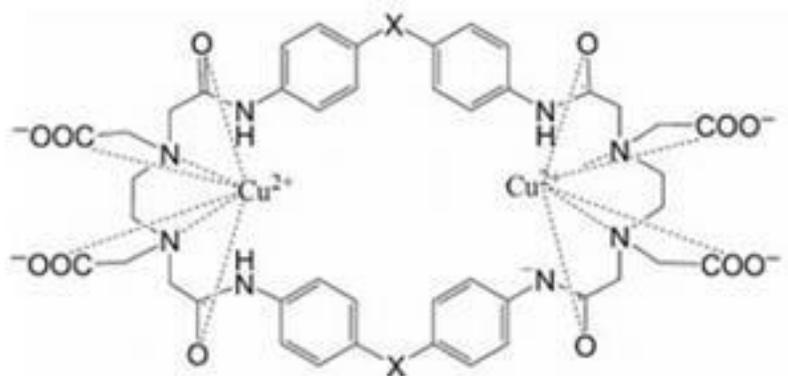


Figura 14. Ciclofano PO: X=-O- PC: X=-CH<sub>2</sub>- en solución ácida. (Sugich-Miranda 2010)

En la Figura 15 se pueden observar los resultados obtenidos para las pruebas de capacidad antioxidante de los ciclofanos derivados de EDTA, PO y PC (gráfica de barras). Basados en los resultados, estos ciclofanos en complejo con cobre muestran una capacidad antioxidante comparable a la del ácido ascórbico, así mismo, la capacidad antioxidante es menos a la de flavonoides y las vitaminas C y E (Sugich-Miranda 2010).

Mientras que para los resultados de la capacidad biomimética (gráfica de dispersión), el ciclofano del tipo PO mostro una actividad similar muy significativa a la SOD mientras que el ciclofano PC mostro actividad muy similar a los ciclofanos reportados por Fernandes A. en el 2007 (Sugich-Miranda 2010).

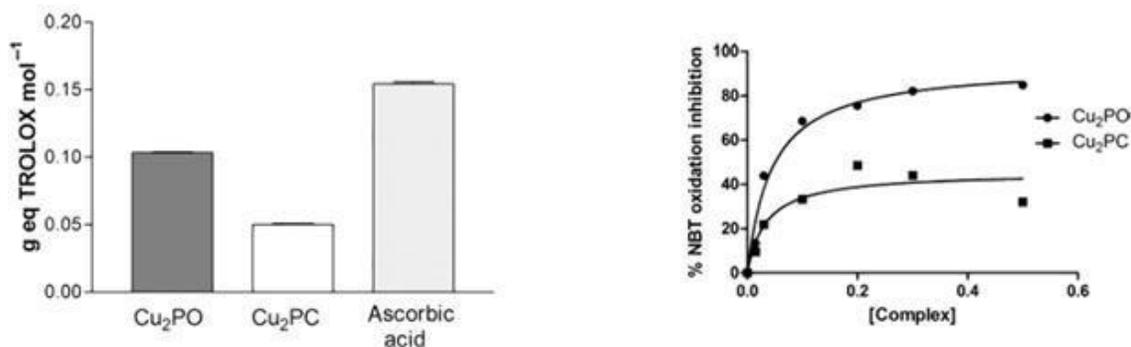


Figura 15. Resultados de la prueba antioxidante TEAC (grafica de barras) y la prueba para demostrar actividad biomimetica, NBT (grafica dispersión) (Sugich-Miranda 2010).

### Valores de pH

La banda de transición  $\delta\text{-}\delta^*$  inusual en todos los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ ciclofano estudiados se observó solamente en el rango de pH donde  $[\text{Cu}_2(\text{LH}_4)]^{4+}$ , en donde las especies del tipo II mostrado en la Figura 16 se formaron al coordinarse los nitrógenos desprotonados de las amidas con el cobre. Mientras tanto a medida que el pH disminuye los átomos de cobre se coordina con los dos oxígenos del carboxilato, dos nitrógenos de las aminas y dos oxígenos de las amidas, resultando una especie del tipo I, todo esto basado en la Figura 17, que es el espectro electrónico de una solución de ligante PD.

Con base en lo reportado por Inoue y colaboradores (1998), para este trabajo se eligieron tres valores de pH; 6.00, 7.40 y 10.00 debido a las diferentes especies que presenta este ciclofano, el valor de pH 6.00 se eligió debido a que aquí el ciclofano presenta una geometría de coordinación de tipo octaédrica (Figura 16, I), mientras que a valor de pH 10.00 la geometría de coordinación es completamente plano cuadrada (Figura 16, II). El valor de pH 7.40 se eligió debido a la aplicación que se le planea dar en un futuro como antioxidante, para que pueda funcionar de esta manera tiene que ser estable y se tiene que tener conocimiento de las características que se presentan en este pH, se sabe que a este pH hay una mezcla de geometrías octaédrica y plano cuadrado, de ahí la importancia de analizar las características termodinámicas cuando coexisten.

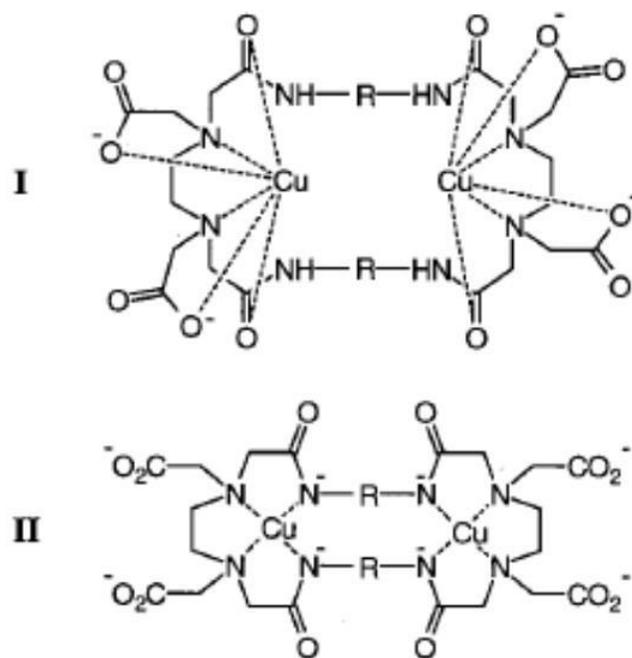


Figura 16. Modelos propuestos para las geometrías de coordinación del ciclofano PD (Inoue y Col. 1998).

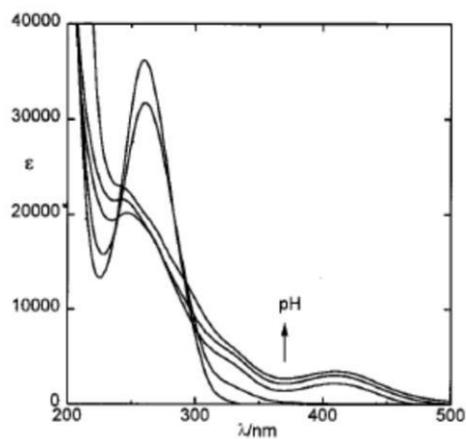


Figura 17. Espectro electrónico de una solución del ciclofano EDTA PD a valores de pH; 4.8, 6.2, 7.5, 9.2 y 12.2. (Inoue y Col. 1998)

## Buffers

Para la elección de los buffers se tomó en cuenta la revisión bibliográfica presentada por Ferreira y colaboradores (2015). con la intención de evitar en la medida de lo posible, la interacción de los iones metálicos con las moléculas de la solución amortiguadora como se muestra en la Figura 18.

Group	2		6	7	8	9	10	11	12	14		
Type	Alkaline earth metal		Transition metal									
Buffer	Mg(II)	Ca(II)	Cr(III)	Mn(II)	Fe(III)	Co(II)	Ni(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)	Final <sup>a</sup>
MES												(+)
Bis-Tris												(-)
ADA												(-)
ACES												(-)
PIPES												(+)
MOPSO												(+)
BTP												(-)
BES												(-)
MOPS												(+)
TES												(-)
HEPES												(+)
DIPSO												(-)
MOBS												(+)
TAPSO												(-)
Tris												(-)
HEPPSO												(+)
POPSO												(+)
TEA												(-)
EPPS												(+)
Tricine												(-)
Bicine												(-)
HEPBS												(+)
TAPS												(-)
AMPD												(-)
TABS												(-)
AMPPO												(-)
CHES												(+)
CAPSO												(+)
AMP												(-)
CAPS												(+)
CABS												(+)

Figura 18: Tabla de interacción de buffers con metales. (Ferreira, 2015)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El ligante EDTA PD se obtuvo de acuerdo al método reportado por Inoue y colaboradores por lo que su síntesis no será descrita en este trabajo (B. Inoue et al., 2001). Los reactivos para las mediciones analíticas, se utilizaron tal y como fueron adquiridas de fábrica.

Buffer MES marca Sigma-Aldrich

Buffer POPSO marca Sigma-Aldrich

Buffer CAPSO marca Sigma-Aldrich

Cloruro de cobre,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Hidróxido de sodio, lentejas, NaOH

Ligante EDTA PD (sintetizados en el laboratorio del DIPM)

Ácido Clorhídrico marca Sigma-Aldrich

Filtros para jeringas Acrodisc®, diámetro de 25mm y porosidad 0.45 $\mu\text{m}$  marca Sigma-Aldrich

Silica gel, poro de 60 A y tamaño de partícula de 230-400 mesh marca Sigma-Aldrich

### Equipo

Microcalorímetro MicroCal VP-ITC

Balanza analítica, Explorer OHAUS

Potenciómetro, THERMO SCIENTIFIC. Orion Dual Star pH/ISE

### Métodos

#### Síntesis y purificación del ligante

El método de síntesis corresponde al de alta dilución reportado por Inoue y cols. (1998). Sin embargo, se modificó el método de purificación, que fue por cromatografía en columna. Para esto se hizo pasar una solución acuosa de la sal de litio del ligante a través de una fase estacionaria de silica gel utilizando mezclas de etanol:agua como fase móvil (75:25)

#### Preparación de soluciones de buffers

Se prepararon soluciones buffers, MES (pH=6.0), POPSO (pH=7.4) y CAPSO (pH=10.0) respectivamente a una concentración de 0.1 M y se ajustó el pH con NaOH 0.5 M y HCl 0.5 M.

Una vez ajustado el pH de cada buffer, éstas se filtraron para eliminar posibles residuos de polvo o pelusa.

### Preparación de soluciones de cobre

Es importante tener en cuenta que la solución de cloruro de cobre debe ser valorada para conocer la concentración real. Se realizó una curva de calibración por UV-Vis usando como referencia una dilución de una solución estándar de cloruro de cobre.

### Preparación de soluciones de ligantes

De igual manera, se prepararon soluciones stock del ligante PD en agua, de las cuales, se hicieron las diluciones apropiadas con las soluciones buffers.

Una vez listas las soluciones, éstas se llevaron a desgasificar lo cual consiste en poner en agitación y a vacío para remover el oxígeno presente o burbujas de aire por aproximadamente 20 minutos. Después, se procedió a llenar la celda de referencia del microcalorímetro con el buffer correspondiente al pH evaluado. La celda de reacción se llenó con la solución de ligante EDTA PD (1.45 mL), mientras que la jeringa llena con 250 $\mu$ L de solución de cloruro de cobre, el cual será inyectado a la celda de reacción en alícuotas de 10 $\mu$ L. En la Figura 19 se muestra un esquema de lo que está compuesto un calorímetro. Una vez terminado el experimento los datos fueron analizados con el software Origin Pro Versión 2016.

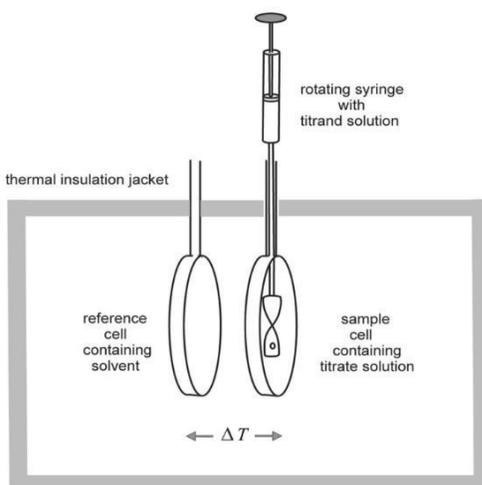


Figura 19: Modelo esquemático de un microcalorímetro (Lewis y Freyer, 2008)

### **Método de Job**

Para determinar con mayor precisión la estequiometría de los complejos, se usó el método de variación continua conocido como gráfica de Job. La determinación de la estequiometría se basa en la medición por alguna técnica (en este caso, espectroscopia visible) de la formación del complejo en diversas combinaciones de fracciones molares de los reactivos (Ligante y metal). Para llevarlo a cabo se prepararon diferentes combinaciones de ligante y metal, manteniendo siempre constante la cantidad total de la mezcla. Los resultados de absorbancia de cada solución se grafican contra fracción molar. El punto más alto de la gráfica corresponderá al punto estequiométrico del complejo. (Huang 1982).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se logró obtener el ligante PD en forma pura, por el método de cromatografía por columna con un rendimiento del 10%, similar al reportado por Inoue y cols. (1998).

Para una adecuada discusión de resultados, cabe recordar que la geometría de coordinación del complejo es dependiente del pH. A  $\text{pH} < 7$  el quelato metálico resultante puede asumir una geometría tipo octaédrica, en la cual el átomo de Cu está coordinado a dos oxígenos carboxilato, dos nitrógenos amina, y dos átomos de oxígeno de amida (Figura 16, I); a pH alcalino se considera una geometría de tipo plano cuadrada, en la que el átomo de cobre se une a dos nitrógenos amida desprotonados y dos nitrógenos amino (Figura 16, II). De manera que a pH 7.4 (uno de los elegidos para este trabajo) coexisten mezcla de las dos especies.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de todos los datos obtenidos para el complejo a los tres valores de pH evaluados, mismos que se irán discutiendo paso a paso.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la complejación del ligante PD con cobre a 25°C

	pH=6.0	pH=7.4	pH=10.0
$\Delta H^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-6485(±26)	-15300 (±140)	-6879(±32)
$T\Delta S^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	2680	-5661	2555
N	0.8095(±0.005)	0.9405(±0.13)	0.991(±0.083)
$K(M^{-1})$	$5.21(\pm 0.219) \times 10^6$	$4.71 (\pm 0.79) \times 10^6$	$8.36 (\pm 2.32) \times 10^6$
$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-9161	-9131	-9429

Valores promedio. Las desviaciones estándar fueron calculadas a partir de 2 réplicas por cada titulación.

### Geometría plano cuadrada (pH 10.0):

1) Cambio de entalpía ( $\Delta H$ ): En la Figura 20 se muestra el termograma obtenido en el microcalorímetro, de la formación del complejo de EDTA PD con  $\text{Cu}^{2+}$  a pH 10.0. Los picos hacia

valores negativos observados en el gráfico superior de la figura, indican en primera instancia que la asociación es de carácter exotérmico, lo cual se confirma al observar el valor de entalpia obtenido para este caso (-6879 kcal/mol, Tabla 1).

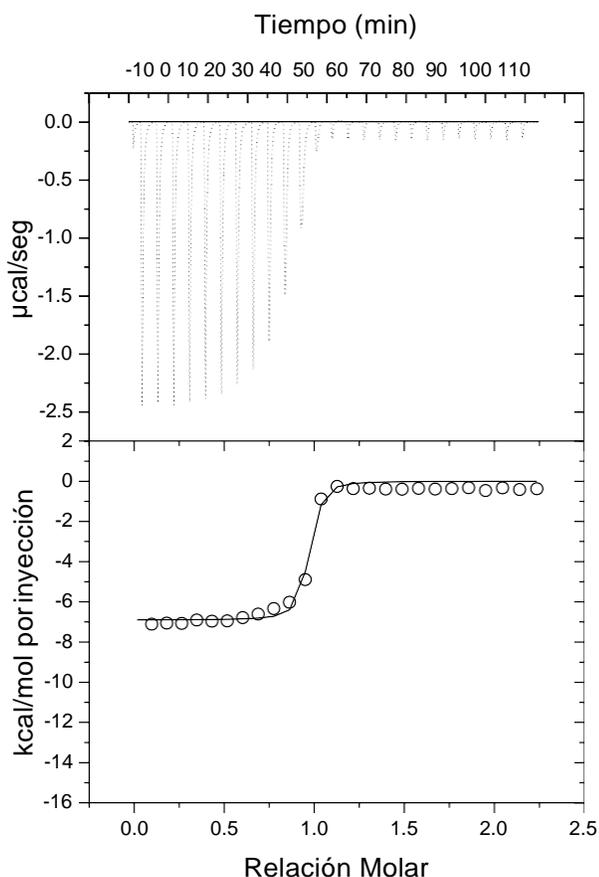


Figura 20. Termograma de la formación de complejo CuPD a pH=10.0

2) Constante de asociación ( $K_a$ ): El gráfico superior de la Figura 20 representa la integral de cada pico resultando en una típica gráfica de tipo sigmoïdal, forma que es indicativa de sistemas con constantes de asociación elevadas, como el caso de este complejo, para el que se obtuvo un valor de  $K_a=8.36 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Este valor alto habla de un complejo bastante estable a las condiciones evaluadas.

3) Energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ): A partir de la constante  $K_a$  es posible calcular el valor de  $\Delta G$  del sistema el cual resultó ser muy negativo (-9,429 kcal/mol), lo que indica un proceso espontáneo y un sistema estable, tal como se resume en la Tabla 1.

4) Cambio de entropía ( $\Delta S$ ): Así mismo, y una vez conocidos los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta G$ , es posible calcular el valor de entropía ( $\Delta S$ ) el cual, al ser de signo positivo significa que es favorable para el sistema, (2555 kcal/mol). Lo anterior nos lleva a concluir que el proceso de formación del complejo y su alta estabilidad son guiados principalmente por el factor entálpico ( $\Delta H=6879$  kcal/mol).

5) Relación molar o estequiometría de la asociación ( $n$ ): El valor de  $n$  no fue el esperado, ya que por constituirse de dos fracciones de edta, la estructura del ligante tiene potencial para resultar en complejos de tipo binuclear, por lo que se esperaba una relación molar de 2, es decir que por cada molécula de ligante se coordinan dos iones de cobre, sin embargo experimentalmente se obtuvo una relación molar de 1, es decir, pareciera que bajo las condiciones de medición, solo se ocupa uno de los dos sitios de coordinación.

Para confirmar este resultado, se decidió realizar una titulación por el método de Job, y la gráfica resultante se muestra en la Figura 21, la cual presenta su pico máximo en la fracción molar = 0.5, lo que es indicativo de que en el complejo existe una molécula de ligante por cada ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Es decir, el resultado es concordante con los datos obtenidos por la técnica de ITC.

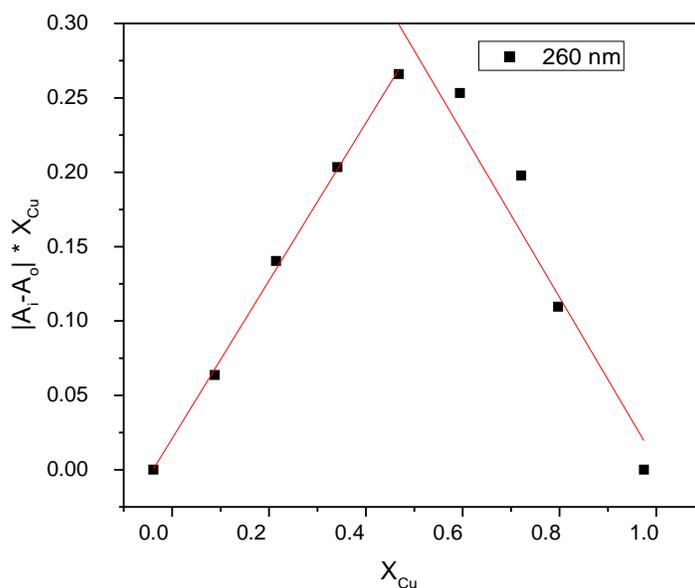


Figura 21. Gráfica obtenida por el método de Job para confirmar la relación molar del complejo CuPD en buffer POPSO de pH=10.0.

### Geometría octaédrica (pH 6.0):

Los resultados para el caso de la formación del complejo a pH 6.0 realmente fueron muy comparables a los obtenidos a pH 10.0, como se describirá a continuación.

1) Cambio de entalpía ( $\Delta H$ ): En la Figura 22 se muestra el termograma obtenido en el microcalorímetro, de la formación del complejo de EDTA PD con  $\text{Cu}^{2+}$  a pH 6.0. Como en el caso de la geometría plano cuadrada, los picos hacia valores negativos observados en el gráfico superior de la figura, señalan el carácter exotérmico del proceso, lo cual se confirma al observar el valor de entalpía obtenido para este caso de  $-6485 \text{ kcal/mol}$  (versus  $-6879 \text{ kcal/mol}$  obtenido a pH 10.0, Tabla 1).

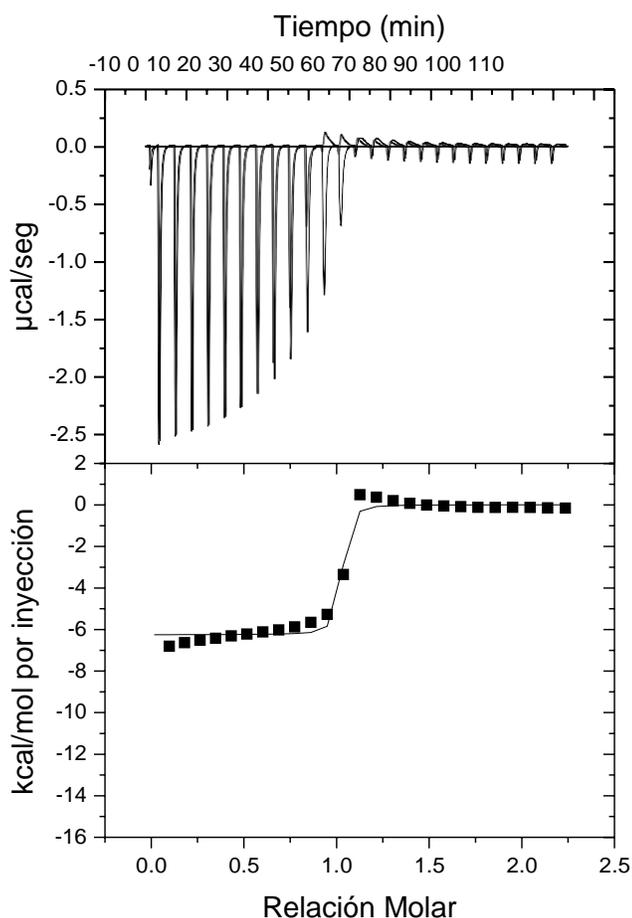


Figura 22. Termograma de la formación de complejo CuPD a pH 6.0

2) Constante de asociación ( $K_a$ ): El gráfico superior de la Figura 22 también es una gráfica de tipo sigmoïdal, pero con una pendiente ligeramente más pronunciada que en el caso la geometría plano cuadrada, resultando en una constante de asociación ligeramente más elevada,  $K_a=5.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (mientras que a pH 10.0,  $K_a=6.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Al parecer la geometría hexacoordinada es más estable que la tetracoordinada bajo las condiciones evaluadas.

3) Energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ): De nueva cuenta, se obtuvo el valor de  $\Delta G$  del sistema, a partir de la constante  $K_a$ , el cual resultó ser muy negativo (-9161 kcal/mol), lo que indica también un proceso espontáneo y un sistema estable, tal como se resume en la Tabla 1.

4) Cambio de entropía ( $\Delta S$ ): Tal como en el primer caso, los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta G$  son empleados para calcular el valor de entropía ( $\Delta S$ ) el cual resultó ser ligeramente más favorable para este sistema (2680 kcal/mol) con respecto al de geometría plano cuadrada, por lo que de nueva cuenta se concluye que el proceso de formación del complejo y su alta estabilidad son guiados principalmente por el factor entálpico ( $\Delta H= -6485 \text{ kcal/mol}$ ).

5) Relación molar o estequiometría de la asociación ( $n$ ): Al igual que para la geometría plana cuadrada, el valor de  $n$  obtenido experimentalmente fue igual a 1. Aún y cuando para este caso no se realizó el experimento de Job, por comparación de los dos sistemas evaluados, se considera aceptable el valor obtenido.

#### **Mezcla de especies (pH 7.4):**

Los resultados obtenidos a pH=7.4 se muestran en la Figura 23, no obstante los parámetros termodinámicos no pueden ser discutidos a profundidad debido a que, como se ha explicado antes, a este pH coexisten ambas especies (octaédrica y plano cuadrada) sin embargo se decidió medir su comportamiento debido a que a este pH se llevan a cabo las mediciones de actividad biomimética de la enzima superóxido dismutasa, que si bien es cierto, esto no se incluye en este trabajo, se prefirió dejar como aportación para futuras discusiones en su posible aplicación como agentes biomiméticos.

De manera general, lo que se puede apreciar es que los valores de  $\Delta H$ , prácticamente son una sumatoria de los  $\Delta H$  de cada especie por separado. No necesariamente así para el resto

de los parámetros evaluados, pero para poder hacer una discusión más profunda, se requerirían de más técnicas en las que se evalúe dicho complejo a este valor de pH.

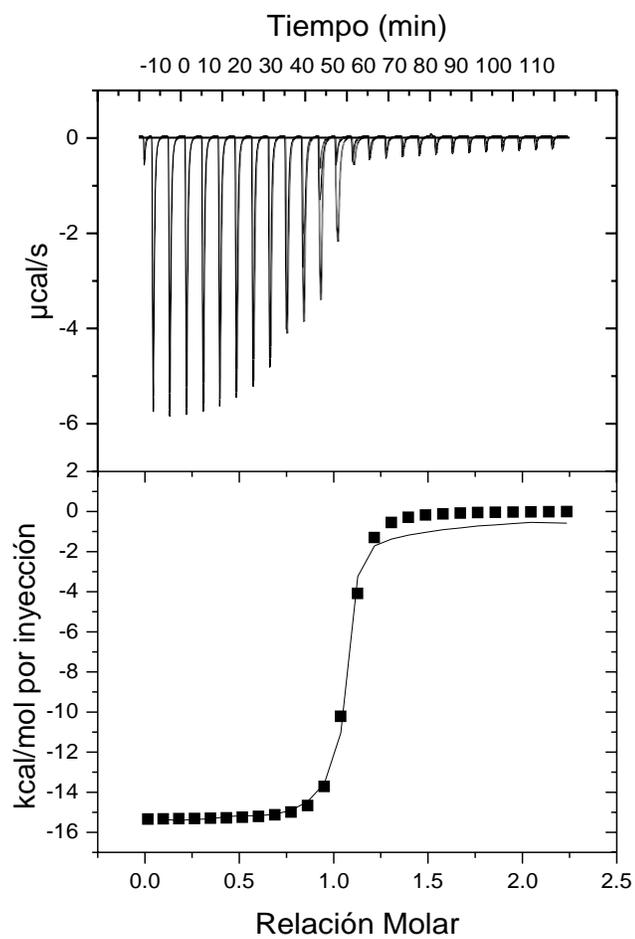


Figura 23. Termograma de la formación de complejo de CuPD a pH 7.4

## CONCLUSIONES

El método de purificación por cromatografía por columna resultó exitoso para la obtención del ligante PD en forma pura, ya que se obtuvo un rendimiento del 10%, similar al reportado por Inoue y cols. (1998)

La caracterización termodinámica del complejo  $\text{Cu}_2\text{PD}$  presentado en este trabajo se realizó satisfactoriamente.

Los parámetros termodinámicos  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $K_a$  y la estequiometría N fueron obtenidos en un microcalorímetro a los valores de pH 6.0, 7.4 y 10.0. Los resultados nos indican que la complejación es espontánea y la estabilidad del complejo es alta.

No se encontraron diferencias termodinámicas considerables entre la formación del complejo metálico en su forma octaédrica con respecto a la forma plano cuadrada. En general, a los tres valores de pH evaluados la formación del complejo es dirigida favorablemente tanto por el factor entrópico, como por el entálpico, excepto para el caso de pH intermedio en el que prevalece mezcla de las especies ácida y básica.

Esta información nos da pie para conocer un poco el comportamiento de este complejo y abre las puertas para continuar con la experimentación de este posible agente biomimético.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chang, R. (2010). Química. 10 ed. México, D.F. McGraw-Hill. 800-801 p.
2. Schmidtchen, Franz P. (2007) 'Isothermal Titration Calorimetry', Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, 1:1, 1 — 10
3. Falconer, R. J. (2016). Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015. J. Mol. Recognit. Journal of Molecular Recognition. doi:10.1002/jmr.2550
4. 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.
5. 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
6. 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
7. Lehn, J. (2002). Supramolecular Polymer Chemistry— Scope and Perspectives. Polymer International, 825-839. doi:10.1002/pi.852
8. Alberts, Bruce et al. (2011). Introducción a la Biología Celular. 3ª ed. México, D.F. Médica Panamericana. 82-99 p.
9. 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
10. J. L. Atwood, Jonathan W. Steed. (2007) Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, Volume 1.
11. Carolina Muscoli, Salvatore Cuzzocrea, Dennis P Riley, Jay L Zweier, Christoph Thiemermann,<sup>5</sup>Zhi-Qiang Wang,<sup>1</sup>and Daniela Salvemini (2003) On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies Br J Pharmacol.; 140(3): 445–460.
12. Pedersen, C. J. (1967). "Cyclic polyethers and their complexes with metal salts". Journal of the American Chemical Society 89 (26): 7017–7036.
13. Facultad de Química UNAM, Química de Coordinación. Mexico (2009) Disponible en: [depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Complejosysunomenclatura\\_13378.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Complejosysunomenclatura_13378.pdf)
14. Gutsche, C. D. (2008). «Calixarenes». The Royal Society of Chemistry.

15. McMahon, G.; O'Malley, S.; Nolan, K. (2003). Important calixarene derivatives—their synthesis and applications. *Arkivoc*. p. 23-31.
16. Becket, Gordon; Schep, Leo J.; Tan, Mun Yee (1999). "Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins". *International Journal of Pharmaceutics*. 179 (1): 65–71.
17. Thatiparti, Thimma R.; Shoffstall, Andrew J.; Von Recum, Horst A. (2010). "Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics". *Biomaterials*. 31 (8): 2335–47.
18. Cram D. J. and Cram J. M., 1997. Container molecules and their guest. *Angewandte Chemie*. 34:2563-2564.
19. Banci L, Bertini I, Boca M, Girotto S, Martinelli M, Valentine JS, et al. (2008) SOD1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mutations and Oligomerization. *PLoS ONE* 3(2): e1677.
20. Szilágyi, a I. Laba'di, a K. Hernadi, b I. Pa'linko', \*c I. Fekete, d L. Korecz, e A. Rockenbauere and T. Kissaf Superoxide dismutase activity of a Cu–Zn complex—bare and immobilised. 2005. *New J. Chem*.
21. Biedermann, F., Nau, W. M., & Schneider, H. J. (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. <https://doi.org/10.1002/anie.201310958>
22. 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. <https://doi.org/10.1021/ja020612e>
23. Velazquez-Campoy, A. (2015). Geometric features of the Wiseman isotherm in isothermal titration calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 122(3), 1477–1483. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4775-x>
24. Of, P., & Technique, T. H. E. (2004). Isothermal Titration Calorimetry. *Cell*, (794741455), 1–24. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1708s23>
25. Freyer, M. W., & Lewis, E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology*, 84(August 2016), 79–113. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0)
26. Lehn, J. M. (2002). Supramolecular polymer chemistry - Scope and perspective. *Polymer International*, 51(10), 825–839. <https://doi.org/10.1002/pi.852>
27. 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. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(2), 604–611. <https://doi.org/10.1021/jp075747r>
28. Velazquez-Campoy, A., & Freire, E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophysical Chemistry*, 115(2–3 SPEC. ISS.), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.12.015>
29. 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. <https://doi.org/10.1021/ja036166s>
30. Sugich-Miranda, R., Sotelo-Mundo, R. R., Silva-Campa, E., Hernández, J., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Velazquez-Contreras, E. F. (2010). Antioxidant capacity of binuclear Cu(II)-cyclophanes, insights from two synthetic bioactive molecules. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(6), 379–383. <https://doi.org/10.1002/jbt.20350>
31. Virue, C., Navarro, R. E., & Aguilera-ma, D. (2008). Hydrogen bonding between carboxylic acids and amide-based macrocycles in their host – guest complexes, *Journal of Supramolecular Chemistry* 20(8), 737–742. <https://doi.org/10.1080/10610270701798795>
32. Ramadan, A. E.-M. M. (2012). Syntheses and characterization of new tetraazamacrocyclic copper(II) complexes as a dual functional mimic enzyme (catalase and superoxide dismutase). *Journal of Coordination Chemistry*, 65(8), 1417–1433. <https://doi.org/10.1080/00958972.2012.673719>
33. Falconer, R. J. (2016). Applications of isothermal titration calorimetry ??? the research and technical developments from 2011 to 2015. *Journal of Molecular Recognition*, (April), 504–515. <https://doi.org/10.1002/jmr.2550>
34. Mart, P., & Profesional, E. E. (2014). Lista de sustancias dopantes 2014.
35. Woźniak, M., & Czyż, M. (2008). [Superoxide dismutase mimetics: Possible clinical applications.]. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej*, (62), 613–624. Retrieved from <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=871386>
36. 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.
37. Li, L., Dantzer, J. J., Nowacki, J., O'Callaghan, B. J., & Meroueh, S. O. (2008). PDBcal: A comprehensive dataset for receptor-ligand interactions with three-dimensional structures and binding thermodynamics from isothermal titration calorimetry. *Chemical Biology and Drug Design*, 71(6), 529–532. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00661.x>

38. Gracia, C. (n.d.). Microcalorimetría Isoterma: Instrumentación, Métodos y Aplicaciones en la Industria Farmacéutica: Estabilidad de Productos , Compatibilidad , Amorficidad y Polimorfismos, 53–57.
39. Inoue, M. B., Velazquez, E. F., Medrano, F., Ochoa, K. L., Galvez, J. C., Inoue, M., & Fernando, Q. (1998). Binuclear Copper(II) Chelates of Amide-Based Cyclophanes. *Inorganic Chemistry*, 37(16), 4070–4075. <https://doi.org/10.1021/ic980238c>
40. Kotha, S., Shirbhate, M. E., & Waghule, G. T. (2015). Selected synthetic strategies to cyclophanes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11, 1274–1331. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.142>
41. Krainer, G., Broecker, J., Vargas, C., Fanghanel, J., & Keller, S. (2012). Quantifying High-Affinity Binding of Hydrophobic Ligands by Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Chemistry*, 84, 10715–10722.
42. Arroyo-Maya, I. J., & McClements, D. J. (2016). Application of ITC in foods: A powerful tool for understanding the gastrointestinal fate of lipophilic compounds. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(5), 1026–1035. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.001>
43. Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. 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. <https://doi.org/10.1039/C4RA15453C>
44. Le Poul, N., Le Mest, Y., Jabin, I., & Reinaud, O. (2015). Supramolecular Modeling of Mono-copper Enzyme Active Sites with Calix[6]arene-based Funnel Complexes. *Accounts of Chemical Research*, 48(7), 2097–2106. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00152>
45. Freyer, M. W., & Lewis, E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology*, 84(August 2016), 79–113. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0)
46. Holm, R. H., & Solomon, E. I. (1996). Preface : Bioinorganic Enzymology. *Chem. Rev.*, 96(7), 2237. <https://doi.org/10.1021/cr9604144>
47. Bioinorganica, L. D. E. (2003). Tesis para optar por el grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas Autor: MSc. Eduardo Almirall Romero Tutores: Dr Alex Fragoso Sierra Prof. Dr. Roberto Cao Vázquez Ciudad de La Habana, 38–150.
48. Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. 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. <https://doi.org/10.1039/C4RA15453C>

49. Frances Namuswe, Takahiro Hayashi, Yunbo Jiang, Gary D. Kasper, Amy A. Narducci Sarjeant, Pierre Moe"nne-Loccoz, and David P. Goldberg, "Influence of the Nitrogen Donors on Nonheme Iron Models of Superoxide Reductase: High-Spin FeIII-OOR Complexes" June 2010 J. AM. CHEM. SOC. 2010, 132, 157–167
50. Day, B.J., Shawen, S., Liochev, S.I. & Crapo, J.D. (1995). A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1227 – 1232.
51. ASTON, K., RATH, N., NAIK, A., SLOMCZYNSKA, U., SCHALL, O.F. & RILEY, D.P. (2001). Computer-aided design (CAD) of Mn(II) complexes: superoxide dismutase mimetics with catalytic activity exceeding the native enzyme. Inorganic Chemistry., 40, 1779 – 1789.
52. Isabel A. Abreu, Diane E. Cabelli, Michael J. Maroney, Anne-Frances Miller, Miguel Teixeira, and Joan Selverstone Valentine Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases Yuewei Sheng, , Chem. Rev. 2014, 114, 3854–3918
53. Brown TL, LeMay E Jr, Bursten BE. (2009) Chemistry: The Central Science (11th Edition). Prentice-Hall. ISBN 0-13-600617-5
54. K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta, H. Hisamoto (1995). «Design and Synthesis of Calcium and Magnesium Ionophores Based on Double-Armed Diazacrown Ether Compounds and Their Application to an Ion Sensing Component for an Ion-Selective Electrode». Anal. Chem. 67 (2): 324-334.
55. A.V. Peskin, C.C. Winterbourn (2000). «A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)». Clinica Chimica Acta 293: 157-166.
56. Elchuri, et al., S. (2005). «CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life.». Oncogene 24: 367-380.
57. Muller, et al., F. L. (2006). «Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy.». Free Radic. Biol. Med 40: 1993-2004.
58. entman, et al., M. L. (2006). «Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase». J. Biol. Chem. 281: 6904-6909. doi:10.1074/jbc.M510764200
59. Cotton, F. A., & Wilkinson, G. (1988). Advanced inorganic chemistry: John Wiley & Sons Inc.
60. Cragg, P. J. (2010). Supramolecular Chemistry: from biological inspiration to biomedical applications. Dordectht: Springer. Pp. 18-19

61. Cragg, P. J. (2005) *A practical guide to supramolecular chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons pp. 9-10; 208
62. Ana S. Fernandes, Jorge Gaspar M., Fatima Cabral, Catia Caneiras, Rita Guedes, Jose Rueff, Matilde Castro, Judite Costa, Nuno G. Oliveira (2007) Macrocyclic copper(II) complexes: Superoxide scavenging activity, structural studies and cytotoxicity evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101, 849–858