

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

“Determinación de constantes de acidez de compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos con propiedades antihipertensivas y evaluación de su capacidad antioxidante”

Tesis que presenta
M en C. José Manuel Islas Martínez

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Química



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ASESOR

Dr. Alberto Rojas Hernández

Jurado calificador:

Dr. Alberto Rojas Hernández

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dra. Laura Galicia Luis

Dr. Mario Ávila Rodríguez.

Dr. Rodolfo Gómez Balderas

México, D.F Abril 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

“Determinación de constantes de acidez de compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos con propiedades antihipertensivas y evaluación de su capacidad antioxidante.

Tesis que presenta
M en C. José Manuel Islas Martínez

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Química



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ASESOR

Dr. Alberto Rojas Hernández

Jurado calificador:

Dr. Alberto Rojas Hernández

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dr. Laura Galicia Luis

Dr. Mario Ávila Rodríguez.

Dr. Rodolfo Gómez Balderas

México, D.F Abril 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00090

Matrícula: 205780047

DETERMINACION DE CONSTANTES DE ACIDEZ DE COMPUESTOS PIPERIDINICOS, MORFOLINICOS Y TIOMORFOLINICOS CON PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS Y EVALUACION DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 2 del mes de abril del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ
- DR. RODOLFO GOMEZ BALDERAS
- DR. MARIO AVILA RODRIGUEZ
- DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL
- DRA. LAURA GALICIA LUIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: JOSE MANUEL ISLAS MARTINEZ

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

aprobar.

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



Jose Manuel Islas Martinez

JOSE MANUEL ISLAS MARTINEZ
ALUMNO

REVISÓ

[Signature]
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

[Signature]
DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES
HEREDIA

PRESIDENTE

[Signature]
DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

VOCAL

[Signature]
DR. RODOLFO GOMEZ BALDERAS

VOCAL

[Signature]
DR. MARIO AVILA RODRIGUEZ

VOCAL

[Signature]
DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL

SECRETARIA

[Signature]
DRA. LAURA GALICIA LUIS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mi hijo Manuel Alejandro

A mi querida Ariana

A mis queridos padres

Quiero agradecer al doctor **Alberto Rojas Hernández** por el apoyo brindado, la asesoría y las enseñanzas que incondicionalmente me brindó durante la realización de este proyecto, así como la confianza que me dio para dar clases de analítica. También quiero agradecerle su confianza en mí.

También quiero agradecer especialmente a los miembros del jurado por las revisiones, los comentarios, contribuciones y sugerencias que enriquecieron de sobremana el presente trabajo de tesis.

Presidente: Dr. Alberto Rojas Hernández

Secretaria: Dra. Laura Galicia Luis

Vocal: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal.

Vocal: Dr. Mario Ávila Rodríguez.

Vocal: Dr. Rodolfo Gómez Balderas

Dr. Alberto Rojas Hernández. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de Química.

Dra. Laura Galicia Luis. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de Química.

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas

Dr. Rodolfo Gómez Balderas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Dr. Mario Ávila Rodríguez. Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química.

A mi querido hijo **Manuel Alejandro** y a mi querida **Ariana** les dedico este trabajo.

También dedico este trabajo a mis queridos y amados padres **Arcángel** y **Herminia** por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi vida. A mis hermanos Arcángel y Laura, así como a mis queridas sobrinas Natalia y Michelle y a toda mi familia.

Agradezco a la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA por haber permitido llevar a cabo todos mis estudios, desde licenciatura hasta la culminación del doctorado

Agradezco a toda el área de química analítica de la UAMI apoyo brindado durante todo este tiempo, en especial a la Dra. María Teresa Silva Hernández , Dra Gloria Sarabia Martínez.

Agradezco al Dr José Antonio de los Reyes por su amistad y por darme trabajo en la UAMI como profesor de tiempo completo en Ingeniería Química .

Agradezco a la Dra Annia Galano por la colaboración realizada en todos los cálculos teóricos.

A mis queridos y estimados amigos: Pedro Ibarra, Agustín Ibarra, Alicia Vicenteño, Inés Reyes, Pablo Rosetti, Mario Palomares, Manuel y Pilar Sevilla, familia Pólito, Carlos Santolalla, Alex Toriello, Eduardo Flores, Barrales, Piña, Gerardo Gómez, Matias, Juan Cabello, Andrés Tavizón, Zepeda, Manuel Alejandro Hernández, Karla Sanpedro, Rosa Iris, Catalán, Iris Natzielly.

Al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT beca 160451.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABREVIATURAS.....	xi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Hipertensión.....	2
1.2 Radicales libres	6
1.2.2 Importancia biológica.....	7
1.2.3 Antioxidantes	8
1.3 Estudio químico cuántico.....	12
1.4 Antecedentes.....	14
1.5 Justificación	19
1.6 Objetivos generales	21
1.7 Objetivos particulares	21
CAPÍTULO 2	23
DETERMINACIÓN DE LAS CONTANTES DE ACIDEZ CON LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis Y ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE) DE LOS COMPUESTOS PIPERIDÍNICOS.	23
Parte experimental Espectrofotometría UV-Vis (valoraciones ácido-base).....	24
2.1 Pruebas de estabilidad de los LQM's.....	25
2.2 Valoraciones espectrofotométricas ácido –base	25
2.2.1 Preparación de soluciones.	26
2.2.2 Procedimiento experimental	27
Parte experimental CZE	28
2.3 Preparación de soluciones	28
2.3.1 Acondicionamiento del capilar.....	29
2.3.2 Método empleado para la separación electroforética.....	29
RESULTADOS	30
2.4 Compuestos piperidínicos	30
VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE.....	34
ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE).....	43

2.5 Discusión general piperidínicos	51
CAPÍTULO 3	56
VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE	57
3.1 Estabilidad de los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos.....	57
3.2 LQM336	58
3.3 LQM335	61
3.4 LQM310	63
3.5 LQM323	65
3.6 LQM322	67
3.7 LQM329	69
3.8 Determinación de las constantes de acidez utilizando SQUAD	72
3.9 Determinación del número de especies absorbentes presentes en los LQM's con el programa TRIANG	76
3.10 Movilidades electroforéticas efectivas de los LQM's.....	81
3.11 Determinación de las constantes de acidez utilizando SQUAD.	88
3.12 Discusión general piperidínicos (nuevos), morfolínicos y tiomorfolínicos.....	91
CAPÍTULO 4	94
ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO	94
4.1 Metodología empleada en los cálculos teóricos.	95
4.2. Estudios teóricos de los mecanismos de desprotonación.	99
CAPÍTULO 5	108
5.1 Descripción del método DPPH	109
Parte experimental.....	111
5.3 Curva de calibración con el antioxidante de referencia trolox	111
5.4 Método empleado en la determinación del TEAC con los compuestos LQM's.....	112
5.5 Procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante.....	113
5.6 Determinación de la capacidad antioxidante.....	114
CAPÍTULO 6	117
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	117
REFERENCIAS.....	121

APENDICE A	127
APENDICE B	129
APENDICE C	131
APENDICE D	139

Abstract

In this work, physico-chemical characterization studies of piperidinic, morpholinic and thiomorpholinic derivatives of phenol compounds with antihypertensive and antiarrhythmic properties (LQMs) were undertaken.

In the first place a systematic study (experimental and theoretical) of the pKa values of four piperidinic LQMs was carried out in order to describe the behavior of the substituents in the para- position to phenol group on the acidity and deprotonation order of the molecules.

In the second place, the acidity constants and antioxidant properties of piperidinic, morpholinic and thiomorpholinic derivatives LQMs, bis and tris phenolic, were determined to investigate other possible applications of these kind of compounds.

Stability tests of all LQM's compounds were performed in order to find the time interval of work, besides the optimum working concentrations were obtained in order to have good absorbency readings.

The acidity constants for the four piperidinic compounds LQM344, LQM345, LQM346 and LQM351 were determined by UV-Vis spectrophotometry (acid-base titration) at pseudo-physiological conditions (37°C and 0.15 M ionic strength).

The acidity constants of the four compounds were determined by the Capillary Zone Electrophoresis (CZE) technique, in order to compare the values determined with those obtained by UV-Vis spectroscopy. In general, a good agreement between both techniques was found.

The theoretical study of the four piperidinic compounds was also carried out by DFT to discuss the relative acidity of the protons the molecules. A methodology to calculate the pKa values was established, that can be extended to other LQM compounds; and the calculated values have a correlation with the experimental values.

The deprotonation mechanisms were obtained by the theoretical study of the four compounds. The presence of the nitro group in the para- position to the phenol site significantly increases the acidity of the phenolic proton, which is due to the electron acceptor character of the substituent. Moreover, the entire set of pKa values decreases when this substituent, suggesting that also influences the acidity of the protons on the N atoms of the piperidine group, despite of the presence of a methylene group between piperidines and the phenolic ring.

The neutral species LQM344 and LQM35 are zwitterionic and, while in the case of LQM346 and LQM351 are neutral molecular species. In addition, the different character can play a significant role in the efficiency of the molecules studied to cross the lipid membrane.

Furthermore, the pKa values of other two piperidinic compounds (LQM335 y LQM336): morpholinic compounds (LQM310 y LQM323), thiomorpholinic compounds (LQM322 y LQM329); using UV-visible spectrophotometry and CZE techniques.

The pKa values were obtained with the aid of SQUAD program for both UV-Vis Spectrophotometry and CZE, the experimental conditions for the first technique are as follows: T= 37 °C and 0.15 M ionic strength (I), for the second T=37 °C and 0.05 M (I) providing a good correlation between values obtained from pKa with both techniques.

Finally, the antioxidant capacity of the piperidinic, morpholinic and thiomorpholinic compounds was evaluated, using the 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) as free radical. From all the LQMs, the LQM322 compound (the thiomorpholinic derivative of pyrogallol) show the best antioxidant capacity in relation with the 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcomo-2-carboxylic acid (troloxol), the antioxidant of reference.

RESUMEN

En este trabajo se realizaron estudios de caracterización físico-química de derivados piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos (LQMs) con propiedades antihipertensivas y antiarrítmicas.

En primer lugar, se realizó un estudio sistemático (experimental y teórico) de los valores de pKa de cuatro LQMs piperidínicos, este estudio fue llevado a cabo para describir el efecto de los sustituyentes en la posición *para* del grupo del fenol en la acidez y orden desprotonación de las moléculas.

En segundo lugar, las constantes de acidez y propiedades antioxidantes de los derivados LQMs piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos, de dos y tres OH fenólicos, fueron determinadas para investigar otras posibles aplicaciones de estas clases de compuestos.

Las pruebas de estabilidad de todos los compuestos LQMs fueron realizadas para encontrar el intervalo de tiempo de trabajo, así como las concentraciones de trabajo óptimas, éstas últimas con el objetivo de tener buenas lecturas de absorbancia.

Las constantes de acidez de los cuatro compuestos piperidínicos LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351 fueron determinadas por Espectrofotometría UV-Vis (valoraciones ácido-base) a condiciones pseudofisiológicas (37°C y fuerza iónica 0.15 M).

Las constantes de acidez de los cuatro compuestos fueron determinadas por la técnica Electroforesis Capilar de Zona (CZE) para comparar los valores determinados con aquellos obtenidos con Espectrofotometría UV-Vis. En general, se encontró una buena relación entre ambas técnicas.

El estudio teórico de los cuatro compuestos piperidínicos fue llevado a cabo por DFT para discutir la acidez relativa de los protones en las moléculas. Una metodología para calcular los valores de pKa fue establecida para ser extendida a otros compuestos LQMs; los valores calculados tienen una correlación con los valores experimentales.

Los mecanismos de desprotonación fueron obtenidos a partir del estudio teórico de los cuatro compuestos. La presencia del grupo nitro en el sitio para del fenol, aumenta significativamente la acidez del protón fenólico, que se explica por el carácter electrón-aceptor de este sustituyente. Por otra parte, todo el conjunto de valores de pKa disminuye cuando este sustituyente está presente, lo que sugiere que también influye en la acidez de los protones en los átomos de N de los grupos piperidínicos, a pesar de la presencia de un grupo metileno entre piperidinas y el anillo fenólico.

Las especies neutras del LQM344 y LQM345 son zwitteriónicos, mientras que en el caso del LQM346 y LQM351 son especies neutras moleculares. Además, este carácter diferente puede desempeñar un papel significativo en la eficiencia de las moléculas estudiadas para el cruce de la membrana lipídica.

Además los valores de pKa de otros dos compuestos piperidínicos (LQM335 y LQM336); compuestos morfolínicos (LQM310 y LQM323), compuestos tiomorfolínicos (LQM322 y LQM329); se obtuvieron empleando las técnicas Espectrofotometría UV-visible y CZE.

Los valores de pKa se obtuvieron con el programa SQUAD para Espectrofotometría UV-Vis y CZE, las condiciones experimentales para la primera técnica son las siguientes, T= 37 °C y 0.15 M fuerza iónica (I), para la segunda T=37 °C y 0.05 M (I) obteniendo buena correlación entre los valores obtenidos de pKa con ambas técnicas.

Finalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos, fueron evaluados usando el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). De todos los LQM's el compuesto LQM322 presentó la mejor capacidad antioxidante en relación con el antioxidante de referencia 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox).

ABREVIATURAS

LQM	Laboratorio de Química Medicinal
LQM344	4-nitro-2-(1-piperidínilmetil) - fenol
LQM345	4-nitro- 2,6-bis(1-piperidínilmetil)- fenol
LQM346	4-cloro-2,6-bis(1-piperidínilmetil)- fenol
LQM351	4-isopropil-2,6-bis(piperídín-1-ilmetil)fenol
LQM335	3,6-bis(1-piperidínilmetil)- benceno-1,4-diol
LQM336	4(1-piperidínilmetil)-5 metoxi-fenol-aldehído
LQM310	2,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benceno-1,4-diol
LQM323	2,4-bis(morfolin-4-ilmetil)benceno-1,5-diol
LQM322	4,6-bis(tiomorfolin-4-ilmetil)benceno-1,2,3-triol
LQM329	3,6-bis(tiomorfolin-4-ylmetil)benceno-1,2-diol
CZE	Electroforesis Capilar de Zona, por sus siglas en inglés.
Fuerza iónica	I
λ	Longitud de onda
ϵ	Coefficiente de absortividad molar
σ_{reg}	Desviación estándar sobre los datos de absorbancia
$\sigma_{constantes}$	Desviación estándar sobre las constantes
$\sigma_{espectro}$	Desviación estándar por espectro.
(σ_{coef})	Desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar
ABTS ⁺ cation radical	Radical libre: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil

ABREVIATURAS

ARP	Poder antirradical
EC50	Concentración efectiva media
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
BHT	Butil hidroxitolueno o 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
BTA	Butil-hidroxi-anisol
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
u	Movilidad electroforética
TEAC	Capacidad antioxidante como equivalentes de trolox (Por sus siglas en inglés)
SQUAD	Constantes de estabilidad a partir de datos de absorbancia (Por sus siglas en inglés)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Hipertensión

Existen muchos padecimientos que día a día van mermando la calidad de vida del ser humano, uno de éstos es la presión arterial alta mejor conocida como hipertensión arterial. A menudo se llama "el asesino silencioso" porque un tercio de las personas con presión arterial alta no son conscientes de que tienen la enfermedad[1].

La hipertensión arterial es probablemente el problema de salud pública más importante en los países desarrollados. Es una enfermedad frecuente, asintomática, fácil de detectar, casi siempre sencilla de tratar y que con frecuencia tiene complicaciones letales si no recibe tratamiento.

Datos del Sistema Nacional de Salud y Nutrición de los Estados Unidos de Norte América han indicado que 50 millones o más de estadounidenses tienen presión arterial alta y éstos reciben algún tipo de tratamiento. En el mundo se estima que la hipertensión pueden afectar a un billón de individuos, aproximadamente 7.1 millones de muertes al año pueden atribuirse a la hipertensión arterial. En México se estima que en tan sólo seis años, entre 2000 y 2006, la prevalencia de la hipertensión se incrementó hasta afectar a uno de cada tres adultos mexicanos[2].

Los niveles elevados de la presión producen una variedad de cambios estructurales en las arterias que suministran sangre al cerebro, el corazón y los riñones principalmente. En las últimas décadas se ha convertido en cada vez más claro que los riesgos de padecer hipertensión pueden ocasionar accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardíacas isquémicas e insuficiencia renal por mencionar algunas.

Las principales causas de la hipertensión arterial son una dieta con un alto consumo de sal[3], desequilibrio de potasio, calcio, magnesio, grasas saturadas, niveles de ejercicio, obesidad y la ingesta excesiva de alcohol. Como resultado de los efectos acumulativos de estos factores, la presión arterial por lo general aumenta progresivamente con la edad, excepto en sociedades en las que la ingesta de sal es baja y realizan ejercicio constantemente[4].

Presión sistólica y diastólica

Cada vez que el corazón se contrae, ejerce presión en la sangre. Esta presión se ejerce contra las paredes de las arterias y se llama presión sanguínea. El período durante el cual se contraen los ventrículos del corazón se llama sístole. La presión en las arterias es más alta durante esta fase. El período durante el cual los ventrículos se relajan y se llenan de sangre se llama fase llamada diástole. La presión en las arterias es más baja durante la diástole que durante la sístole[5].

La presión arterial elevada se define como una presión sistólica en reposo superior o igual a 130 mmHg, una presión diastólica en reposo superior o igual a 80 mmHg, o la combinación de ambas. En la hipertensión, generalmente tanto la presión sistólica como la diastólica son elevadas.

La sociedad europea en el año 2003[6] realizó una clasificación bastante útil para la hipertensión misma que se muestra a continuación:

Clasificación de la presión arterial para en adultos de 18 años de edad o más.

Categoría	Presión sistólica, mmHg	Presión diastólica, mmHg
Óptima	<120	<80
Normal	<130	<85
Normal alta	130-139	85-89
Hipertensión ^a		
Fase 1(leve)	140-159	90-99
Fase 2(moderada)	160-179	100-109
Fase 3(grave)	≥180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	90

^a Con base en un promedio de dos o más lecturas en dos consultas distintas.

Nota: Clasificación de la presión arterial para adultos de 18 años y más que no utilizan antihipertensivos y no sufren problemas agudos. Cuando las presiones sistólica y diastólica caen dentro de categorías distintas, la mayor se utiliza para clasificar la presión global.

Con el fin de utilizar con prudencia los antihipertensivos es necesario conocer los sitios y mecanismos de acción. En general, existen siete clases de fármacos antihipertensivos:

- diuréticos
- inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)
- antagonistas de los receptores de angiotensina
- antagonistas de los canales de calcio
- antiadrenérgicos
- vasodilatadores
- antagonistas de los receptores de mineralocorticoides.

Diuréticos

Las tiazidas son los que se emplean con mayor frecuencia y las que más se han estudiado. Ayudan a los riñones a eliminar sal y agua, disminuyen el volumen circulante de líquidos en todo el organismo, reduciendo de ese modo la tensión arterial. Debido a que la mayoría de los diuréticos producen una eliminación rápida e intensa de sodio, cloro y potasio, se ocasionan alteraciones metabólicas como hipopotasemia, hiperglucemia y trastornos en los lípidos sanguíneos.

Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE)

Los fármacos de este grupo inhiben la enzima que convierte a la angiotensina I en angiotensina II. Estos medicamentos son útiles no sólo porque inhiben la generación de un potente vasoconstrictor (la angiotensina II) sino porque también retrasan la degradación de un potente vasodilatador (la bradicinina). En la actualidad se sabe que la activación del sistema renina-angiotensina origina los efectos nocivos sobre los sistema cardiovascular y renal. El captopril pertenece a esta clasificación y se ha visto que presenta efectos secundarios como es la urticaria, pérdida del gusto, insuficiencia renal aguda, tos e hipotensión.

Antagonistas de los receptores de angiotensina

Estos fármacos son los bloqueadores más selectivos del sistema renina-angiotensina en la actualidad. Sus efectos son similares a los de los inhibidores de ACE pero, en lugar de bloquear la producción de angiotensina II, inhiben en forma competitiva su enlace con el

receptor de angiotensina II. Estos fármacos presentan menos efectos colaterales que los ACE.

Antagonistas del calcio

Los antagonistas de los conductos del Ca^{2+} son medicamentos importantes, la principal clase química de los antagonistas de los conductos de calcio son las dihidropiridinas: amlodipina, felodipina, isradipina y nifedipina. Todos estos fármacos disminuyen la presión arterial porque inhiben la entrada de Ca^{2+} a través de los conductos de tipo L sensibles al voltaje en el músculo liso arteriolar, lo que conduce a la relajación del músculo liso y disminución de la resistencia vascular periférica.

Agentes antiadrenérgicos

Existen diversos bloqueadores beta-adrenérgicos eficaces que bloquean la acción simpática sobre el corazón y reducen eficazmente el gasto cardíaco y presión arterial cuando existe un aumento de la actividad simpática cardíaca. Sin embargo estos fármacos pueden desencadenar insuficiencia cardíaca congestiva y asma en individuos predispuestos.

Vasodilatadores

Estos fármacos no suelen utilizarse en el tratamiento inicial. La hidrazilina es el medicamento más versátil que provoca relajación directa del músculo liso vascular; actúa principalmente sobre la resistencia arterial.

El monoxidilio es incluso más potente que la hidralazina, pero por desgracia produce un importante hirsutismo y retención de líquidos y por tanto su empleo está limitado a pacientes con hipertensión grave.

Antagonistas de los receptores de mineralocorticoides

Además de sus efectos hormonales clásicos sobre el riñón provocando retención de sodio y excreción de potasio, en la actualidad se sabe que la aldosterona es una hormona paracrina con acciones locales y no sólo sobre el riñón, sino también sobre el corazón y vasos sanguíneos, lo que contribuye a la fibrosis e hipertrofia. Por lo tanto, se están creando antagonistas de la aldosterona para contrarrestar estos efectos nocivos, uno de los cuales es la hipertensión.

El tratamiento más común para la lucha contra la hipertensión son los fármacos antihipertensivos. Hoy en día hay un gran número de tales sustancias disponibles. Desafortunadamente, la mayoría de los ellos tiene efectos secundarios adversos. Por lo tanto, el desarrollo y estudio detallado de nuevos fármacos antihipertensivos es de vital importancia para el ser humano.

1.2 Radicales libres

Otro tema muy importante hoy día son los procesos de oxidación en el cuerpo humano los cuales son perjudiciales al igual que en los productos alimenticios. El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia de las células. Un efecto secundario de esta dependencia es la producción de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que causan cambios oxidativos.

Un radical libre es cualquier especie que contenga uno o más electrones no apareados, lo cual le confiere su característica inestable[7], en estas condiciones, busca a toda costa otro electrón para poder aparearse. Ésto hace que los radicales libres sean tan extremadamente reactivos.

Cuando se forma un exceso de radicales libres, éstos pueden desequilibrar las enzimas de protección, tales como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, causando efectos celulares destructivos y letales mediante la oxidación de los lípidos en la membrana celular, proteínas celulares, mal de Parkinson[8], mutaciones del ADN[9] y enzimas.

La oxidación también afecta a los alimentos, es una de las principales causas de deterioro químico de ellos, lo que resulta en la ranciedad y disminución de su calidad nutricional, color, sabor y textura. Se estima que la mitad de las cosechas de hortalizas y frutas en el mundo se pierden debido a reacciones de deterioro post-cosecha[10].

Dado que la producción de ROS y las defensas antioxidantes están aproximadamente equilibradas en el cuerpo humano, es fácil inclinar la balanza a favor de los radicales libres y crear la situación de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede ocurrir de varias maneras:

- bajo consumo de antioxidantes en la dieta diaria.
 - ingesta inadecuada de α -tocoferol, ácido ascórbico y aminoácidos.
 - falta de proteínas en la dieta diaria.
 - otra posibilidad es el exceso de producción de los radicales $O_2^{\bullet-}$, por ejemplo, exposición a fármacos o toxinas que se metabolizan para producir los radicales libres, o por la activación excesiva de los sistemas "naturales" productores de radicales.
- Algunos de los radicales libres se muestran en la tabla 1.2.1[11].

Tabla 1.2.1 Principales radicales libres

Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Superóxido	$O_2^{\bullet-}$
	Hidroxilo	OH^{\bullet}
	Peroxilo	$RO_2^{\bullet-}$
	Alcoxil	RO^{\bullet}
	Hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	Óxido nítrico	NO^{\bullet}
	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}

1.2.2 Importancia biológica

La membrana celular es un sistema biológico elemental donde la unidad de base son los fosfolípidos, moléculas dispuestas de un polo hidrófilo y de un polo hidrófobo, constituido de dos cadenas de ácidos grasos insaturados que poseen algunos dobles enlaces carbono-carbono.

Es en las cadenas de ácidos grasos insaturados y específicamente en sus dobles enlaces, donde son extremadamente sensibles a la agresión de los radicales libres.

Por ejemplo, el daño biológico causado por los radicales OH^{\bullet} ocurre cuando éste se genera cerca de las membranas, y ataca a las cadenas laterales de ácidos grasos de los

fosfolípidos. Ataca el ácido graso de las cadenas laterales (varios dobles enlaces carbono carbono), tales como los del ácido araquidónico[12].

1.2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son uno de los principales ingredientes en los alimentos ya que éstos los protegen del deterioro químico como se mencionó anteriormente, también previenen el deterioro de los lípidos en las células, y juegan un papel determinante en la prevención y disminución de radicales libres en el ser humano.

Un antioxidante ha sido definido como aquella sustancia que presente en concentraciones bajas (comparadas con las de un sustrato oxidable), disminuye de forma significativa o bien previene la oxidación de aquél sustrato.

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos categorías: la primera, antioxidantes preventivos o primarios, los cuales actúan al inicio del proceso de oxidación, reduciendo la frecuencia de inicio de una cadena de oxidación, cuando están presentes pueden retrasar o inhibir la etapa de iniciación por reacción con un radical lipídico o inhibir la etapa de propagación mediante la reacción con los radicales peroxilo o alcoxilo; la segunda, antioxidantes secundarios, éstos actúan bloqueando dicha cadena y captan radicales libres, retardando así la velocidad de oxidación[13].

Las fuentes primarias de origen natural de los antioxidantes son los granos enteros, frutas, verduras, vitamina C, vitamina E, carotenos, ácidos fenólicos, fitato y fitoestrógenos principalmente. Los compuestos antioxidantes como ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides eliminan los radicales libres, tales como el peróxido, o hidroperóxido lipídico, inhibiendo los mecanismos oxidativos que conducen a enfermedades degenerativas.

Hay una serie de estudios clínicos que sugieren que los antioxidantes en las frutas, verduras, té y el vino tinto reducen la incidencia de enfermedades crónicas, como las enfermedades del corazón y algunos cánceres[14].

Los polifenoles son considerados como buenos antioxidantes, son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Los antocianos (pigmentos flavonólicos)

tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática[15]. La principal característica de los antioxidantes es la habilidad de atrapar radicales libres.

Por otra parte en un estudio realizado por el grupo de Brand-Williams[16] determinaron el poder antirradical (ARP) de un total de 20 antioxidantes: naturales y sintéticos. Este estudio consistió en hacer reaccionar al radical libre DPPH con cada uno de los 20 antioxidantes por separado, en las figuras 1.2.3.1, 1.2.3.2 y en la tabla 1.2.3.1 se muestran los diferentes grupos sustituyentes (X, Y y Z) situados en el anillo fenólico en las posiciones *orto* y *para* respectivamente.

Figura 1.2.3.1 Estructura general de los antioxidantes.

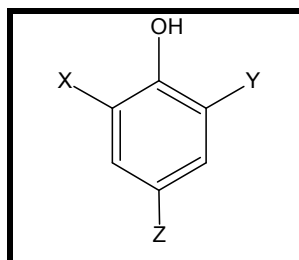


Tabla 1.2.3.1 Estructura de los antioxidantes utilizados en la figura 1.2.3.1

Antioxidantes	X	Y	Z
Fenol	H	H	H
BHA	H	C(CH ₃) ₃	OCH ₃
BHT	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃	CH ₃
Ácido coumárico	H	H	CH=CH-COOH
Vainillina	H	OCH ₃	CHO
Ácido vinílico	H	OCH ₃	COOH
Isoeugenol	H	OCH ₃	:CH=CH-CH ₃
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	CH=CH-COOH
Eugenol	H	OCH ₃	CH ₂ -CH=CH ₂
Zingerona	H	OCH ₃	CH ₂ -CH ₂ COCH ₃
Guaiacol	H	OCH ₃	H
Ácido Protocatéquico	H	OH	COOH
Ácido cafeico	H	OH	CH=CH-COOH
Ácido gentísico	OH	OH	COOH
Ácido Gálico	H	COOH	OH

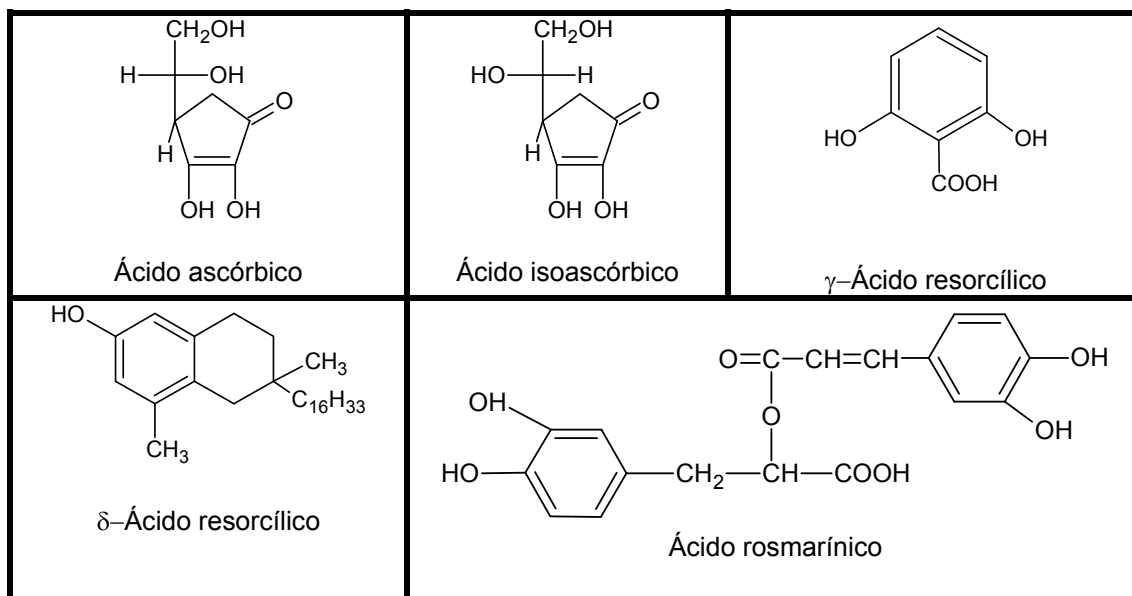


Figura 1.2.3.2 Estructura de los antioxidantes

La determinación del poder antirradical fue obtenida con la siguiente relación:

$$\text{ARP} = 1 / \text{EC}_{50}$$

El término EC_{50} ((mol antioxidante / L) / (mol DPPH) / L) se define como la cantidad necesaria de antioxidante para disminuir al 50% la concentración inicial del radical libre DPPH.

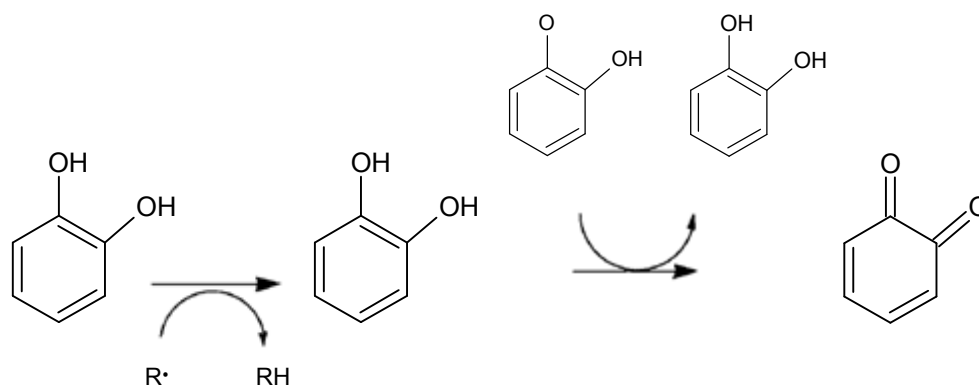
Los resultados de ARP se muestran en la tabla 1.2.3.2, se observa que la actividad antioxidante es mayor para polifenoles que para monofenoles.

Se puede observar también que el ácido cafeico es un compuesto antioxidante más eficiente que el ácido coumárico, su contraparte monofenol (ARP=9.1 y 0.02, respectivamente). El ácido gálico, es un tri-fenol, es más eficiente que el ácido protocatéquico, su contraparte di-fenol (ARP=12.5 y 7.14, respectivamente). En estos experimentos se observó que el ARP es mayor para polifenoles que para monofenoles[17].

Tabla 1.2.3.2 Poder antirradical (ARP)

Antioxidantes	ARP
Isoeugenol	1.94
Ácido ascórbico	3.70
Ácido isoascórbico	3.70
δ - tocoferol	4
Ácido rosmarínico	6.90
Fenol	0.002
Ácido coumárico	0.02
Vainillina	0.05
Ácido vinílico	0.17
γ -Ácido resorcilico	0.36
Ácido ferúlico	2.33
Eugenol	3.7
Zingerona	3.7
Guaiacol	4
BHA	4.17
BHT	4.20
Ácido Protocatéquico	7.14
Ácido cafeíco	9.1
Ácido gentísico	11.1
Ácido Gálico	12.5

La posición del segundo y tercer grupo hidroxilo es importante. Aquellos compuestos cuyo grupo hidroxilo está en la segunda posición *orto* o *para*, tienen una actividad mayor que cuando está en *meta*, como se observa en el ácido resorcilico que es mucho menos eficiente que el ácido protocatéquico y ácido gentísico. La eficiencia en la posición *orto* y *para* en di-fenoles es en parte debido a la estabilización del radical ariloxilo por enlaces de hidrógeno o por la regeneración de otro di-fenol tal como se indica en la figura 1.2.3.3

Figura 1.2.3.3 Mecanismo de la regeneración de un *orto*-difenol.

Por último, Cuvelier y Shahidi[10], reportan que la sustitución en la posición *orto-metoxi* también estabiliza el radical ariloxilo por donación de electrones y por lo tanto aumenta la eficiencia antioxidante y antirradicales. Dos ejemplos son el ácido ferúlico y guayacol, que son más activos que fenol y ácido p-coumárico.

Los antioxidantes BHT y el BTA los cuales se emplean en la industria alimentaria (en los cuales sólo hay un OH en ambos antioxidantes), muestran actividad debido a que se sabe que compuestos con un grupo hidroxilo estéricamente impedido por un grupo t-butilo presentan una alta eficiencia antioxidante[18-19].

La actividad antioxidante que presentan el ácido ascórbico, el isoascórbico, el isoeugenol también se debe a la presencia de los grupos OH en su estructura.

La baja eficiencia que presenta el fenol, ácido coumárico, vainillina y el ácido vinílico, puede ser explicada debido a la presencia de un grupo sustractor de electrones (CHO o COOH). La baja resonancia de este aromático radical fenoxi reduce considerablemente la eficiencia antirradical.

La actividad antioxidante del δ - tocoferol se debe a una dimerización entre dos radicales tocoferoles, donde esta nueva molécula reduce una segunda molécula de DPPH.

1.3 Estudio químico cuántico

En la actualidad, la computadora es un instrumento poderoso que permite resolver problemas reales de investigación en química, de la misma manera en que un espectrómetro de resonancia magnética nuclear permite resolver problemas estructurales. Hoy día, la vinculación de la química experimental y la química teórica es un hecho, debido a que las moléculas estudiadas experimentalmente ya son calculables a niveles elevados y confiables de teoría.

Una teoría muy importante es la teoría de los funcionales de la densidad (DFT). Ésta ha hecho posible el entendimiento de algunos aspectos de la estructura molecular y la reactividad química[20].

Los equilibrios ácido-base son fenómenos muy importantes, con implicaciones no sólo para la química, sino también para otras ciencias campos como la farmacología, medicina, biología, ciencia de los alimentos, etc. Una gran cantidad de compuestos químicos se comportan como ácidos de Brønsted (o bases) en solución acuosa, y su acidez se expresa comúnmente como pKa.

A pesar de que hay varias técnicas experimentales que han sido exitosamente aplicadas para obtener con precisión los valores de pKa, a veces éstas se convierten en un reto desafiante para obtener los valores de pKa. Por lo tanto, no es sorprendente que una gran cantidad de esfuerzo se ha dedicado en las últimas décadas para obtener valores de pKa fiables utilizando métodos teóricos.

Las estrategias más comunes y las tendencias actuales de cálculos de pKa se han revisado recientemente y completamente por Ho y Coote. Teniendo en cuenta toda la información recopilada hasta ahora, se hace evidente que la estimación precisa de pKa utilizando metodologías de cálculo sigue siendo una tarea muy difícil hoy en día. De hecho, en la actualidad desviaciones absolutas menores a 2 unidades de pKa se aceptan para los niveles más altos de la teoría[21].

1.4 Antecedentes

En 1979 un grupo de investigadores de la Republica China mientras examinaba las propiedades antimalariales de derivados de la febrifugina, notaron al realizar pruebas clínicas que un compuesto, la changrolina, era efectiva como un agente antiarrítmico, ver figura 1.4.1

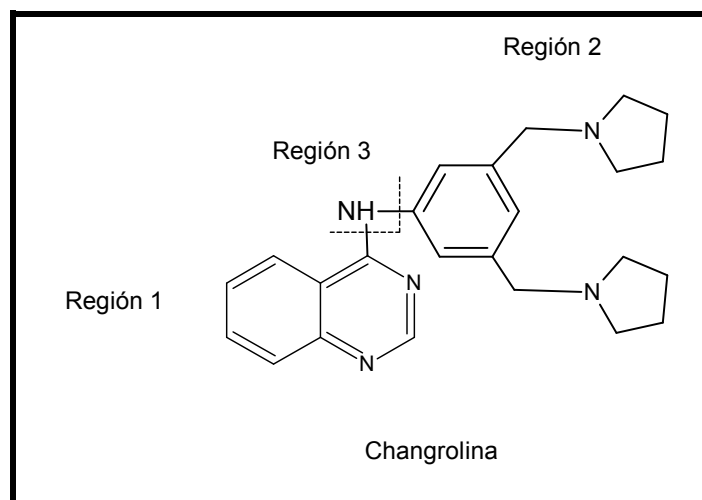


Figura 1.4.1 Compuesto de la Changrolina, el cual está dividido en tres regiones importantes.

Esta molécula puede dividirse en tres regiones: (1) región heteroatómica que contiene la quinazolina, (2) región aromática con el bis(pirrolidimilmetil) fenol, y (3) la región enlazante entre las dos regiones.

Por otra parte en 1983 el grupo de Stout[22] mostró gran interés en esta molécula, ya que su estructura era diferente a los productos existentes en el mercado. Así, retomaron la investigación de Liangquan modificando cada región en orden para determinar las regiones de la changrolina que son necesarias para que la sustancia en cuestión muestre actividad antiarrítmica.

En 1984 y 1985 el grupo de Stout[23-24] continuó con las modificaciones de la changrolina. Encontraron que la región 1, la quinazolina, podía ser reemplazada por una variedad de anillos heteroatómicos sin que ello disminuya la actividad, mientras que en la región 2 se sustituye la pirrolidina por piperidinas, morfolinas y tiomorfolinas.

Se observó que la región 3, que une a las dos primeras, tiene una mayor actividad y una menor toxicidad cuando contiene un grupo carbonilo, incluyendo grupos cetona, amida y urea.

En el año de 1991 el equipo de colaboradores de Coddington[25] determinaron el análisis conformacional de la serie (pirrolidinilmetil) fenol antiarrítmicos de la clase I por métodos de difracción de rayos X (ver figura 1.4.2).

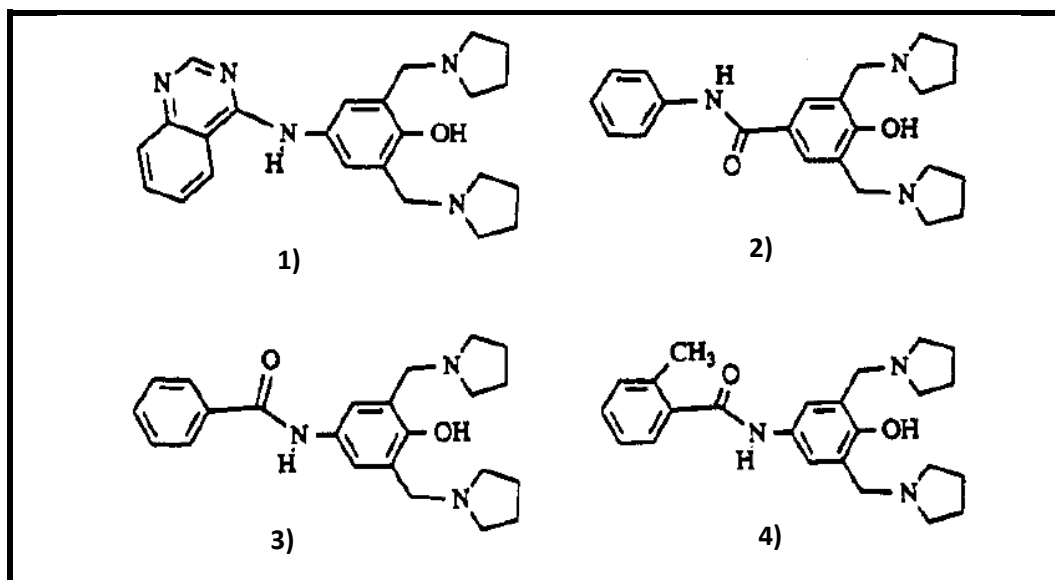


Figura 1.4.2. Estructuras moleculares de antiarrítmicos de la clase I:

- 1) 2,6-bis(1-pirrolidinilmetil)-4-(quinazolin-4-amino)fenol.
- 2) 4-hidroxi-N-fenil-3,5-bis(pirrolidin-1-il-metil)benzamida.
- 3) N-(4-hidroxi-3,5-bis((pirrolidinil-1-il)metil)fenil)benzamida.
- 4) N-(4-hidroxi-3,5-bis((pirrolidinil-1-il)metil)fenil)-2-metilbenzamida.

Hay tres unidades estructurales que son características de los antiarrítmicos de clase I:

(i) Un grupo amina alifática, (ii) un grupo lipófilo, y (iii) una cadena que contiene una interconexión de enlaces de hidrógeno, por lo general un grupo carbonilo.

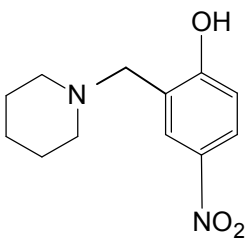
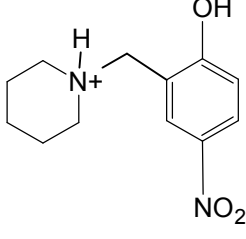
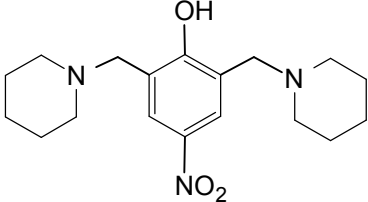
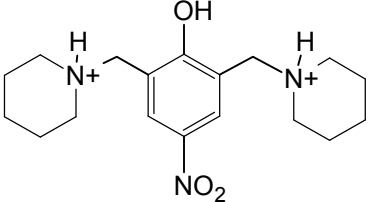
Encontraron que cada estructura tiene un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo OH del fenol y el átomo de N de uno de los anillos de la pirrolidina, sugiriendo también que el anillo libre del puente de hidrógeno intramolecular define la forma activa de las moléculas.

De esta forma en 2006 el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la FES Cuautitlán de la UNAM, dirigido por Doctor Enrique Ángeles[26], retoma la investigación del grupo de Stout y sintetiza una nueva serie de compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos (LQM's) entre los cuales están los que se muestran a continuación en las tablas 1.4.1 y 1.4.2.

Se pretende que estas moléculas presenten actividad biológica como antihipertensivos y menor toxicidad, ya que los LQM's derivan de la changrolina y sus derivados. En 2008[27] y 2010[28] se realizó un estudio para algunos LQM's, observando que éstos presentan una mayor actividad antihipertensiva y antiarrítmica en comparación con algunos fármacos existentes en el mercado.

Así mismo los compuestos LQM's pueden presentar actividad antioxidante ya que la estructura básica que presentan es muy similar a algunos antioxidantes sintéticos y naturales[16, 29].

Tabla 1.4.1 Compuestos piperidínicos sintetizados en el LQM.

Nombre	Estructura	Especie totalmente protonada
4-nitro-2-(1-piperidínilmetil)-fenol	 <p>LQM344</p>	 <p>H₂(LQM344)⁺</p>
4-nitro-2,6-bis(1-piperidínilmetil)-fenol	 <p>LQM345</p>	 <p>H₃(LQM345)²⁺</p>

Continuación de la tabla 1.4.1. Compuestos piperidínicos sintetizados en el LQM.

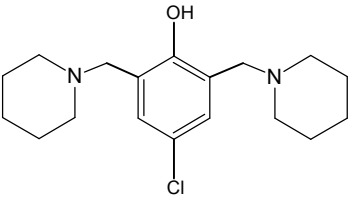
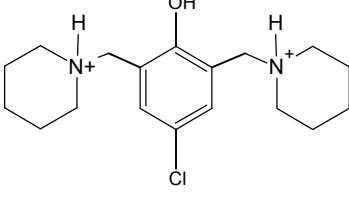
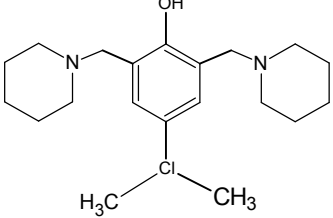
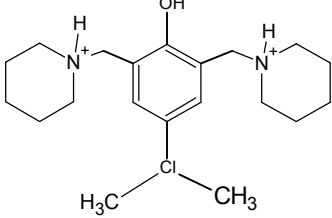
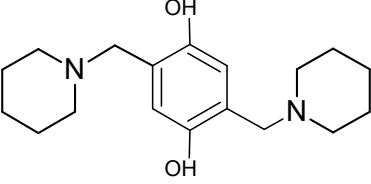
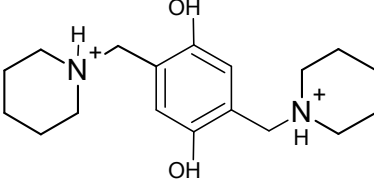
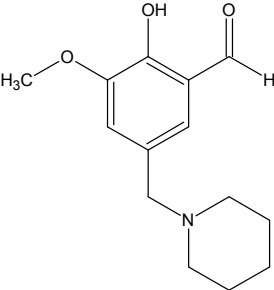
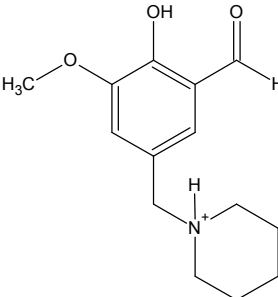
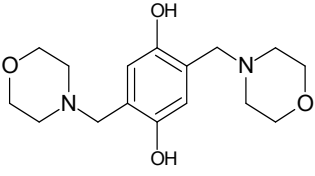
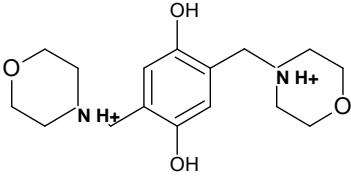
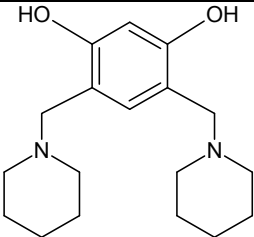
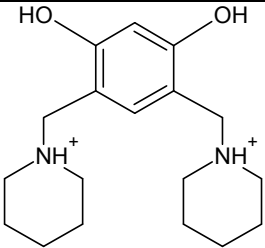
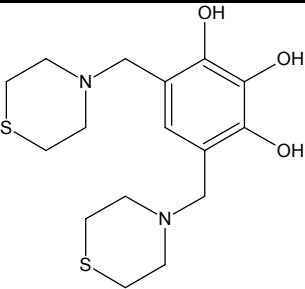
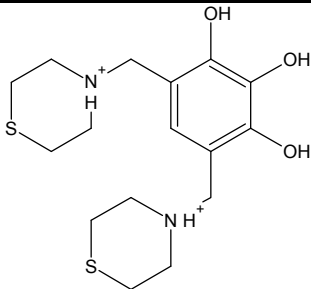
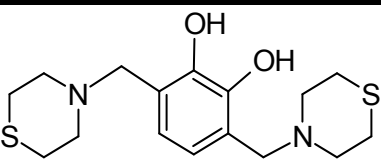
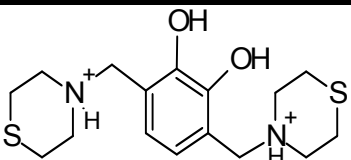
<p>4-cloro-2,6-bis(1-piperidínilmetil)- fenol</p>	 <p>LQM346</p>	 <p>$H_3(LQM346)^{2+}$</p>
<p>4-isopropil-2,6-bis(piperídín-1-ilmetil)fenol</p>	 <p>LQM351</p>	 <p>$H_3(LQM351)^{2+}$</p>
<p>3,6-bis(1-piperidínilmetil)- benceno-1-4diol</p>	 <p>LQM335</p>	 <p>$H_4(LQM335)^{2+}$</p>
<p>2 hidroxi-3-metoxi-5-(piperidnil)metil)benzaldehído.</p>	 <p>LQM336</p>	 <p>$H_2(LQM336)^+$</p>

Tabla 1.4.2 Compuestos morfólinicos y tiomorfolínicos sintetizados en el LQM.

Nombre	Estructura	Especie totalmente protonada
2,5-bis(morfolin-4-ilmetil)benceno-1,4-diol	 <p style="text-align: center;">LQM310</p>	 <p style="text-align: center;">$H_4(LQM310)^{2+}$</p>
2,4-bis(morfolin-4-ilmetil)benceno-1,5-diol	 <p style="text-align: center;">LQM323</p>	 <p style="text-align: center;">$H_4(LQM323)^{2+}$</p>
4,6-bis(tiomorfolin-4-ilmetil)benceno-1,2,3-triol	 <p style="text-align: center;">LQM322</p>	 <p style="text-align: center;">$H_4(LQM322)^{2+}$</p>
3,6-bis(tiomorfolin-4-ilmetil)benceno-1,2-diol	 <p style="text-align: center;">LQM329</p>	 <p style="text-align: center;">$H_4(LQM329)^{2+}$</p>

En el mismo año 2006 el laboratorio de química medicinal también sintetizó compuestos tiomorfolínicos manteniendo la misma estructura, en la cual se incluyeron diferentes sustituyentes en la posición *para*: bromo, nitro, ciano e hidrógeno.

A esta serie de LQM's se les determinaron los valores de pKa[30] con las técnicas Espectrofotometría UV- Vis y Electroforesis Capilar de Zona (CZE, ver Apéndice C[31]). En este estudio también determinaron los coeficientes de partición de los LQM's tiomorfolínicos entre n-octanol y agua, se utiliza el octanol debido a la semejanza en cierta manera con la composición de la membrana lipídica.

A partir de estos coeficientes determinaron que los LQM's cumplen con la regla de Lipinski[32], relacionada con el valor del coeficiente de distribución ($0 < \text{LogP} < 3$) y son buenos candidatos para actuar como fármacos en el organismo.

1.5 Justificación

En un estudio previo[33] se determinaron las constantes de acidez (pKa) mediante la técnica Espectrofotometría UV-Vis (valoraciones ácido-base) para los compuestos piperidínicos LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351 a condiciones pseudofisiológicas 37°C y fuerza iónica 0.15 M.

En este trabajo de doctorado se concluyó este estudio, para ello se determinaron las constantes de acidez mediante la técnica analítica Electroforesis Capilar de Zona (CZE) de los compuestos piperidínicos mencionados anteriormente con el fin de corroborar los valores de pKa.

Hoy día se sabe que es de vital importancia conocer las propiedades ácido-base de los compuestos ya que de esto dependerá su capacidad de atravesar la membrana lipídica, se sabe que las moléculas cargadas eléctricamente atraviesan con dificultad la membrana, y las que no están cargadas la atraviesan con mayor facilidad, es decir; son más liposolubles.

La mayor parte de los fármacos son ácidos o bases débiles que en solución se encuentran en dos formas: ionizada y no ionizada, la fracción ionizada es hidrosoluble, poco liposoluble, y si el tamaño del ion es grande es muy poco difusible; mientras que la no ionizada es liposoluble. La mayor parte de los medicamentos atraviesan la membrana en forma no ionizada, por lo que es de suma importancia el conocer las propiedades ácido-base de los LQM's así como el orden de desprotonación.

Así mismo se llevó a cabo un estudio teórico para poder discutir la acidez relativa de los protones en los diferentes compuestos piperidínicos, para proveer, en su caso, elementos de apoyo dirigidos a la asignación de los valores de pKa obtenidos experimentalmente, así como los mecanismos de desprotonación a partir del estudio teórico realizado para la familia de LQM's piperidínicos.

El estudio teórico está enfocado a los compuestos piperidínicos ya que muestran una estructura similar, desafortunadamente no ocurre lo mismo para los compuestos tiomorfolínicos y morfolínicos, ya que estos presentan estructuras diferentes, es decir, no podría llevarse a cabo una metodología como la utilizada en los derivados piperidínicos para la determinación de los valores de pKa.

Como se mencionó anteriormente los fármacos antihipertensivos que existen en el mercado, presentan efectos secundarios adversos, por lo que el desarrollo de nuevos antihipertensivos es de vital importancia para el ser humano, es por ello que también en este trabajo de doctorado se determinaron los valores de pKa de una nueva serie de compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos, los cuales presentan actividad biológica como antihipertensivos.

Es por ello que la importancia del presente trabajo de tesis radica en la determinación de las propiedades ácido-base de Brønsted bajo condiciones pseudofisiológicas ($T=37^{\circ}\text{C}$ y $I=0.15\text{M}$) de los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos mostrados para estudiar el efecto que presentan los cambios estructurales sobre estos parámetros con el fin de aportar información básica útil para la comprensión de la relación existente entre la estructura molecular y la actividad biológica.

Así mismo se evaluó la capacidad antioxidante de los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos, debido a que su estructura es similar a algunos antioxidantes reportados en la literatura[16].

En la literatura no se encuentran reportes de las constantes de acidez de compuestos piperidínicos a excepción de los mostrados anteriormente en las tablas 1.4.1[34] sin contar al LQM335 y LQM336. Lo mismo sucede con las constantes de acidez de los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos, no existen reportes de estas constantes.

A continuación se describen los objetivos generales y particulares de este trabajo de doctorado.

1.6 Objetivos generales

- Determinar las constantes de acidez de los LQM's piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos en medio acuoso y en condiciones pseudofisiológicas (temperatura de 37 °C y fuerza iónica 0.15M), utilizando las técnicas Espectrofotometría UV-Visible y Electroforesis Capilar de Zona (CZE).
- Proponer una metodología para determinar los valores de pKa por cálculos de la Química Computacional para una familia de este tipo de compuestos.
- Evaluación de la capacidad antioxidante de todos los LQM's.

1.7 Objetivos particulares

- Elaboración de pruebas de estabilidad de los LQM's: LQM344, LQM345, LQM346, LQM351, LQM336, LQM335, LQM310, LQM323, LQM322 y LQM329.
- Estudiar el comportamiento ácido-base de todos los LQM's, con el objetivo de identificar las diferentes especies formadas en función del pH.
- Determinación espectrofotométrica de las constantes de acidez de todos LQM's en medio acuoso utilizando el programa computacional SQUAD (apéndice A).
- Por medio de CZE determinar las constantes de acidez de cada uno de los LQM's en medio acuoso utilizando el programa computacional SQUAD.
- Realizar un estudio metodológico con cálculo teóricos que permita establecer una estrategia de cálculo que reproduzca los pKas de las piperidinas con exactitud comparable a la experimental para los LQM's: LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351.

- Asignar el orden de desprotonación de los compuestos piperidínicos mediante el uso de cálculos teóricos para los LQM's: LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351.
- Evaluación de la capacidad antioxidante de todos los LQM's utilizando el radical libre DPPH.

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ CON LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis Y ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE) DE LOS COMPUESTOS PIPERIDÍNICOS.

Parte experimental Espectrofotometría UV-Vis (valoraciones ácido-base)

Reactivos

Se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) al 99% (Merck), ácido clorhídrico (HCl) al 37% (Merck), los compuestos LQM's fueron proporcionados y sintetizados por el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la FES-UNAM, dirigidos por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano. La pureza de los compuestos sintetizados se verificó al obtener en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C señales correspondientes a un solo compuesto con la fórmula mínima esperada.

Las soluciones se prepararon con agua desionizada y libre de CO_2 (Tipo I, Millipore, Milli-Q Gradient). A las diferentes soluciones obtenidas se les determinó su espectro de absorción con un espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 950, utilizando celdas de cuarzo de una longitud de paso óptico igual a 1 cm.

Mediciones de pH

El pH de las soluciones fue medido con un potenciómetro Tacussel LHP 430T equipado con un electrodo combinado radiometer analytical F-69627, para mediciones en el intervalo de 0-12 unidades de pH. Este electrodo se utilizó para los experimentos a fuerza iónica 0.15 M

También se utilizó un electrodo combinado radiometer analytical para mediciones en el intervalo de 0-14 unidades de pH. Este electrodo se utilizó para los experimentos a fuerza iónica variable.

La incertidumbre en las medidas de pH es la siguiente ± 0.001

Se corrigieron los valores de pH de acuerdo con la ecuación 2.1

$$\text{pH}_{\text{corregido}} = \text{pH}_{\text{experimental}} + \left[\frac{\text{pH}_{\text{calibración}} - \text{pH}_{\text{experimental}}}{\text{pH}_{\text{calibración}}} \right] E_f \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde

E_f es la eficiencia electromotriz del electrodo de vidrio

La ecuación anterior es análoga a la descrita por Westcott[35] y Bates[36].

2.1 Pruebas de estabilidad de los LQM's

Se realizaron las pruebas de estabilidad de los diferentes LQM's con el propósito de obtener el intervalo de tiempo de trabajo durante el cual se llevaron a cabo las valoraciones ácido-base.

A continuación se describe la metodología desarrollada, ésta es la que se maneja en el área de química analítica de la UAM-I.

Se preparó una solución del compuesto a una concentración inicial C_o en medio ácido (0.01 M HCl, previamente valorada) y otra a una concentración C_o' en medio básico (0.01 M NaOH, previamente valorada), a ambas soluciones se les agregó NaCl para imponer la fuerza iónica 0.15 M, se toma el pH inicial a la solución ácida y a la solución básica, así como también el espectro de absorción UV-Vis.

Estas soluciones se monitorean conforme transcurre el tiempo para ver si hay un cambio en el pH, así como también en el espectro de absorción, una vez realizadas las pruebas se determina el tiempo en el cual se trabajará con las soluciones, así como la concentración óptima para el experimento con el fin de tener una buena lectura en los valores de absorbancia.

La metodología mencionada es la misma para todos los LQM's.

2.2 Valoraciones espectrofotométricas ácido –base

Se llevaron a cabo las valoraciones ácido-base de los compuestos, la metodología desarrollada es similar a la del grupo de Moya[37], la cual está diseñada para realizar los experimentos a fuerza iónica 0.15 M manteniendo fija la concentración del LQM en todo el experimento.

2.2.1 Preparación de soluciones.

Fuerza iónica 0.15 M

Solución stock LQM

Se pesan aproximadamente “m” mg del LQM, se pasan a un matraz volumétrico de “y” mL, y se disuelve el LQM en la mínima cantidad de metanol, ya que los compuestos piperidínicos no son solubles en agua, llevando a volumen de aforo con agua desionizada. Pada compuesto piperidínico se disuelve 5 mg en 2 mL aproximadamente metanol.

Los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos se disuelven 5 mg en 0.5 mL de HCl 0.1 M aproximadamente.

Solución ácida

De la solución stock se toman “x” mL, se transfieren a un matraz volumétrico de “z” mL, se le agrega NaCl y un cantidad tal de mL de HCl (0.01M) para mantener la fuerza iónica de 0.15 M, llevando el volumen de aforo con agua desionizada.

Solución básica

De la solución stock se toman “x” mL, se transfieren a un matraz volumétrico de “z” mL, se le agrega NaCl y un cantidad tal de mL de NaOH (0.01M) para mantener la fuerza iónica de 0.15 M, llevando el volumen de aforo con agua desionizada.

Fuerza iónica variable

S utilizó fuerza iónica variable debido a que el intervalo de pH se amplió $1 \leq \text{pH} \leq 13$ debido que en los gráficos de pH vs Absorbancia a una cierta longitud de onda, la curva (sigmoide) mostraba que podía haber más valores de pKa tanto en medio muy básico como ácido, específicamente para el LQM335, LQM310, LQM323, LQM322 y LQM329.

Solución stock LQM

Esta solución es la misma que se utilizó en los experimentos a fuerza iónica 0.15 M

Solución ácida

De la solución stock se transfieren " x_1 " mL y se adicionan a un matraz volumétrico de " z_1 " mL, a este matraz se adiciona un volumen de HCl (previamente valorado) para obtener una concentración final de 0.01M de HCl, llevando al aforo con agua desionizada.

Solución básica

Se adiciona a un matraz volumétrico de " z_1 " mL un volumen y de NaOH (previamente valorada) para obtener una concentración final de 0.1M de NaOH, llevando el volumen al aforo con agua desionizada.

2.2.2 Procedimiento experimental

A continuación se describe la parte experimental de las valoraciones ácido-base.

1. Se monta un sistema conectando la celda termostatada con el baño (37°C), posteriormente a esta celda se agregan por medio de una pipeta volumétrica " x_2 " mL de la solución ácida, manteniendo en agitación constante y se introduce el electrodo combinado, se mide el pH inicial de la solución; cubriéndola del medio ambiente, a continuación se hace burbujear el sistema con N_2 .
2. Se realiza la calibración del espectrofotómetro, empleando agua desionizada como blanco, se seleccionan los parámetros en los cuales se realizaran las mediciones.
3. Se toma una muestra de solución ácida en una celda de cuarzo, se lleva al espectrofotómetro, para realizar el barrido, después se regresa la muestra al sistema.
4. Se agregan al sistema volúmenes de la solución básica en cantidades necesarias para aumentar de 0.1 a 0.3 unidades de pH.
5. Se registra el aumento de pH y se toma una muestra de la solución ácida en cada caso para realizar su barrido correspondiente, se continúa el mismo procedimiento para llegar a pH de 7.
6. Para el caso de la solución básica, se realizan los pasos análogos del 1 al 5.
7. Cada experimento se realiza por triplicado.

En algunos casos se modificó la parte experimental ya que se realizó el barrido de pH desde 2 a 12 en un solo experimento.

Parte experimental CZE

Reactivos

Se utilizó NaOH (99%, Merck) y HCl (37%, Merck) para preparar soluciones ácidas y básicas con el propósito de ajustar el pH de los amortiguadores en los experimentos en CZE. Se utilizó acetona (grado espectroscópico, Baker), fosfato diácido de sodio NaH_2PO_4 y fosfato disódico Na_2HPO_4 (99%, Filluka), fosfato de sodio Na_3PO_4 (96%, Aldrich), y ácido fosfórico H_3PO_4 (85.4%, Baker), los fosfatos mencionados anteriormente fueron empleados para preparar soluciones stock de los amortiguadores para las pruebas con los diferentes LQM's. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada (18.2 M Ω -cm), purificada con el equipo Millipore Milli-Q Gradient.

Los experimentos en CZE se llevaron a cabo en un equipo Beckman P/ACE MDQ con un detector de arreglo de diodos. Se utilizó un capilar de sílice con 50 μm de diámetro interno, con una longitud total del capilar de $L_T = 50.2 \text{ cm}$ y una longitud efectiva al detector $L_d = 40 \text{ cm}$ cuando se inyectó por el lado largo y una $L_d = 10.2 \text{ cm}$ cuando se inyectó por el lado corto. La inyección de la muestra fue hidrodinámica usando 1.0 psi por 5 segundo. La temperatura fue impuesta a 37 °C, y un Voltaje (V) de 20 kV.

2.3 Preparación de soluciones

Soluciones Stock amortiguadoras de fosfatos y LQM's

Para imponer el pH en los experimentos se utilizaron soluciones amortiguadoras de fosfatos a diferentes valores de pH, manteniendo una concentración final de 50 mM en todos los casos. Se ajustó el pH con una solución de NaOH 0.1 M ó HCl 0.1 M según el pH requerido. Las soluciones de los LQM335, LQM336, LQM310, LQM322 y LQM329 fueron preparadas pesando aproximadamente 5 mg de cada compuesto y disolviendo en la mínima cantidad de metanol el LQM335 y en la mínima cantidad de HCl 0.1 M los

compuestos LQM336, LQM310, LQM322 y LQM329 aproximadamente. El LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351 se disuelven 5 mg en 2 ml de metanol aproximadamente.

2.3.1 Acondicionamiento del capilar.

El capilar fue lavado con una solución 0.1 M de NaOH por 5 minutos a una presión de 20 psi, posteriormente se lavó con agua desionizada por 5 minutos a 20 psi por 5 minutos.

Acondicionamiento del capilar de sílice:

Se hace pasar una solución de NaOH 0.1 M durante 5 minutos a una presión de 20 psi en el capilar a una temperatura de 25 °C con el fin retirar las posibles impurezas y activar los grupo silanol de la sílice fundida de la que está constituido el capilar, posteriormente se hace pasar una corriente de agua desionizada por 5 minutos a una presión de 20 psi para retirar el exceso de hidróxido de sodio. Este procedimiento se realizó en todos los experimentos antes y al término de las separaciones electroforéticas. Para los experimentos en CZE se utilizó una temperatura de 25 °C para los LQM´s LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351, para los demás compuestos los experimentos se realizaron a 37 °C.

2.3.2 Método empleado para la separación electroforética.

Se hizo un lavado a una presión de 20 psi durante 0.5 min con la solución de NaOH 0.1M en el capilar, enseguida se lavó agua desionizada a una presión de 20 psi durante 0.5 min y por último con la solución amortiguadora de fosfatos al pH requerido, a una presión de 20 psi durante 0.5 min. Posteriormente se llevó a cabo la inyección de la muestra LQM' a una presión de 1 psi durante 5 seg.

Nota. En la muestra (aproximadamente 2 mL) se agrega 10 µL de acetona como marcador de flujo electroosmótico.

Una vez inyectada la muestra se llevó a cabo la separación empleando un voltaje de 20 kV por el tiempo necesario para ver pasar por la ventana las sustancias inyectadas. Este experimento se repite por triplicado, los experimentos se realizaron a una temperatura de 37°C.

RESULTADOS

2.4 Compuestos piperidínicos

Estabilidad de los compuestos piperidínicos.

Se realizaron las pruebas de estabilidad del LQM344 con el fin de obtener el intervalo de tiempo de trabajo durante el cual se realizaran las valoraciones ácido-base. A continuación se muestran los espectros de la solución ácida y solución básica del compuesto LQM344 a distintos tiempos después de su preparación figura 2.4.1

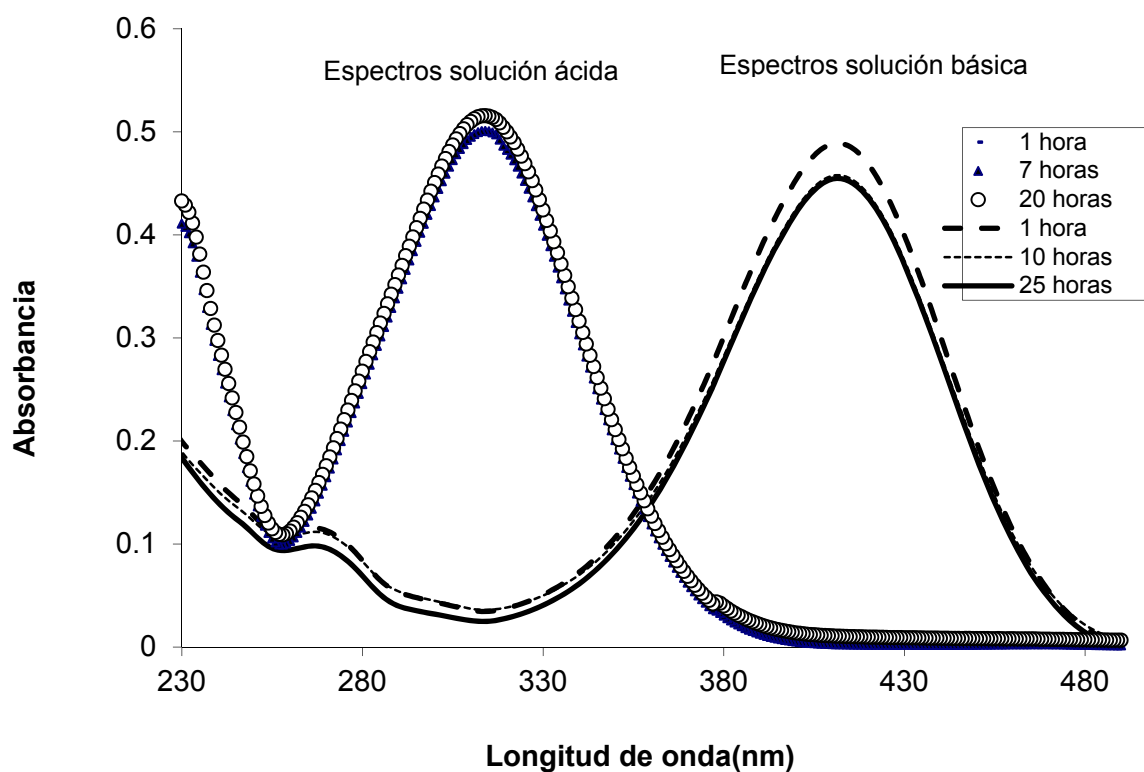


Figura 2.4.1 Espectros de absorción del LQM344 solución ácida $6.8 \times 10^{-5} \text{M}$ (marcadores) y solución básica $3.4 \times 10^{-5} \text{M}$ (líneas sólidas).

En la figura 2.4.1 se puede observar poca variación en los espectros de absorción tanto en la zona ácida como en la básica, esta variación puede ser atribuida al cambio de pH en la solución, debido a que esta solución no ha sido amortiguada.

Para un mejor análisis, a continuación se muestran las gráficas de pH vs absorbancia, para la longitud de onda que presenta un máximo de absorbancia en 314 nm (solución ácida), así como también la gráfica de pH vs tiempo, figura 2.4.2

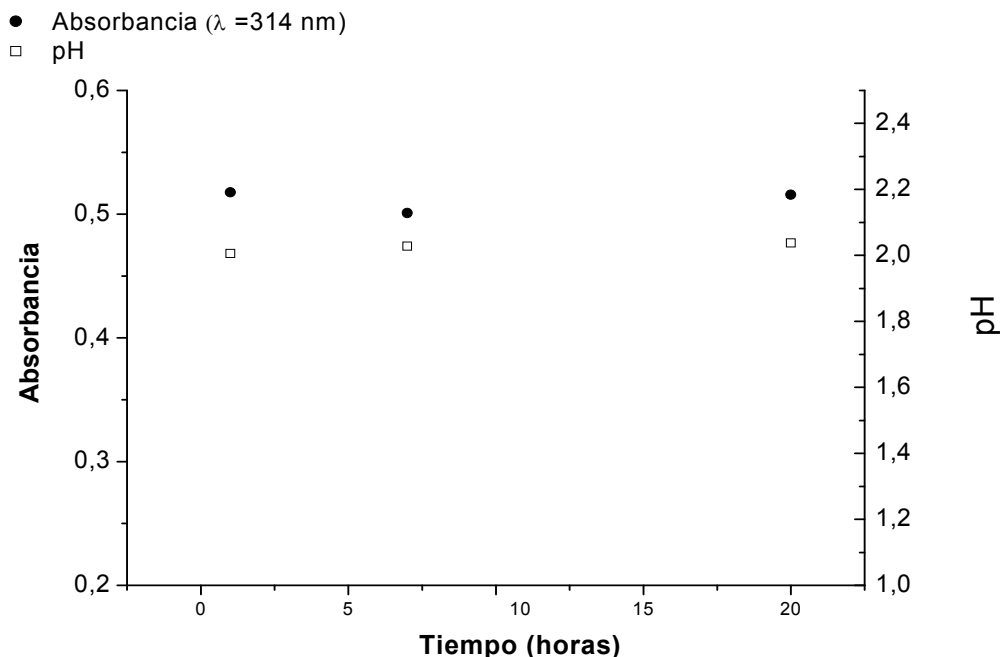


Figura 2.4.2 Absorbancia vs tiempo y pH vs tiempo para el LQM344 solución ácida $6.8 \times 10^{-5} M$.

En la figura 2.4.2 se puede observar que esta solución prácticamente es estable al menos en un intervalo de tiempo de 20 horas posterior a su preparación.

Las ligeras fluctuaciones que se observan en la figura 2.4.2 no exceden el 2% en el pH y el 3.3 % en la absorbancia. La solución básica muestra un comportamiento similar, las ligeras fluctuaciones no exceden el 1% en el pH y el 5 % en la absorbancia para una longitud de onda que presenta un máximo de absorbancia en una longitud de onda de 410 nm en al menos 25 horas posteriores a su preparación.

Como resultado de estas pruebas tanto en la solución ácida como en la básica se decidió a trabajar con soluciones recién preparadas, como cada valoración ácido base se realizó al menos en tres ocasiones, en cada experimento se preparó una solución nueva, el tiempo en el cual se realizaron las valoraciones no fue mayor a 10 horas para cada experimento, la variación que se tiene en las medidas de absorbancia como ya se mencionó son menores al 5%.

Se realizaron las pruebas de estabilidad del LQM345 con el fin de obtener el intervalo de tiempo de trabajo durante el cual se realizaran las valoraciones ácido-base.

A continuación se muestran los espectros de la solución ácida y básica del compuesto LQM345 a distintos tiempos después de su preparación figura 2.4.3

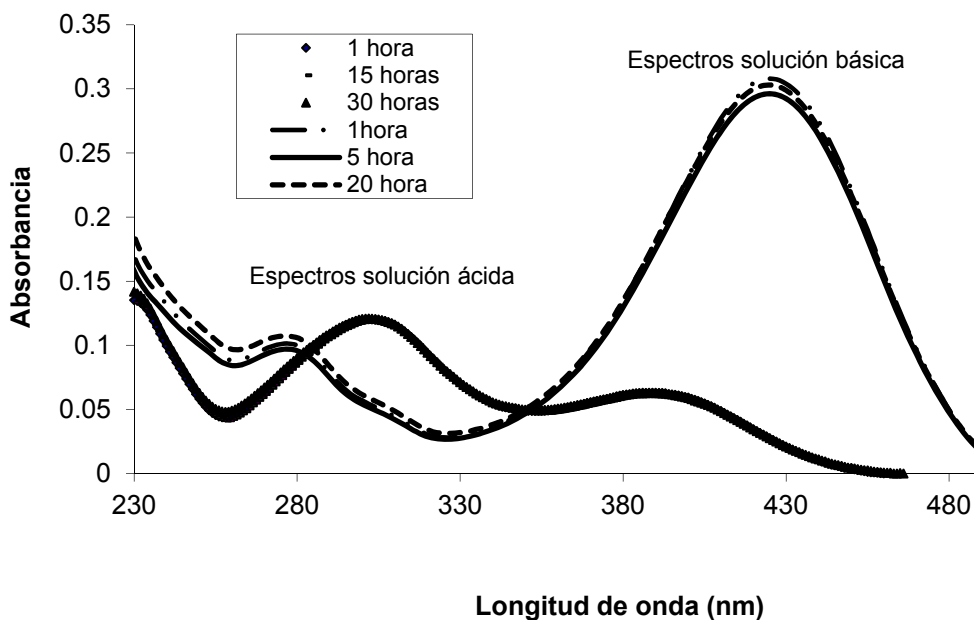


Figura 2.4.3 Espectros de absorción del LQM345 solución ácida $2.016 \times 10^{-5} \text{M}$ (marcadores) y solución básica $2.016 \times 10^{-5} \text{M}$ (líneas sólidas).

En la figura 2.4.3 se puede observar una variación en los espectros de absorción, esta variación puede ser atribuida al cambio de pH en la solución, debido a que esta solución no ha sido amortiguada.

Para un mejor análisis, a continuación se muestra en la figura 2.4.4, las gráficas de pH vs absorbancia, para las longitudes de onda que presentan un máximo de absorbancia en 302 y 388 nm (solución ácida), así como también la gráfica de pH vs tiempo.

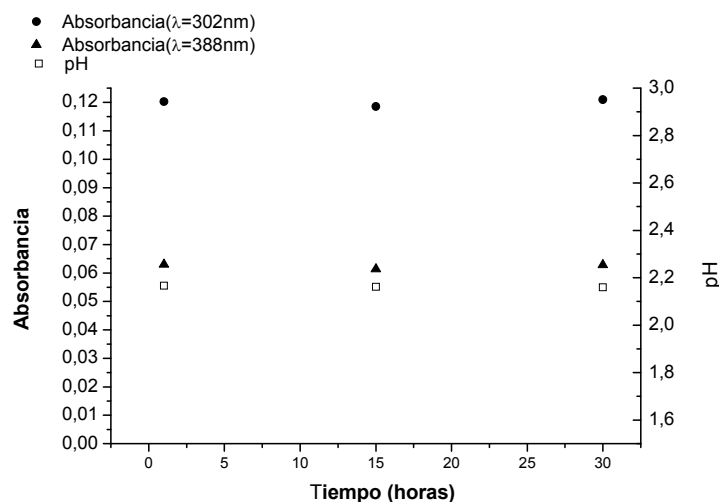


Figura 2.4.4 Absorbancia vs tiempo y pH vs tiempo para el LQM345 solución ácida $2.016 \times 10^{-5}\text{M}$.

Para la longitud de onda que presenta un máximo de absorbancia en 302 y 388 nm (solución ácida), las ligeras fluctuaciones que se observan en los espectros a diferentes tiempos no exceden el 1% en el pH y el 3 % en la absorbancia en al menos 30 horas posteriores a su preparación.

La solución básica muestra un comportamiento similar, las ligeras fluctuaciones no exceden el 1% en el pH y el 4 % en la absorbancia para una longitud de onda que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 424 nm.

Como resultado de estas pruebas en la solución ácida como en la básica se decidió a trabajar con soluciones de trabajo recién preparadas, es decir en cada experimento se preparó una solución nueva, el tiempo en el cuál se realizaron las valoraciones no fue mayor a 7 horas para cada experimento, la variación que se tiene en las medidas de absorbancia como ya se mencionó es menor al 4%.

Los compuestos LQM346 y LQM351 mostraron un comportamiento similar, las fluctuaciones no exceden el 5% en el pH y 6% en las lecturas de absorbancia una vez preparadas las soluciones. Se observó que estas soluciones precipitaban con el tiempo, de ahí que se trabajó con las soluciones lo más diluido posible para evitar este efecto.

VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE

A continuación se muestran en las figuras 2.4.5.a y 2.4.5.b algunos espectros representativos de la familia de espectros del LQM344 tanto en medio ácido como en medio básica a una temperatura de 37 °C y fuerza iónica 0.15 M

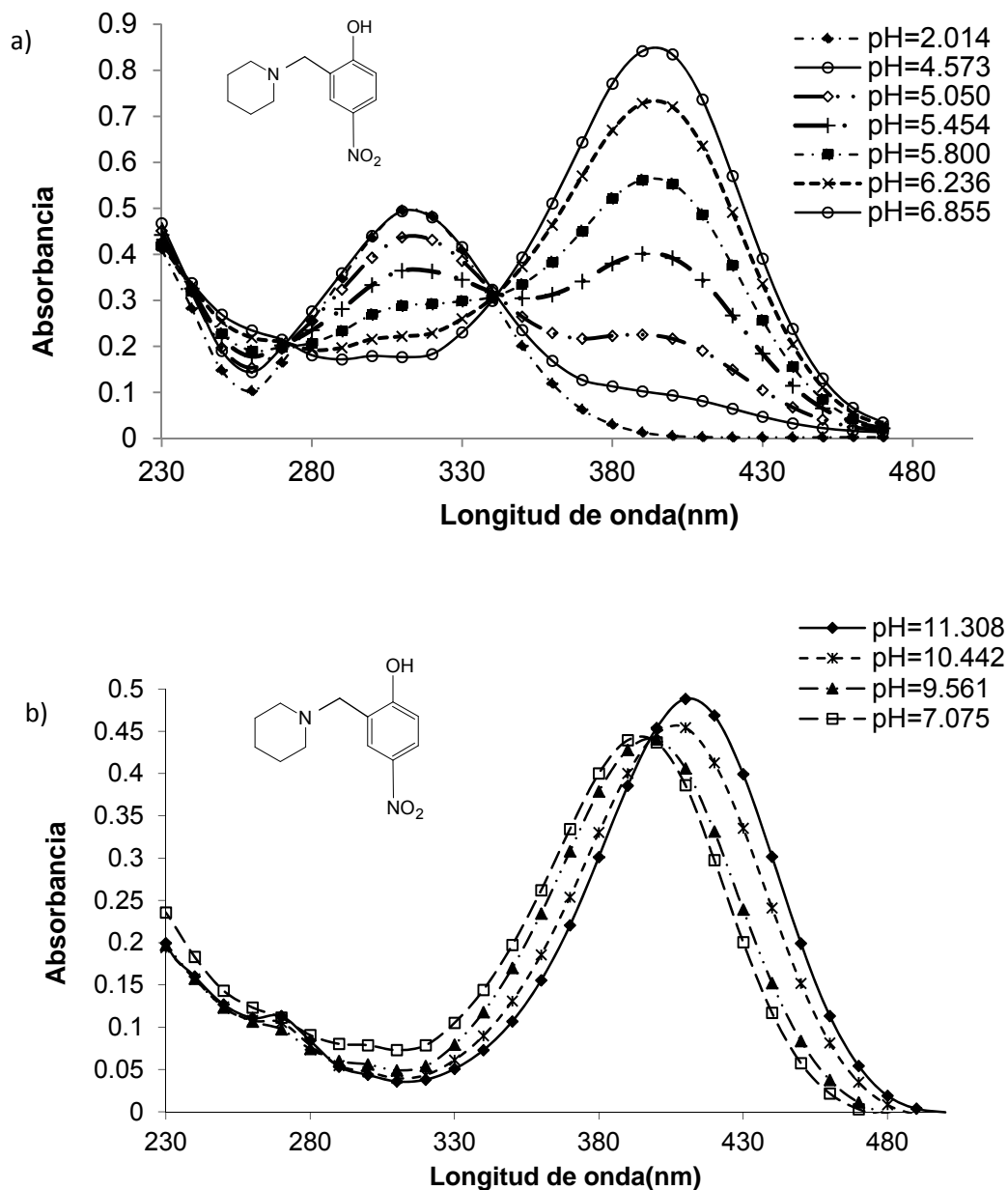


Figura 2.4.5 Espectros de absorción del LQM344. (a) $[LQM344] = 6.8 \times 10^{-5}$ M en el intervalo de $2 \leq \text{pH} \leq 7$ (b) $[LQM344] = 3.4 \times 10^{-5}$ M en el intervalo $7 \leq \text{pH} \leq 12$.

A continuación se muestran en las figuras 2.4.6.a y 2.4.6.b algunos espectros representativos de la familia de espectros del LQM345 tanto en medio ácido como en medio básica una temperatura de 37 °C y fuerza iónica 0.15 M.

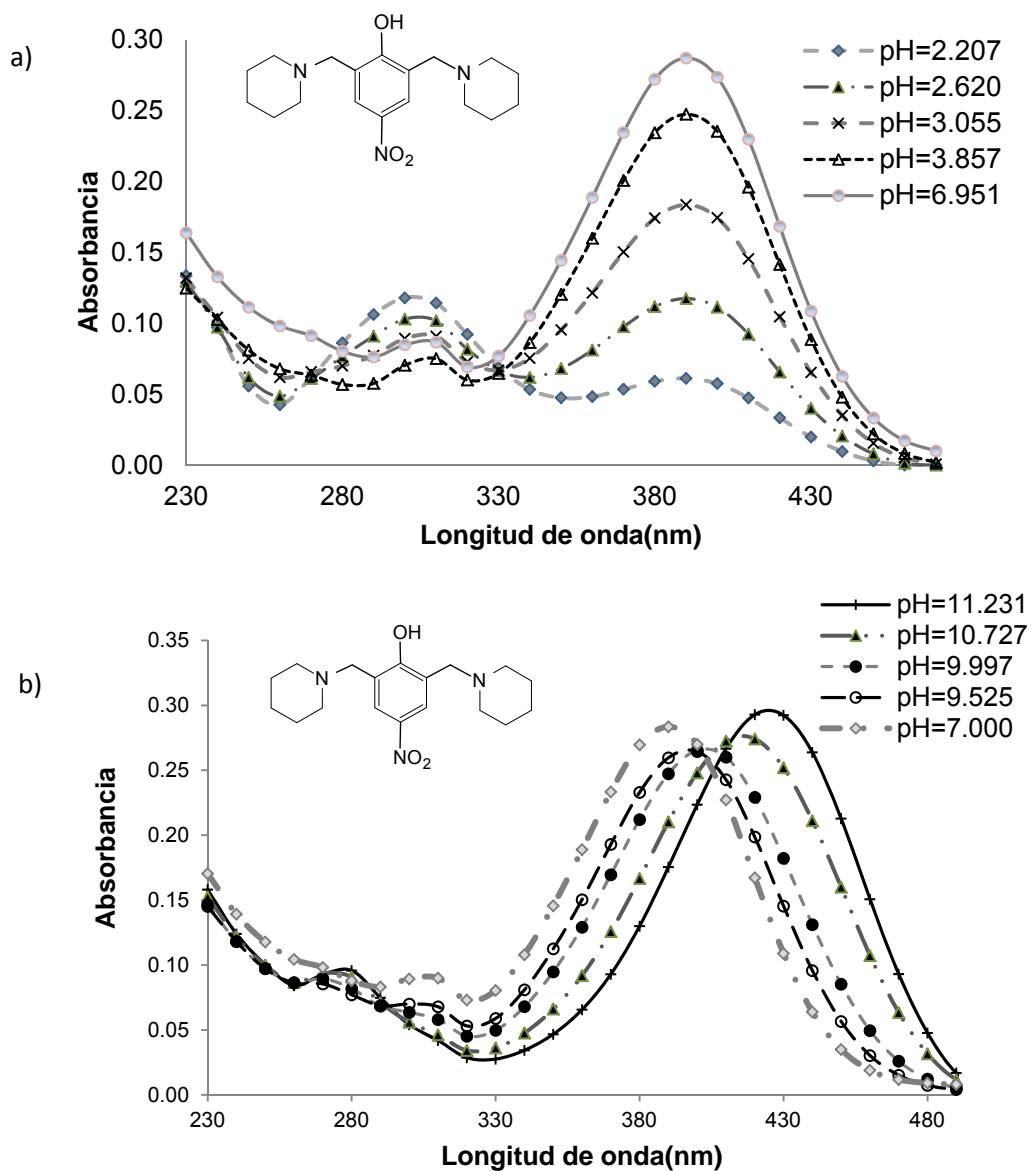


Figura 2.4.6 Espectros de absorción del LQM345. (a) [LQM345] = 2.016×10^{-5} M en el intervalo $2 \leq \text{pH} \leq 7$. (b) [LQM345] = 2.016×10^{-5} M en el intervalo $7 \leq \text{pH} \leq 12$.

En la figura 2.4.5.a se observan dos máximos de absorbancia en 314 y 392 nm respectivamente a diferentes valores de pH. Se hace notar la presencia de 2 puntos isobésticos en 272 y 341 nm, los cuales nos sugieren de un equilibrio ácido-base en este intervalo de pH. En el máximo de 392 nm se presenta un efecto hipercrómico y en 314 nm un efecto hipocrómico conforme el aumento de pH.

En la figura 2.4.5.b se observa un máximo de absorbancia en 410 nm y conforme disminuye el pH este se desplaza hasta 393 nm a diferentes valores de pH. Se observa que no todas las curvas pasan por un punto isobéstico, hay un desplazamiento de éste, esto también nos sugiere la existencia de un equilibrio ácido-base para este intervalo de pH. Se muestra un efecto hipocrómico e hipsocrómico con la disminución en el pH.

El compuesto LQM344 presenta dos posibles desprotonaciones, una en el OH del anillo fenólico y la otra en el átomo de nitrógeno correspondiente en la piperidina.

En la figura 2.4.6.a se observan dos máximos de absorbancia en 299 y 388 nm a diferentes valores de pH. Se hace notar la presencia de 2 puntos isobésticos en 334 y 270 nm los cuales nos sugieren la existencia de un equilibrio ácido-base en este intervalo de pH. A una longitud de 299 nm se presenta un efecto hipocrómico y a 388 nm se presenta un efecto hipercrómico con el incremento del pH.

En la figura 2.4.6.b se observa un máximo de absorbancia en 424 nm y conforme disminuye el pH este se desplaza hasta 388 nm a diferentes valores de pH. Se observa que no todas las curvas pasan por un punto isobéstico ($\lambda=408$ nm), hay un desplazamiento de éste, esto también nos sugiere la existencia de un equilibrio ácido-base para este intervalo de pH. Se muestra también un efecto hipocrómico e hipsocrómico con la disminución del pH en la longitud de onda 424 nm.

El compuesto LQM345 presenta tres posibles desprotonaciones, una en el OH del anillo fenólico y las otras dos en los átomos de nitrógeno correspondientes a las piperidinas.

A continuación se muestran en las figuras 2.4.7.a y 2.4.7.b algunos espectros representativos de la familia de espectros del LQM346 tanto en medio ácido como en medio básica a una temperatura de 37 °C y fuerza iónica 0.15 M.

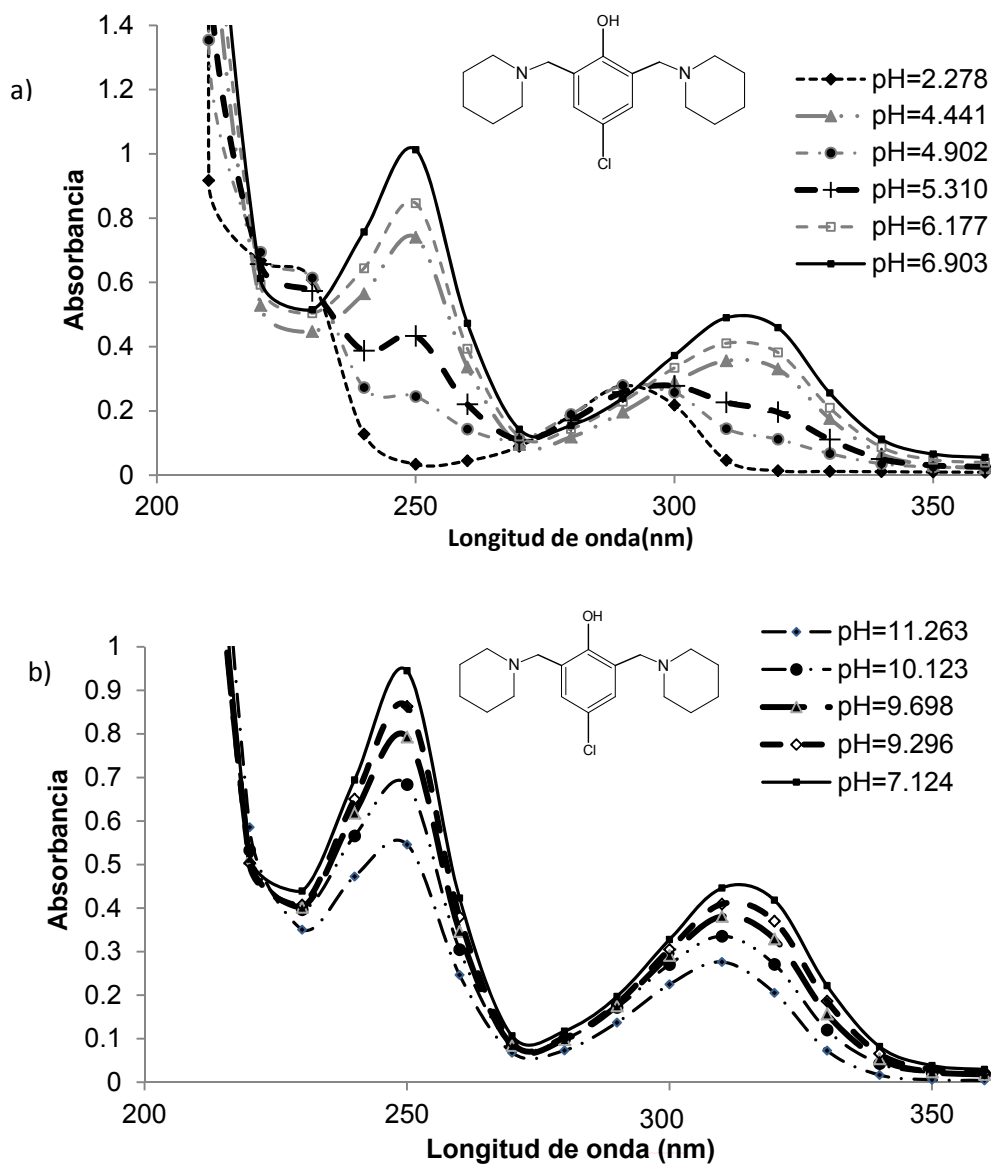


Figura 2.4.7 Espectros de absorción del LQM346. (a) $[LQM346] = 1.015 \times 10^{-5} M$ en el intervalo de $2 \leq pH \leq 7$ (b) $[LQM346] = 1.015 \times 10^{-5} M$ en el intervalo $7 \leq pH \leq 12$.

A continuación se muestran en las figuras 2.4.8.a y 2.4.8.b algunos espectros representativos de la familia de espectros del LQM351 tanto en medio ácido como en medio básica una temperatura de 37 °C y fuerza iónica 0.15 M.

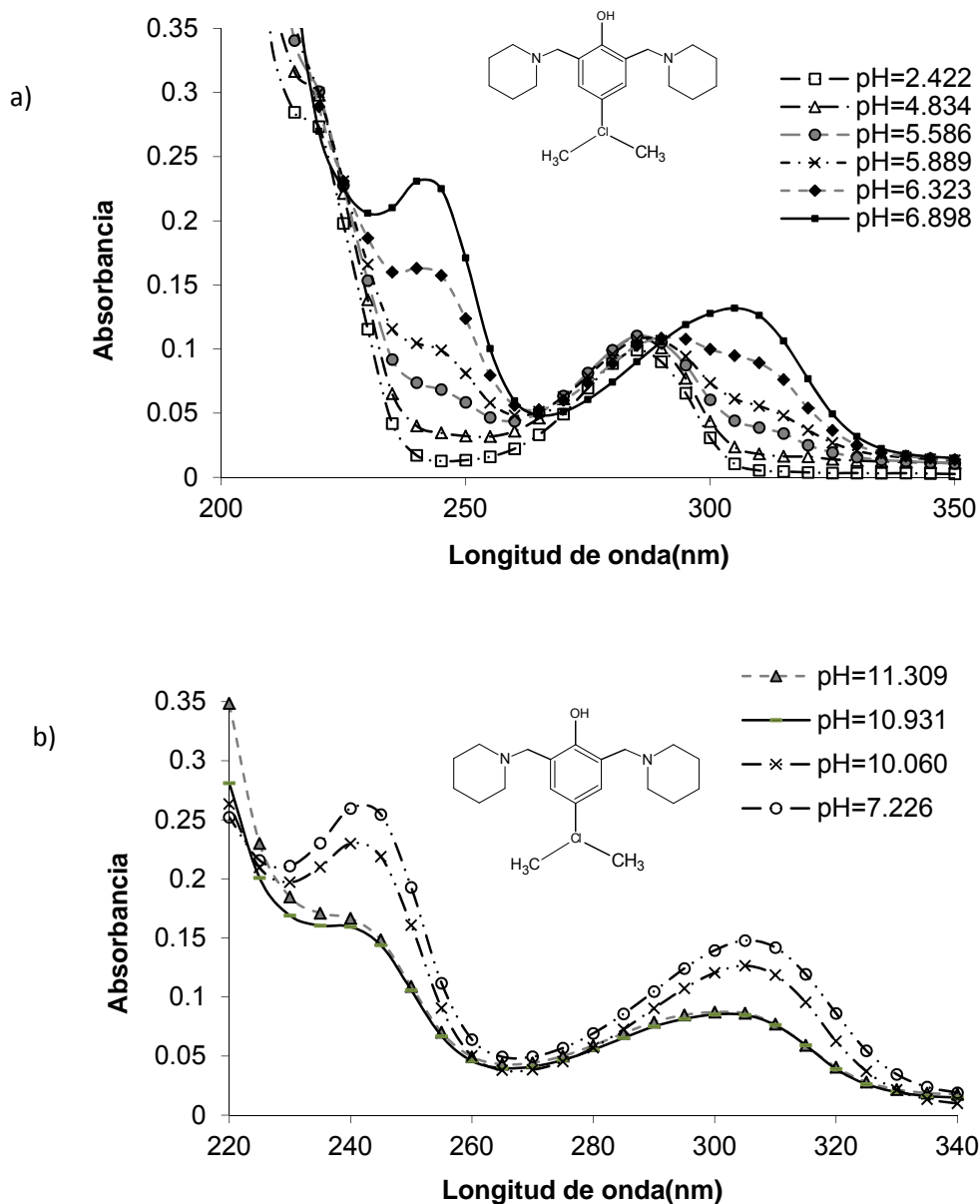


Figura 2.4.8 Espectros de absorción del LQM351. A) $[LQM351] = 3.144 \times 10^{-5} \text{ M}$ en el intervalo de $2 \leq \text{pH} \leq 7$. (b) $[LQM351] = 3.144 \times 10^{-5} \text{ M}$ en el intervalo de $7 \leq \text{pH} \leq 12$.

En la figura 2.4.7.a se observan dos máximos de absorbancia en 247 y 313 nm respectivamente a diferentes valores de pH. Se hace notar la presencia de 4 puntos isobéticos en 219, 232, 274 y 293 nm, los cuales nos sugiere la presencia de un equilibrio ácido-base para este intervalo de pH. A la longitud de 247 nm se presenta un efecto hipercrómico y un efecto hipocrómico en 313 nm con el incremento de pH.

En la figura 2.4.7.b se observan dos máximos de absorbancia en 249 y 313 nm respectivamente a diferentes valores de pH. Se observa un efecto hipercrómico para las longitudes de onda en 249 y 313 nm con la disminución del pH.

El compuesto LQM346 presenta tres posibles desprotonaciones, una en el OH del anillo fenólico y las otras dos en los átomos de nitrógeno correspondientes a las piperidinas.

En la figura 2.4.8.a se hace notar la presencia de dos máximos de absorbancia en 242 y 310 nm respectivamente a diferentes valores de pH. Se presentan 3 puntos isobésticos en 219, 270 y 290 nm los cuales nos sugieren la existencia de al menos un equilibrio ácido-base en este intervalo de pH. Se presenta un efecto hipercrómico con el incremento de pH para las longitudes de onda de 242 y 310 nm.

En la figura 2.4.8.b se hace notar la presencia de dos máximos de absorbancia en 249 y 313 nm respectivamente a diferentes valores de pH. Se presenta un efecto hipercrómico con la disminución del pH para las longitudes de onda que presentan un máximo de absorbancia.

El compuesto LQM351 presenta tres posibles desprotonaciones, una en el OH del anillo fenólico y las otras dos en los átomos de nitrógeno correspondientes a las piperidinas.

Una vez que se llevaron a cabo valoraciones ácido-base, se introducen los datos de absorbancia en función del pH al programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes. En la tabla 2.4.1 se muestran los parámetros utilizados en cada refinamiento.

Tabla 2.4.1 Parámetros utilizados en el programa SQUAD

LQM's	Número de espectros	Intervalo de longitud de onda (λ)	Intervalo de pH
LQM344	16	$230 \leq \lambda \leq 470$, 10 nm	$2.014 \leq \text{pH} \leq 7.030$
	16	$230 \leq \lambda \leq 490$, 10 nm	$6.859 \leq \text{pH} \leq 11.308$
LQM345	23	$230 \leq \lambda \leq 470$, 10 nm	$2.207 \leq \text{pH} \leq 6.951$
	22	$230 \leq \lambda \leq 500$, 10 nm	$2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$
LQM346	22	$220 \leq \lambda \leq 350$, 5 nm	$2.278 \leq \text{pH} \leq 6.903$
	20	$220 \leq \lambda \leq 350$, 5 nm	$7.124 \leq \text{pH} \leq 11.263$
LQM351	16	$220 \leq \lambda \leq 340$, 5 nm	$2.422 \leq \text{pH} \leq 6.898$
	13	$230 \leq \lambda \leq 400$, 5 nm	$7.000 \leq \text{pH} \leq 11.309$

A partir de la información obtenida con Espectrofotometría UV-Vis y en conjunto con las estructuras mostradas en la tabla 1.4.1, se procede a refinar los modelos de equilibrios con el programa SQUAD[38-39]. Los resultados de pKa refinados son reportados en la tabla 2.4.2 para los LQM344, LMQ345, LQM346 y LQM351.

Tabla 2.4.2 Valores de pKa obtenidos utilizando SQUAD

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$	σ_{reg}, U^a
LQM344	5.559 ± 0.004	10.185 ± 0.015	-	0.007, 0.015
LQM345	2.829 ± 0.017	9.273 ± 0.057	10.263 ± 0.020	0.005, 0.010
LQM346	5.480 ± 0.005	9.887 ± 0.017	No refinado	0.008, 0.038
LQM351	6.154 ± 0.014	10.425 ± 0.025	No refinado	0.004, 0.008

En la tabla 2.4.2 se observan dos valores de pKa para el LQM344 debido que su estructura presenta dos posibles desprotonaciones como se mencionó anteriormente, para el LQM345 se obtuvieron 3 valores de pKa lo cual es congruente si se observa su estructura química. Caso contrario con el LQM346 y LQM351, para estos compuestos se obtuvieron dos de los tres posibles valores de pKa, el tercer pKa para ambos se encuentra a pH mayores de 12, hay que recordar que nuestro intervalo de trabajo es $2 \leq \text{pH} \leq 12$.

La figura 2.4.9 y 2.4.10 muestra los coeficientes de absortividad molar obtenidos durante el refinamiento en SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar de los coeficientes para cada especie, en todos los casos las desviaciones estándar no exceden el 5%.

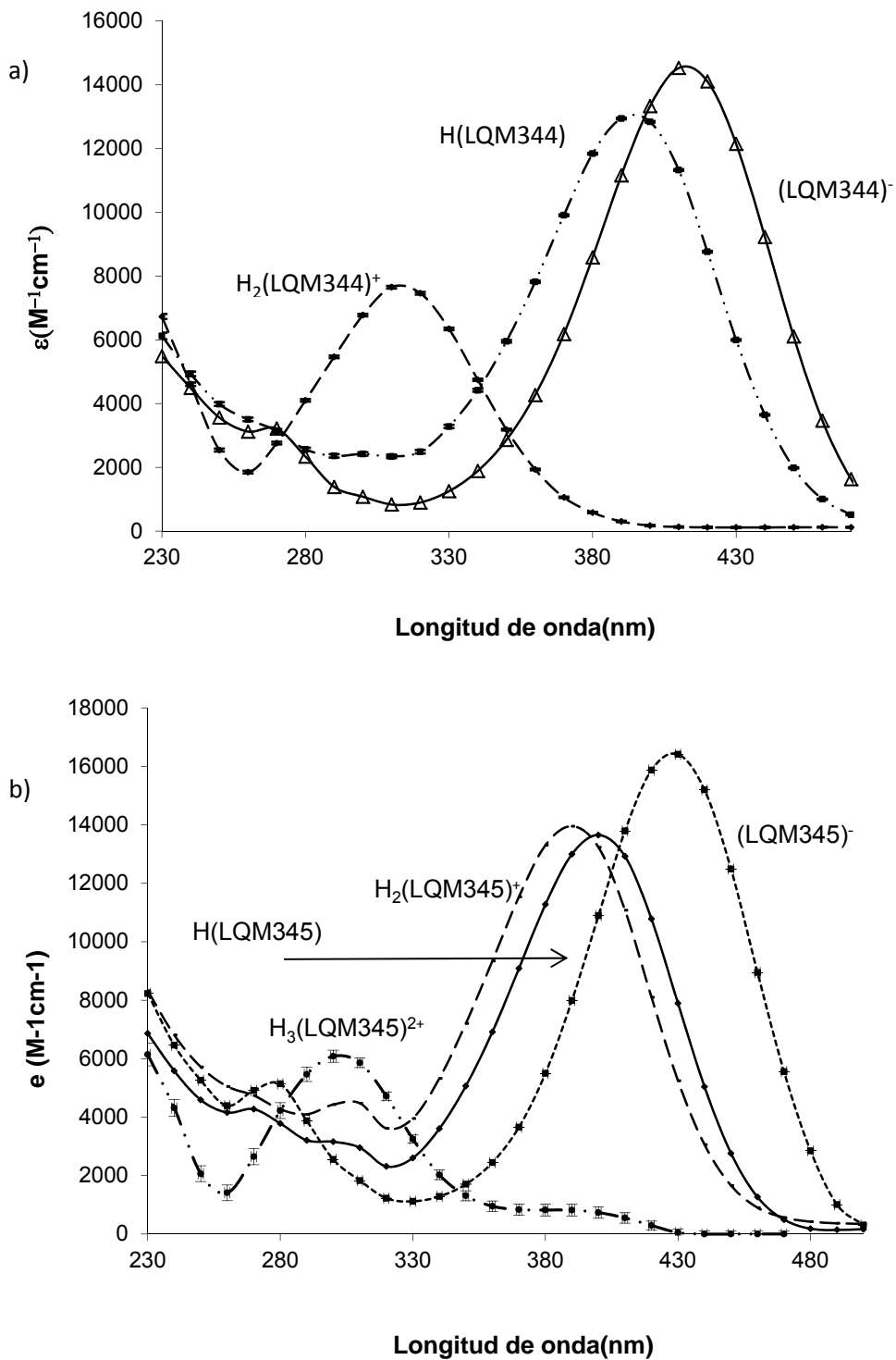


Figura 2.4.9 Coeficientes de absorptividad molar de los LQM's calculados con el programa SQUAD.

a) LQM344 y b) LQM345

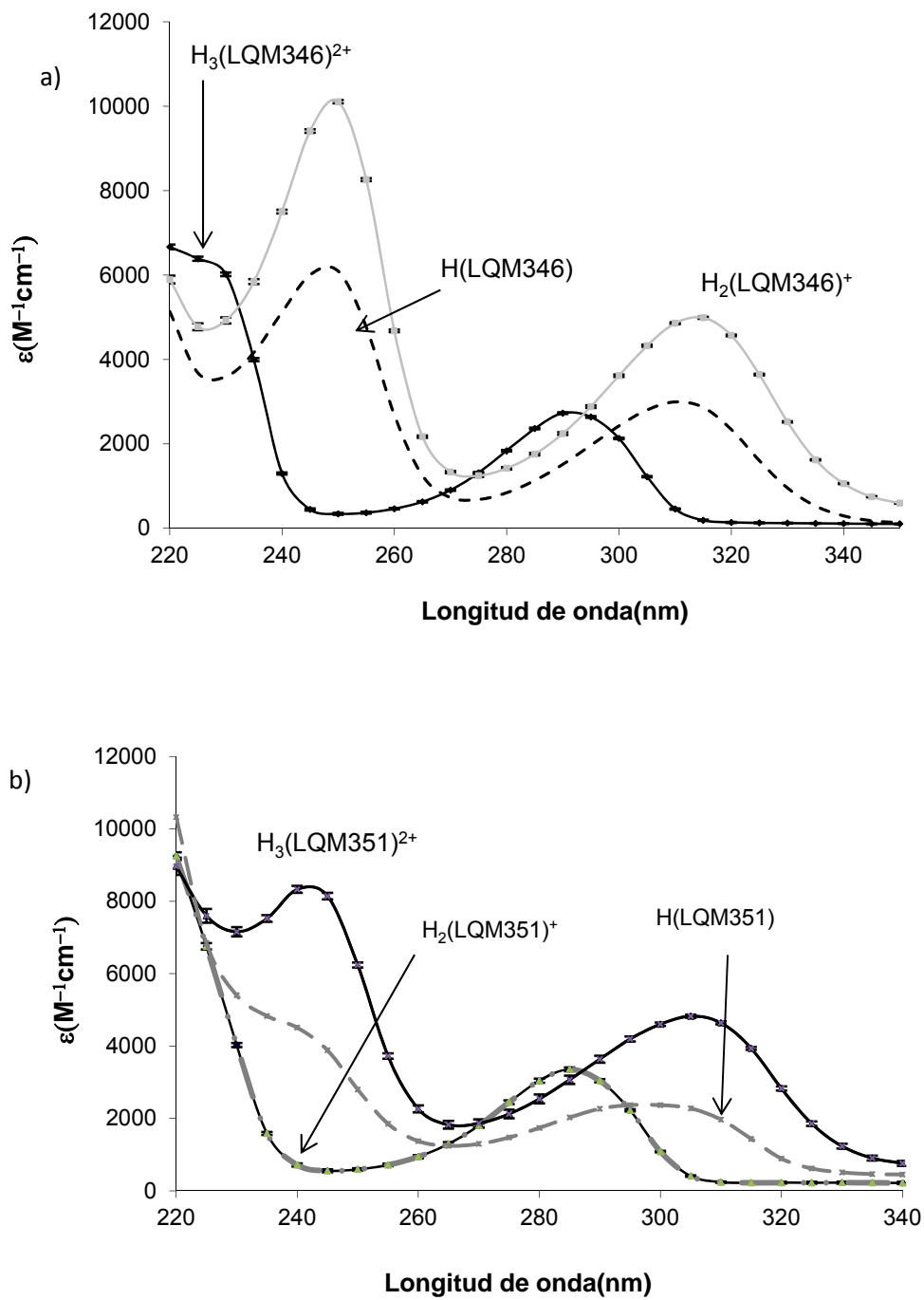


Figura 2.4.10 Coeficientes de absorptividad molar de los LQM's calculados con el programa SQUAD. a) LQM346 y b) LQM351.

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)

A continuación se describe el procedimiento para obtener la movilidad electroforética efectiva. La movilidad electroforética efectiva experimental (u_{ef}) se determinó con la ecuación 2.4.1 para todos los LQM's.

$$u_{ef} = \left[\frac{L_T L_D}{V} \right] \left[\left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \right] \quad \text{Ecuación 2.4.1}$$

donde:

u_{ef} , es la movilidad electroforética efectiva

L_T , es la longitud total del capilar.

L_D , es la longitud efectiva del capilar (al detector).

V , es el Voltaje aplicado.

t_m , es el tiempo de migración del analito.

t_0 , es el tiempo de migración del flujo electroosmótico.

Una vez obtenidos los valores experimentales de movilidades electroforética efectivas en función del pH se determinan las constantes utilizando el programa computacional SQUAD.

A continuación se presentan los resultados obtenidos por CZE para los LQM's piperidínicos.

Las curvas de movilidad como función del pH se muestran en la figuras 2.4.11 a la 2.4.14, así como los valores de pKa obtenidos mediante el refinamiento con SQUAD se muestran en la tabla 2.4.3.

El compuesto LQM344, que tiene una piperidina en su estructura, muestra el comportamiento esperado, ver figura 2.4.11.

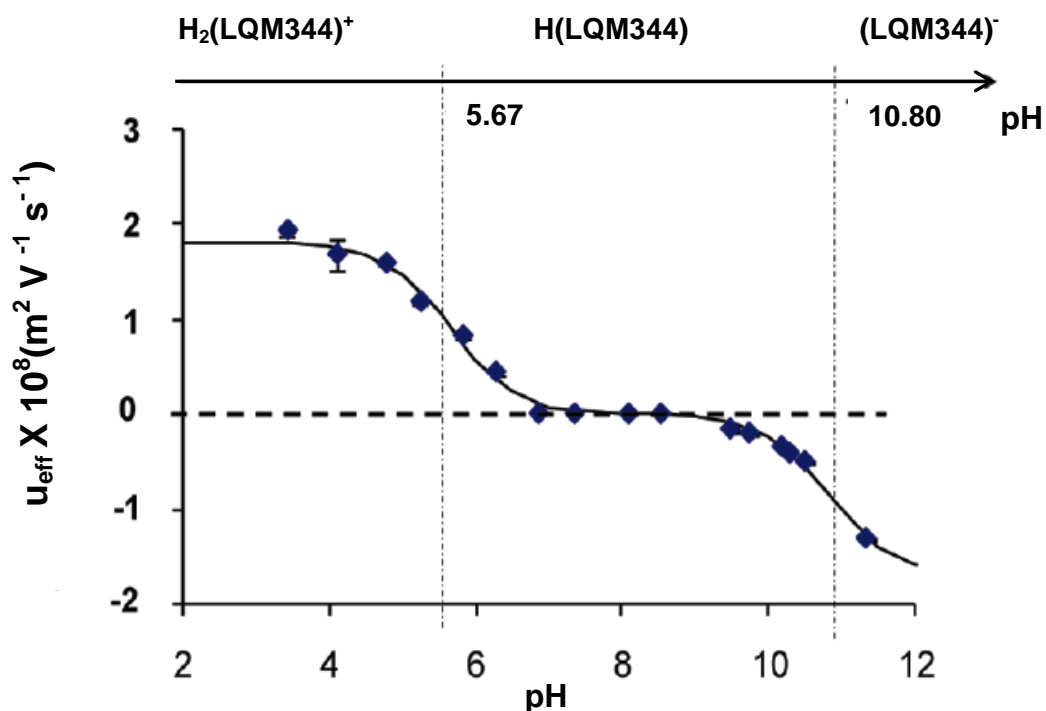


Figura 2.4.11 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM344 a $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 2.4.11 el LQM344 muestra una doble protonación, ésta corresponde al monocatión $\text{H}_2(\text{LQM344})^+$, mientras que la especie totalmente desprotonada corresponde al monoanión $(\text{LQM344})^-$. La especie eléctricamente neutra, es decir sin carga $\text{H}(\text{LQM44})$ predomina principalmente en el intervalo $7 < \text{pH} < 9$ aproximadamente.

A continuación se muestra el comportamiento del LQM345 figura 2.4.12

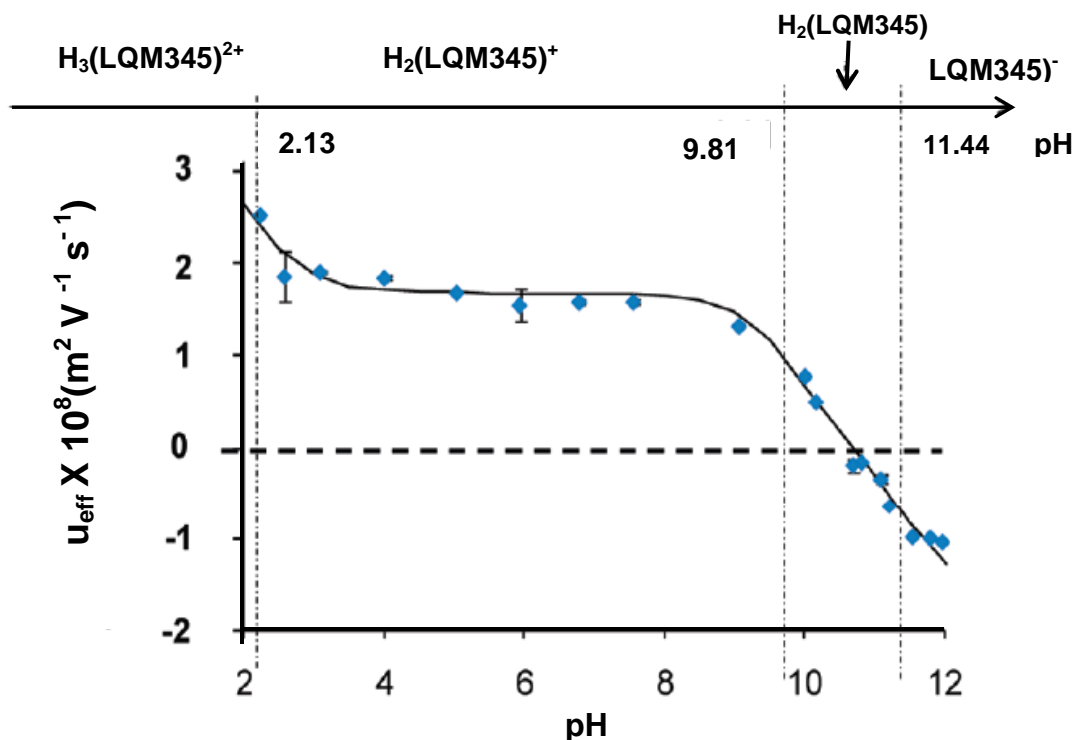


Figura 2.4.12 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM345 a $T=25^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 2.4.12 se observan las tres posibles desprotonaciones de este compuesto, una corresponde a un dicatión $\text{H}_3(\text{LQM345})^{2+}$ la cual predomina para $\text{pH} < 2$ aproximadamente, el monocatión $\text{H}_2(\text{LQM345})^+$ predomina en un intervalo amplio $3 < \text{pH} < 9$ aproximadamente. La especie eléctricamente neutra $\text{H}(\text{LQM345})$, predomina en el intervalo corto de $9.9 < \text{pH} < 11.4$ aproximadamente. El anión $(\text{LQM345})^-$ especie totalmente desprotonada se estima predomina para $\text{pH} > 11.5$ aproximadamente.

A continuación se muestra el comportamiento del LQM346 figura 2.4.13

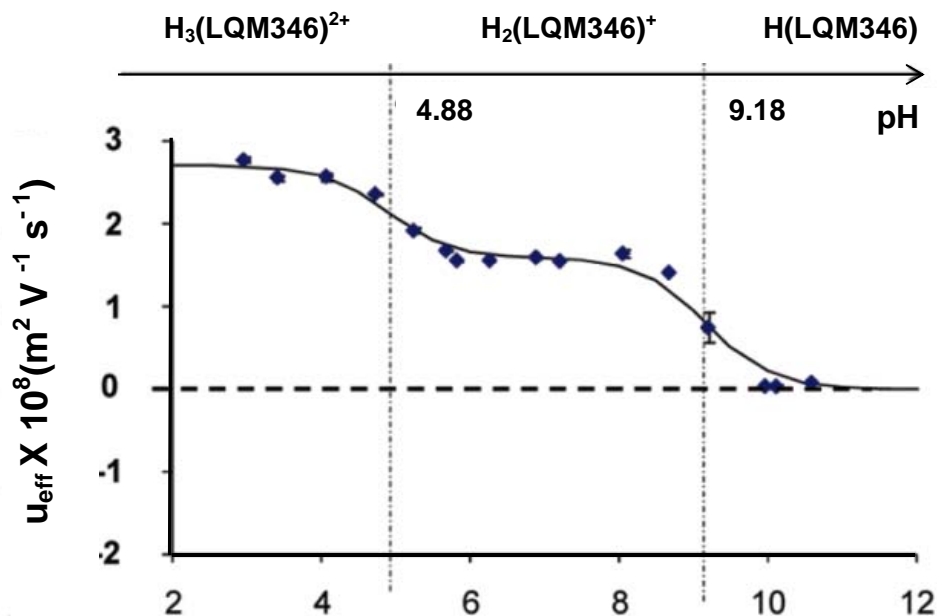


Figura 2.4.13 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM346 a $T=25^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05

M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD

En la figura 2.4.13 se observan dos de las tres posibles desprotonaciones de este compuesto, la primera corresponde al dicatión $\text{H}_3(\text{LQM346})^{2+}$, predomina en pH ácidos, el monocatión $\text{H}_2(\text{LQM346})^+$ predomina en un intervalo $6 < \text{pH} < 8$ aproximadamente y la especie neutra $\text{H}(\text{LQM346})$, en esta curva no se observa el monoanión $(\text{LQM346})^-$ debido que se estima predomina en intervalos muy básicos es decir a $\text{pH} > 13$ aproximadamente.

Se muestra el comportamiento del LQM351 en la figura 2.4.14, se observan el mismo comportamiento que el compuesto LQM346, dos de las tres posibles desprotonaciones de este compuesto, la primera corresponde al dicatión $\text{H}_3(\text{LQM351})^{2+}$, predomina en $\text{pH} < 4$ aproximadamente, el monocatión $\text{H}_2(\text{LQM351})^+$ predomina a pH neutro y la especie neutra $\text{H}(\text{LQM351})$. Al igual que el monoanión en el LQM346 no se observa la especie $(\text{LQM346})^-$ debido que se estima que está predomina en intervalos muy básicos es decir a $\text{pH} > 13$ aproximadamente.

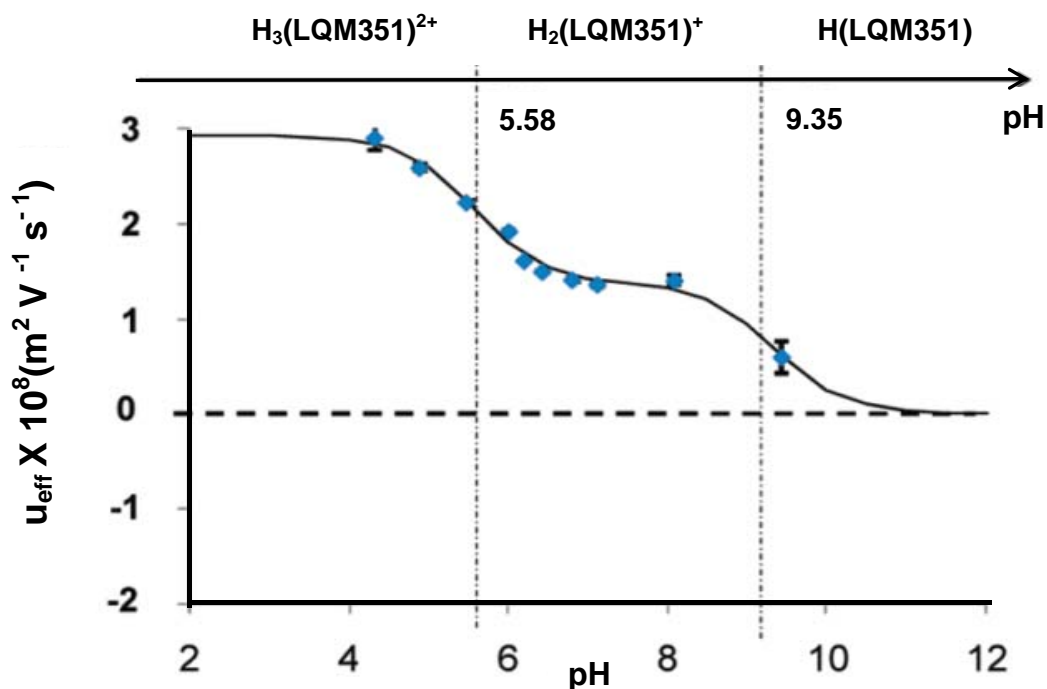


Figura 2.4.14 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM351 a $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD

A continuación se hace hincapié en la nomenclatura empleada en la ecuación 2.4.1 y 2.4.2 ya que se utilizará más adelante.

Especies LQM344: el monocatión $\text{H}_2\text{L}^+=\text{H}_2(\text{LQM344})^+$ se refiere a la especie totalmente protonada, la especie neutra $\text{HL}=\text{H}(\text{LQM344})$ y el monoanión $\text{L}^-=\text{(LQM344)}^-$. **Especies LQM345:** el dicatión $(\text{H}_3\text{LL}^{2+})=\text{H}_3(\text{LQM345})^{2+}$, el monocatión $(\text{H}_2\text{LL}^+)=\text{H}_2(\text{LQM345})^+$, la especie eléctricamente neutra $(\text{HLL})=\text{H}(\text{LQM345})$ y el monoanión $(\text{LL}^-)=\text{(LQM345)}^-$. **Especies LQM346:** el dicatión $\text{H}_3(\text{LQM346})^{2+}$, el monocatión $\text{H}_2(\text{LQM346})^+$, la especie neutra $\text{H}(\text{LQM346})$ y el monoanión $(\text{LQM346})^-$. **Especies LQM351:** el dicatión $\text{H}_3(\text{LQM351})^{2+}$, el monocatión $\text{H}_2(\text{LQM351})^+$, la especie neutra $\text{H}(\text{LQM351})$ y el monoanión $(\text{LQM351})^-$.

La movilidad efectiva calculada como una función del pH para las especies del LQM344 se presenta en la ecuación 2.4.2[40].

$$u_{L'} = u_{L^-} f_{L^-} + u_{HL} f_{HL} + u_{H_2L^+} f_{H_2L^+}$$

$$= \frac{u_{L^-} + u_{H_2L^+} \left[10^{(pK_{a1} + pK_{a2} - 2pH)} \right]}{1 + 10^{(pK_{a2} - pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} - 2pH)}} \quad \text{Ecuación 2.4.2}$$

Donde f_{L^-} , f_{HL} y $f_{H_2L^+}$ son las fracciones molares del diagrama de distribución de las especies[41] del LQM344, u_{L^-} , u_{HL} y $u_{H_2L^+}$ son sus correspondientes movilidades iónicas, pK_{a1} y pK_{a2} son los valores negativos logarítmicos de las constantes de acidez de H_2L^+ y HL respectivamente.

Una ecuación general de la misma clase para las especies LQM345, LQM346 y LQM351 se presenta en la ecuación 2.4.3.

$$u_{LL'} = u_{LL^-} f_{LL^-} + u_{HLL} f_{HLL} + u_{H_2LL^+} f_{H_2LL^+} + u_{H_3LL^{2+}} f_{H_3LL^{2+}}$$

$$= \frac{u_{LL^-} + u_{H_2LL^+} \left[10^{(pK_a + pK_{a3} - 2pH)} \right] + u_{H_3LL^{2+}} \left[10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)} \right]}{1 + 10^{(pK_{a3} - pH)} + 10^{(pK_{a2} + pK_{a3} - 2pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} - 3pH)}} \quad \text{Ecuación 2.4.3}$$

Donde f_{LL^-} , f_{HLL} , $f_{H_2LL^+}$ y $f_{H_3LL^{2+}}$ son las fracciones molares del diagrama de distribución de las especies del LQM345, LQM346 o LQM351, u_{LL^-} , u_{HLL} , $u_{H_2LL^+}$ y $u_{H_3LL^{2+}}$ son sus correspondientes movilidades iónicas, pK_{a1} , pK_{a2} y pK_{a3} son los valores negativos logarítmicos de las constantes de acidez de H_3LL^{2+} , H_2LL^+ y HLL respectivamente.

A continuación se muestra en la tabla 2.4.3 los equilibrios químicos refinados con SQUAD utilizando los datos de movilidad electroforética en función del pH.

Tabla 2.4.3 Valores de pKa refinados con SQUAD a T=37°C y fuerza iónica 0.05M

Compuestos y equilibrios relacionados	pK _{ai}	Movilidad electroforética efectiva ($u_{H_j(lqm3XX)^z}$)($\times 10^8$)m ² V ⁻¹ s ⁻¹	Conductividad equivalente ^b ($\lambda_{H_j(lqm3XX)^z}$) cm ² Ω ⁻¹ equiv ⁻¹
$H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$ $HL^+ \rightleftharpoons L^- + H^+$ H_2L^+ L^-	5.699 ± 0.053 10.803 ± 0.039	LQM344 $\sigma_{reg} = 0.080^c$ 1.806 ± 0104 -1.677 ± 0099	17.13 ± 0.99 15.9 ± 0.94
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$ $H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$ $HLL \rightleftharpoons LL^- + H^+$ H_3LL^{2+} H_2LL^+ HLL	2.125 ± 0.099 9.806 ± 0.073 11.440 ± 0.039	LQM345 $\sigma_{reg} = 0.150^c$ 3.360 ^d 1.681 ± 0.111 -1.68 ^d	15.94 ^d 15.9 ± 1.1 15.94 ^d
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$ $H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$ H_3LL^{2+} H_2LL^+	4.882 ± 0.153 9.184 ± 0.064	LQM346 $\sigma_{reg} = 0.126^c$ 2.702 ± 0.123 1.584 ± 0.083	12.82 ± 0.58 15.02 ± 0.79
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$ $H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$ H_3LL^{2+} H_2LL^+	5.577 ± 0.141 9.351 ± 0.077	LQM351 $\sigma_{reg} = 0.097^c$ 2.927 ± 0.119 1.365 ± 0.075	13.88 ± 0.56 12.95 ± 0.71

^a La movilidad electroforética efectiva de las especies estimadas en el refinamiento.

^b Conductividad equivalente de los iones calculados con la ecuación $|z|\lambda_{H_j(lqm3XX)^z} = F u_{H_j(lqm3XX)^z}$ donde F es la constante de Faraday.

^c σ_{reg} Representa la desviación estándar de la regresión.

^d Este parámetro ha sido mantenido durante el refinamiento.

En la tabla 2.4.3 se observan los dos valores de pKa para el LQM344 debido que su estructura presenta dos posibles desprotonaciones, para el LQM345 se obtuvieron 3 valores de pKa lo cual es congruente como se había mencionado anteriormente. Caso contrario con el LQM346 y LQM351, cabe mencionar que fue difícil obtener una señal de ellos en los electroferogramas para valores de pH superiores a 8, la cual podría ser debido a la baja solubilidad de las especies de HLL o bien la adsorción de éstas en el capilar bajo las condiciones de trabajo empleadas.

Por otra parte los valores de movilidad electroforética de cada especie son coherentes con lo esperado, es decir, por ejemplo para el LQM344, la especie totalmente protonada H_2L^+ presenta un coeficiente de movilidad $u(H_2(LQM344)^+)$ con un valor de $1.806 \text{ m}^2V^{-1}s^{-1}$. Para la especie totalmente desprotonada de este compuesto se espera un coeficiente de movilidad similar pero con signo negativo de la especie totalmente protonada en este caso fue $u((LQM344)^-)= -1.677 \text{ m}^2V^{-1}s^{-1}$. Este mismo comportamiento esperado en los coeficientes de movilidad para las diferentes especies de los diferentes LQM's, se observa en la tabla 2.4.3

En lo que respecta al análisis estadístico se observa que los valores de desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{reg}) son aceptables en todos los casos, la desviación estándar sobre las constantes ($\sigma_{constantes}$) y la desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar (σ_{coef}) no exceden en ambos casos errores mayores al 5%.

Los valores de pKa refinados en las tablas 2.4.2 y 2.4.3 muestran valores similares en algunos casos ambas técnicas, en otros muestran una diferencia considerable, esta diferencia es debida a que no se utilizó la misma fuerza iónica y la temperatura en ambas técnicas. Se realizó una corrección de las constantes de acidez, ésta se calculó a la misma fuerza iónica (apéndice D) para poder comparar los valores experimentales con ambas técnicas.

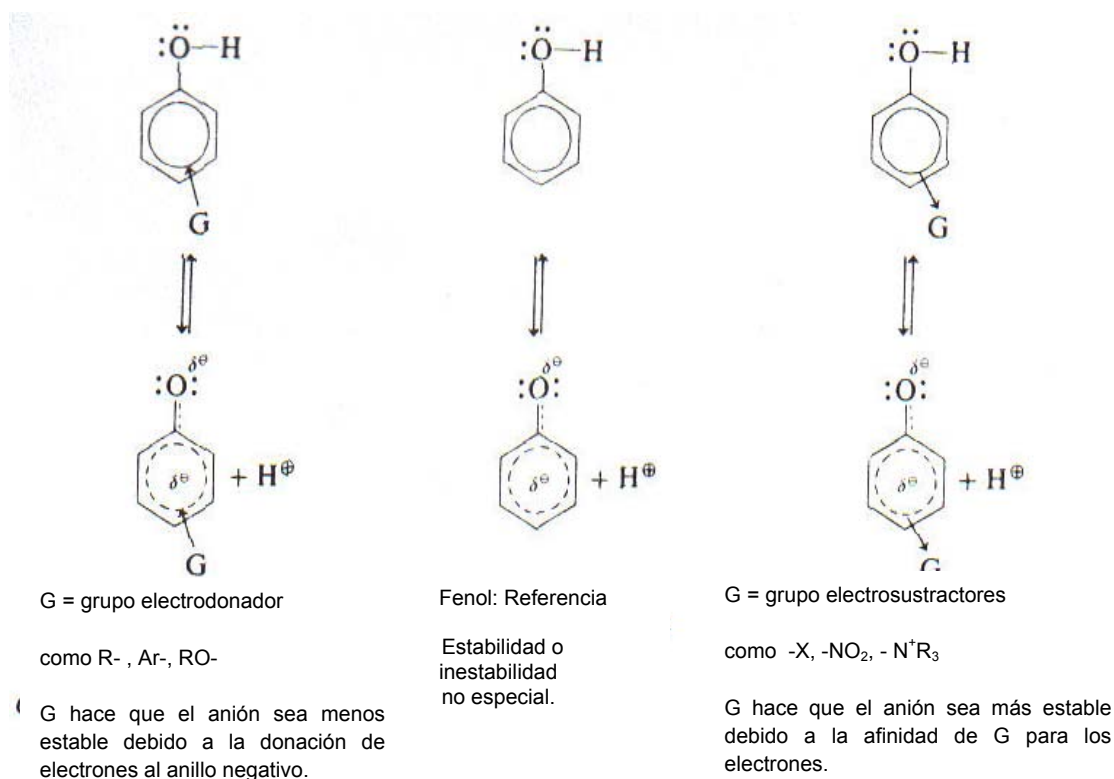
En la siguiente sección se presenta el cálculo empleado en la corrección de las constantes.

2.5 Discusión general piperidínicos

Los fenoles sustituidos pueden ser más ácidos o menos ácidos que el fenol, dependiendo de si el sustituyente es atractor(o sustractor) de electrones o donador de electrones. Los fenoles con un sustituyente atractor de electrones son más ácidos debido a que estos sustituyentes deslocalizan la carga negativa; los fenoles con un sustituyente donador de electrones son menos ácidos debido a que estos sustituyentes concentran la carga negativa. El incremento en la acidez de los fenoles por un sustituyente atractor de electrones se nota particularmente en los fenoles con un grupo nitro en la posición *orto* o *para*.

Los sustituyentes de anillo que eliminan electrones estabilizan la carga negativa situada en el anillo después de que ocurre la disociación. Los sustituyentes que ceden electrones al anillo reducen la acidez debido a que el ión fenóxido sustituido resultante es menos estable.

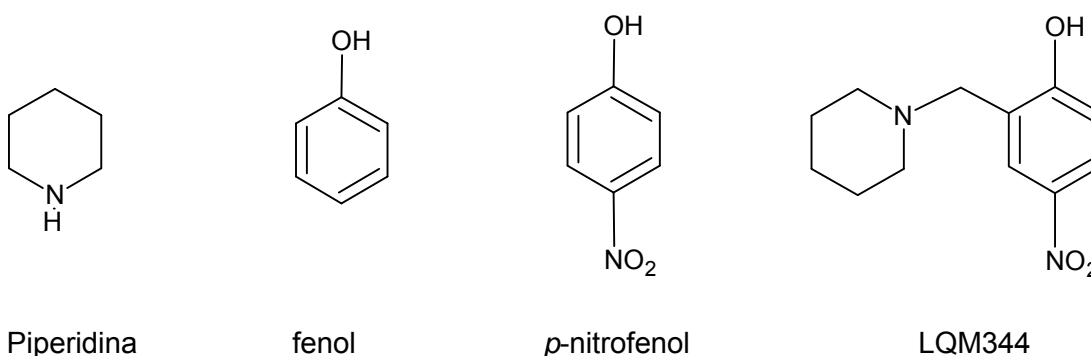
El siguiente esquema ilustra este efecto relativo, comparado con el fenol como referencia:



Esquema ilustrativo de grupos sustituyentes en el fenol.

En la literatura[42] se reporta la desprotonación de la molécula fenol con un $pK_a = 9.89$ y la del *p*-nitrofenol con un $pK_a = 7.167$ lo cual concuerda con las ideas presentadas antes con respecto a adición la acidez del fenol. También se reporta un $pK_a = 11.29$ asociado a la piperidina.

El sustituyente piperidinilmetil (tiene el efecto de un grupo electrón-atractor) en la posición *orto* en el LQM344 tiene el efecto de incrementar la acidez en esta molécula, lo cual se observa en los valores de pK_a obtenidos experimentalmente.



Por otra parte la adición de otro sustituyente piperidinilmetil (grupo electrón-atractor) en la posición *orto* en la estructura del LQM345 le confiere aún más una mayor acidez a esta molécula, este efecto se observó en los valores de pK_a experimentales tabla 2.5.1.

Tabla 2.5.1 Valores de pK_a obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis.

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$
LQM344	5.559 ± 0.004	10.185 ± 0.015	
LQM345	2.829 ± 0.017	9.273 ± 0.057	10.263 ± 0.020

Además si cambiamos el sustituyente nitro en el posición *para* del LQM345 y lo sustituimos por el halógeno cloro, se observa el mismo comportamiento descrito anteriormente, ambos sustituyentes son grupos electrón-atractor, solo que el *p*-

nitrofenol le confiere una mayor acidez que el cloro, lo cual se ve reflejado en los valores de pKa obtenidos experimentalmente ver tabla 2.5.2.

Tabla 2.5.2 Valores de pKa obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$
LQM345	2.829±0.017	9.273±0.057	10.263±0.020
LQM346	5.480±0.005	9.887±0.017	>12

Igualmente si cambiamos el sustituyente nitro por un grupo electro-donador de electrones, como lo es el grupo isopropil en el LQM351 hará que esta molécula sea menos estable debido a la donación de electrones al anillo negativo, disminuyendo así la acidez, este efecto se observó experimentalmente ver tabla 2.5.3

Tabla 2.5.3 Valores de pka obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$
LQM345	2.829±0.017	9.273±0.057	10.263±0.020
LQM346	5.480±0.005	9.887±0.017	>12
LQM351	6.154±0.014	10.425±0.025	>12

Cabe mencionar que el mismo comportamiento también se observó en CZE.

Por otra parte los datos mostrados en la tabla 2.4.2 muestran valores en algunos casos muy similares a los mostrados en la tabla 2.4.3, en otros las diferencias son notables. Esta diferencia puede ser atribuida a la fuerza iónica y a la temperatura debido a que en ambas técnicas fueron distintas.

Se realizaron los cálculos de corrección de fuerza iónica para las constante de acidez para los experimentos en CZE calculándola de una fuerza iónica de $I=0.15$ M a $I=0.05$ M utilizando la ecuación 2.5.1 reportada por Linder[43] (Apéndice D).

$$\log K'' = \log K' + Af \left(\hat{a}_i, (I)^{\frac{1}{2}} \right) + c(I'' - I')(1-p-q) \quad \text{Ecuación 2.5.1}$$

donde

$$f \left(\hat{a}_i, (I)^{\frac{1}{2}} \right) = (pz_M + qz_L)^2 \left(\frac{(I'')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_{M_pL_q}(I'')^{\frac{1}{2}}} - \frac{(I')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_{M_pL_q}(I')^{\frac{1}{2}}} \right) -$$

$$pz_M^2 \left(\frac{(I'')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_M(I'')^{\frac{1}{2}}} - \frac{(I')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_M(I')^{\frac{1}{2}}} \right) - pz_L^2 \left(\frac{(I'')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_L(I'')^{\frac{1}{2}}} - \frac{(I')^{\frac{1}{2}}}{1 + Ba_L(I')^{\frac{1}{2}}} \right)$$

En la ecuación 2.5.1, los términos I' e I'' son las fuerzas iónicas de las soluciones asociadas a las constantes $\log K'$ y $\log K''$ respectivamente, z es la carga del ion, A y B son constantes características del solvente ($A = 0.509$ y $B = 0.328$ para agua a $T=25^\circ\text{C}$), \hat{a} es el parámetro relacionado con el tamaño iónico de las especies.

Los valores corregidos se reportan en la tabla 2.5.4

Tabla 2.5.4 de pKa obtenidos en la corrección

LQM'S PIPERIDÍNICOS	pK_{a1}			pK_{a2}			pK_{a3}		
	Espectrofotometría Valoraciones ácido-base, $I=0.15$ M	CZE, $I=0.05$ M	Corrección CZE, $I=0.05$ M	Espectrofotometría Valoraciones ácido-base, $I=0.15$ M	CZE, $I=0.05$ M	Corrección CZE, $I=0.05$ M	Espectrofotometría Valoraciones ácido-base, $I=0.15$ M	CZE, $I=0.05$ M	Corrección CZE, $I=0.05$ M
LQM344	5.559	5.699	5.624	10.185	10.803	10.611			
LQM345	2.829	2.125	2.351	9.273	9.806	8.918	10.263	11.440	10.966
LQM346	5.480	4.882	5.051	9.887	9.184	9.609			
LQM351	6.154	5.557	5.725	10.425	9.351	10.183			

En la tabla 2.5.4 se observan los valores de pKa obtenidos con las técnicas espectrofotometría y CZE, en ella se muestran los valores de pKa corregidos utilizando la ecuación 2.5.1. Los valores de pKa obtenidos en todos los casos se acercan entre sí, más no son iguales, estas diferencias se pueden atribuir a que los valores de las constantes no se encuentran reportados a la misma temperatura.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ CON LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis Y ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE) DE LOS COMPUESTOS MORFOLÍNICOS, TIOMORFOLÍNICOS y PIPERIDÍNICOS.

VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE.

La metodología utilizada para realizar los experimentos por la técnica Espectrofotometría UV-Vis de los LQM's piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos es la misma que se presentó en el capítulo 2.

3.1 Estabilidad de los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos.

El compuesto LQM336 mostró ser estable en las condiciones de trabajo utilizadas, las fluctuaciones no exceden el 5% en el pH y 6% en las lecturas de absorbancia una vez preparadas las soluciones en un intervalo de tiempo de al menos 10 horas posteriores a su preparación.

El LQM335, LQM310, LQM323, LQM322 y LQM322 presentan fluctuaciones que no exceden el 7% en el pH y 6% en las lecturas de absorbancia una vez preparadas las soluciones en un intervalo de tiempo de al menos 3 horas posteriores a su preparación.

Estos son compuestos empiezan a precipitar lentamente después de unas pocas horas posteriores a su preparación. Sobre la base de estos resultados, se utilizaron soluciones frescas, preparando las soluciones lo más diluido posible.

3.2 LQM336

La figura 3.2.1 muestra algunos espectros representativos de la familia de espectros para el LQM336 para la zona de pH comprendida entre $2.137 \leq \text{pH} \leq 6.986$, se pueden observar cuatro máximos de absorbancia en 233, 250, 280 y 345 nm para distintos valores de pH.

Se hace notar la presencia de 4 puntos isosbéticos en 220, 248, 265 y 310 nm en este intervalo de pH. Se observa que a la longitud de onda de 250 y 345 nm se presenta un efecto hipercrómico y un efecto hipocrómico en 233 y 280 nm respectivamente conforme el pH aumenta.

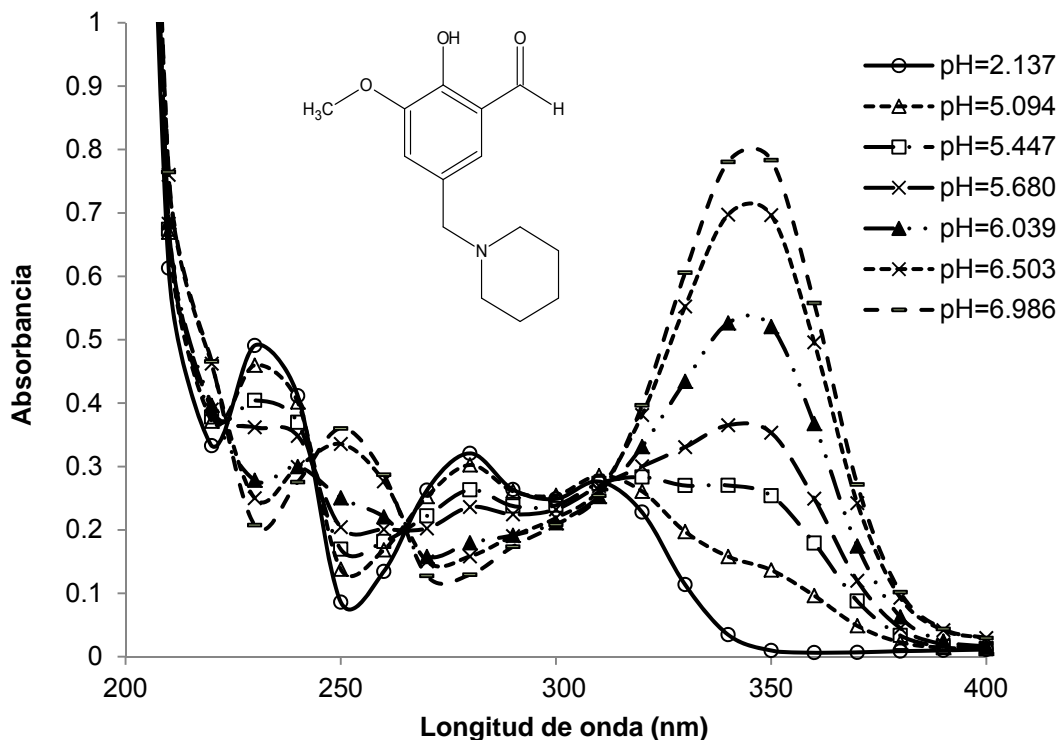


Figura 3.2.1. Espectros de absorción representativos del LQM336 (3.38×10^{-5} M) en el intervalo $2.137 \leq \text{pH} \leq 6.986$

A continuación se muestra en la figura 3.2.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para dos de las longitudes de onda que presentan un máximo de absorbancia en 233 y 345 nm respectivamente.

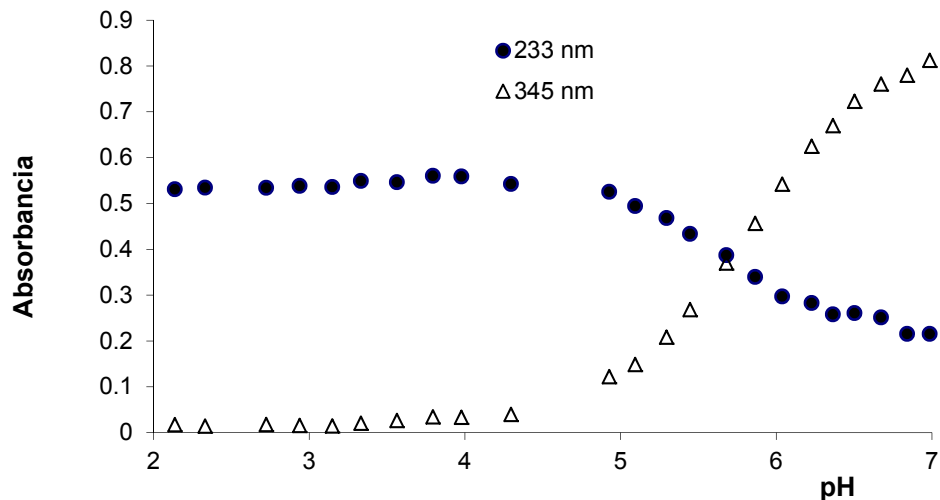


Figura 3.2.2 Curvas de absorbancia como función de pH a dos longitudes de onda diferentes en el intervalo $2.137 \leq \text{pH} \leq 6.986$

Se observa en la figura 3.2.2 dos sigmoides que en conjunto con los puntos isobésticos observados nos sugiere un valor de pKa en el intervalo comprendido entre 4.5 y 7 unidades de pH por la forma de la curva.

En la figura 3.2.3 se muestra la familia de espectros para el LQM336 para la zona de pH comprendida entre $7.150 \leq \text{pH} \leq 11.460$.

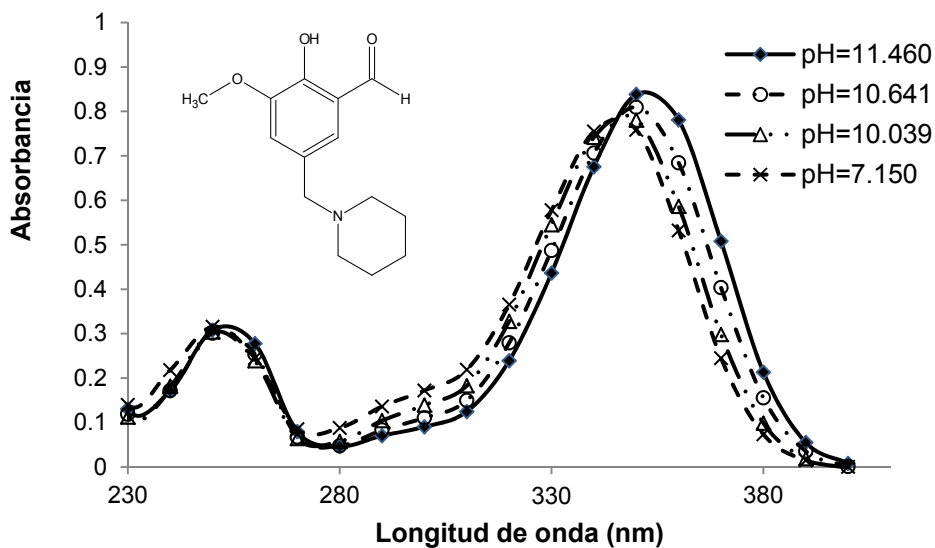


Figura 3.2.3 Espectros de absorción representativos del LQM336 ($3.39 \times 10^{-5} \text{ M}$) en el intervalo $7.150 \leq \text{pH} \leq 11.460$.

Se puede observar un máximo de absorbancia en 352 nm y conforme disminuye el pH éste se desplaza hasta 345 nm. También se observa un efecto hipocrómico e hipsocrómico a una longitud de onda de 345 nm conforme el pH disminuye.

En la figura 3.2.4 se muestran los cambios de absorbancia con respecto al pH, a partir de la familia de espectros obtenidos, para las bandas de absorbancia máxima de 345 y 352 nm respectivamente.

Se observan dos sigmoides, que en conjunto con el punto isobéptico observado nos sugiere un valor pKa en el intervalo comprendido entre 9.5 y 11.6 unidades de pH por la forma de la curva.

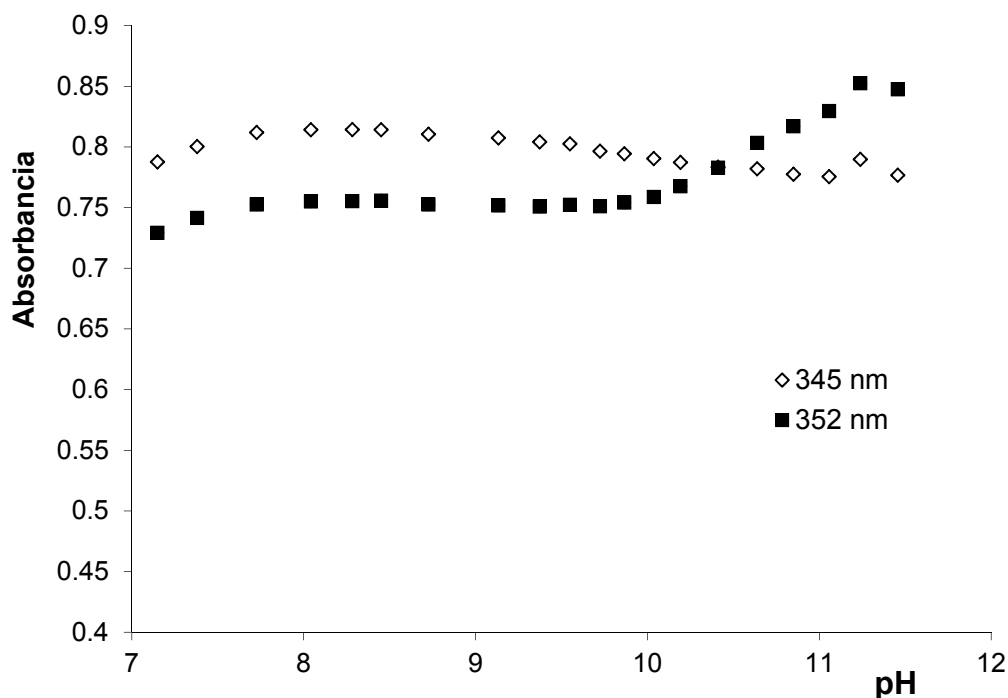


Figura 3.2.4 Curvas de absorbancia como función de pH a dos longitudes de onda diferentes en el intervalo $7.150 \leq \text{pH} \leq 11.460$

El compuesto LQM336 presenta dos posibles desprotonaciones, el OH del anillo fenólico y la otra en el átomo de nitrógeno correspondiente a la piperidina.

3.3 LQM335

En la figura 3.3.1 se muestran algunos espectros representativos del compuesto LQM335 para el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$, se observa un máximo de absorbancia en 250 y 300 nm para distintos valores de pH, se hace notar la ausencia de puntos isobésticos en este intervalo de pH.

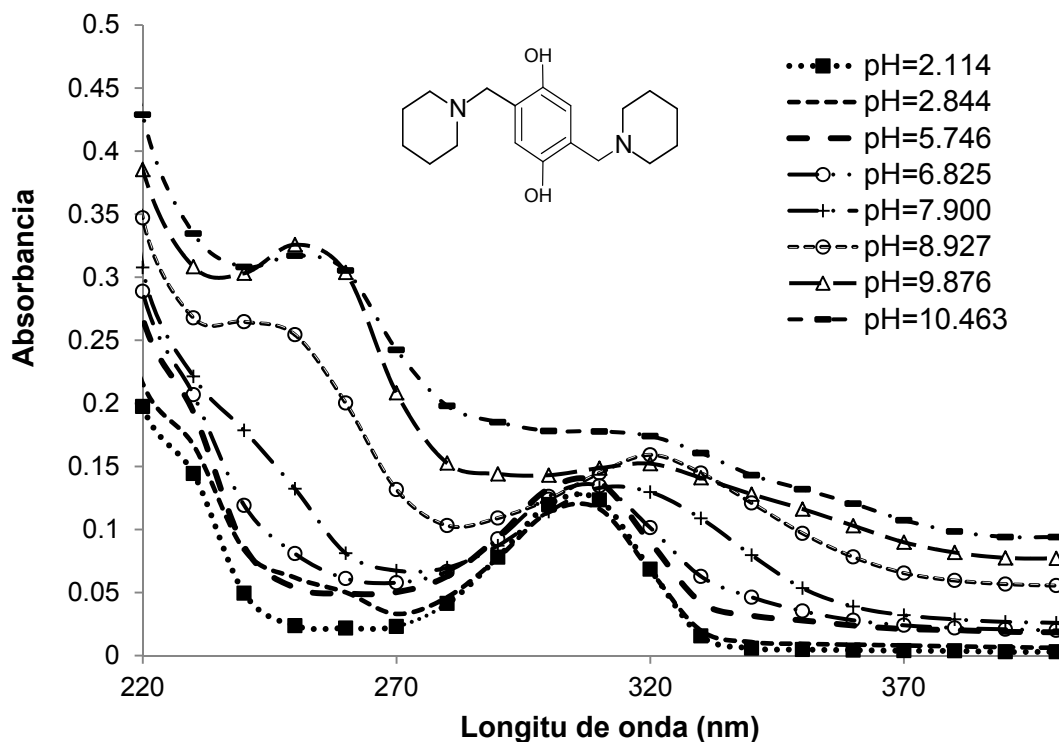


Figura 3.3.1 Espectros de absorción representativos del compuesto LQM335 (2.24×10^{-5} M) en el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$

En esta figura también se observa un efecto hipercrómico para la longitud de onda de 250 y 300 nm respectivamente con el incremento del pH.

A continuación se muestra en la figura 3.3.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para las bandas principales de absorbancia máxima en 250 y 300 nm respectivamente.

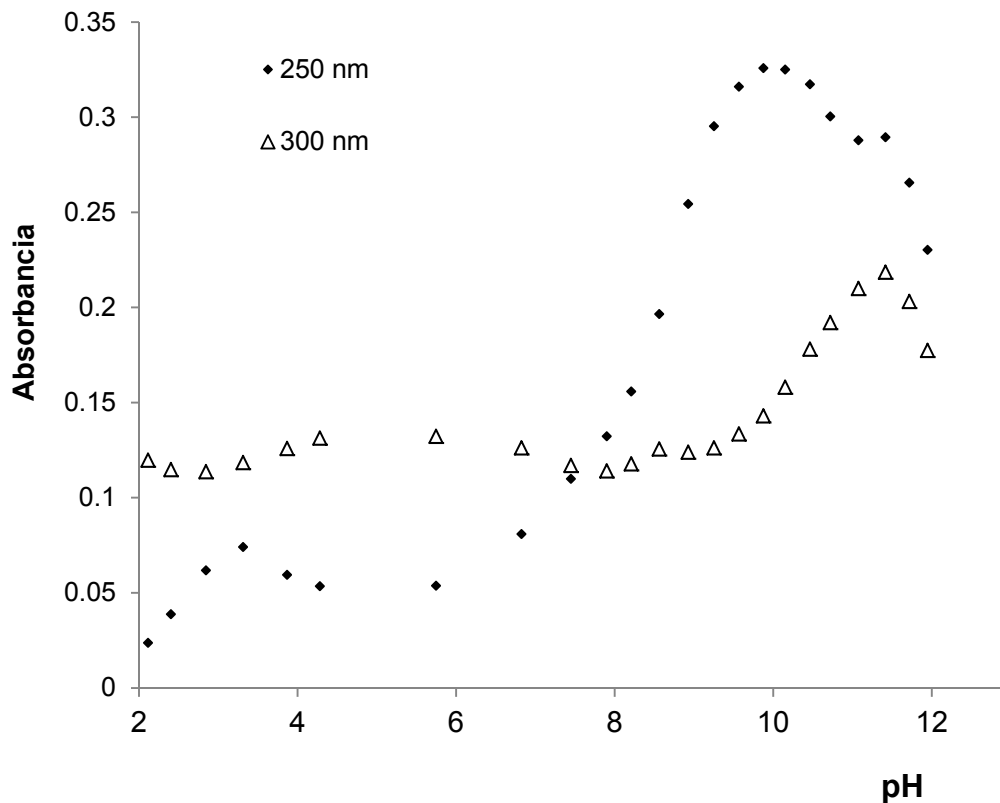


Figura 3.3.2 Curvas de Absorbancia como función de pH a dos longitudes de onda diferentes en el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$

Se observa en la gráfica dos sigmoides, lo cual nos sugiere la presencia de un par de equilibrios ácido-base para este compuesto en la zona de pH entre 6 y 12 unidades de pH.

El compuesto LQM335 presenta cuatro posibles desprotonaciones, dos corresponden a los OH del anillo fenólico y las otras dos corresponden a los átomos de nitrógeno de las piperidinas.

3.4 LQM310

En la figura 3.4.1 se muestran algunos espectros representativos para el compuesto LQM310 para el intervalo $2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$, se observa un máximo de absorbancia en 280 y 300 nm para dos valores distintos de pH, se hace notar la presencia de un punto isobéptico en 290 nm aproximadamente.

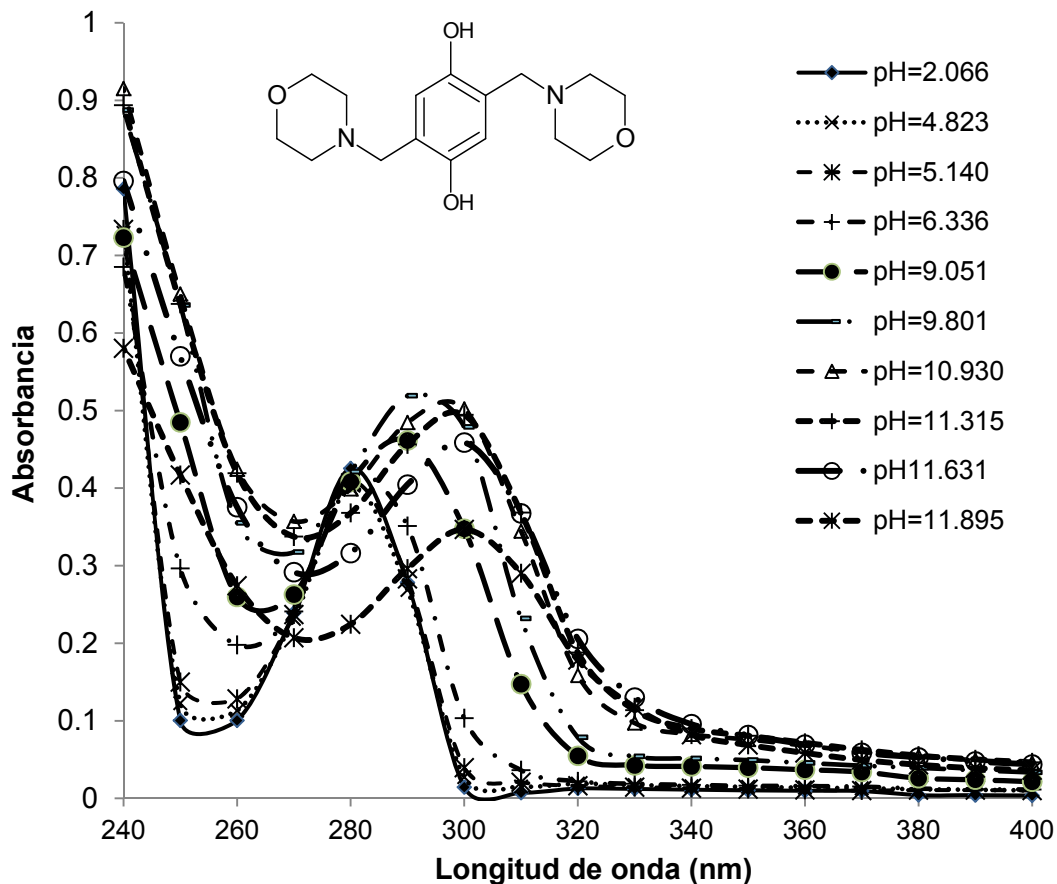


Figura 3.4.1 Espectros de absorción representativos del compuesto LQM310 (1.6×10^{-4} M) en el intervalo $2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$

En la figura se observa que no todas las curvas pasan por un punto isobéptico, hay un desplazamiento de éste. Se presenta también un efecto hipocrómico e hipsocrómico para la longitud de onda de 290 nm.

A continuación se muestra en la figura 3.4.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para las bandas principales de absorbancia máxima en 280 y 300 nm

respectivamente, también se observa el cambio de absorbancia para la longitud de onda de 253 nm.

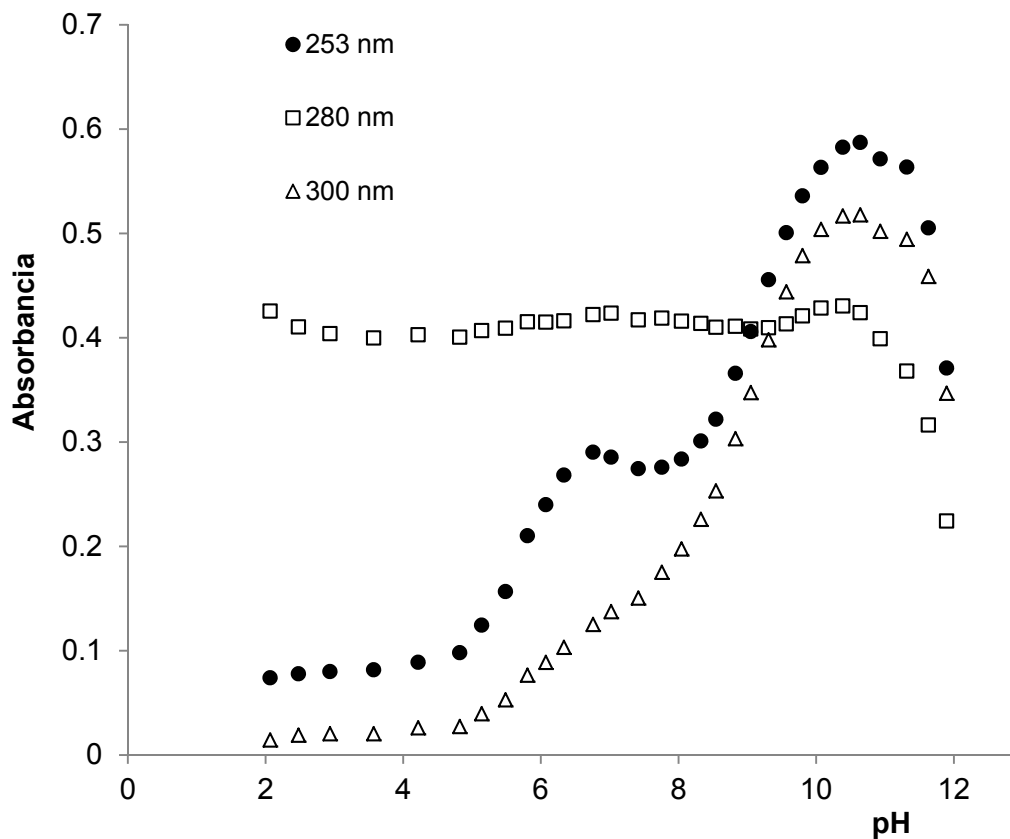


Figura 3.4.2 Curvas de absorbancia en función del pH a tres diferentes longitudes de onda en el intervalo $2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$

Se observa en la gráfica tres sigmoides, que en conjunto con el punto isobéptico observado nos sugiere la presencia de un par de valores de pKa para esta zona de pH experimental.

El compuesto LQM310 presenta cuatro posibles desprotonaciones, dos corresponden a los OH del anillo fenólico y las otras dos a los átomos de nitrógeno correspondientes a las morfolinas.

3.5 LQM323

En la figura 3.5.1 se muestran algunos espectros representativos para el compuesto LQM323 para el intervalo $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$. Se observa un máximo de absorbancia en 300 nm, también se hace notar la presencia de un punto isobéptico en 280 nm.

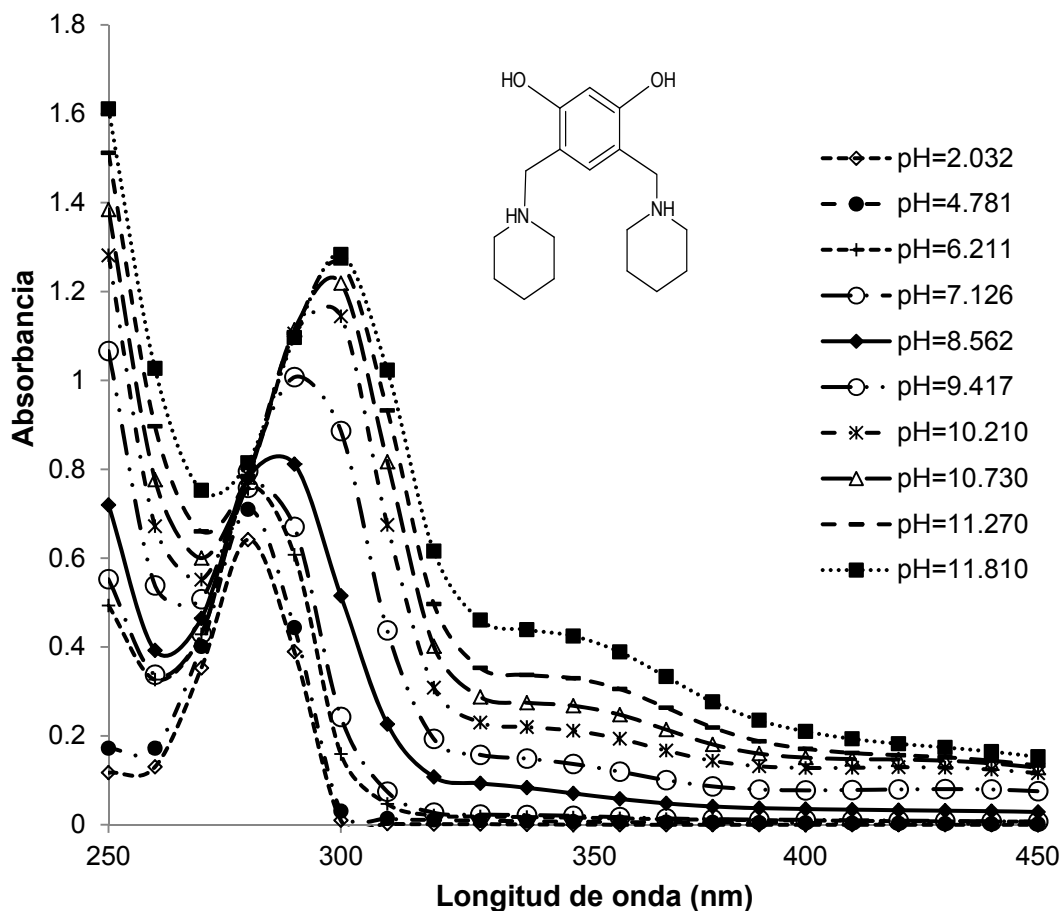


Figura 3.5.1 Espectros de absorción representativos del compuesto LQM323 (1.68×10^{-4} M) en el intervalo $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$

Se observa que no todas las curvas pasan por un punto isobéptico, hay un desplazamiento de éste. También se presenta un efecto batocrómico e hiperocrómico con el aumento del pH para este intervalo de pH experimental.

A continuación se muestra en la figura 3.5.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para la banda principal de absorbancia máxima en 300 nm y para las bandas en 255, 282 y 292 nm respectivamente.

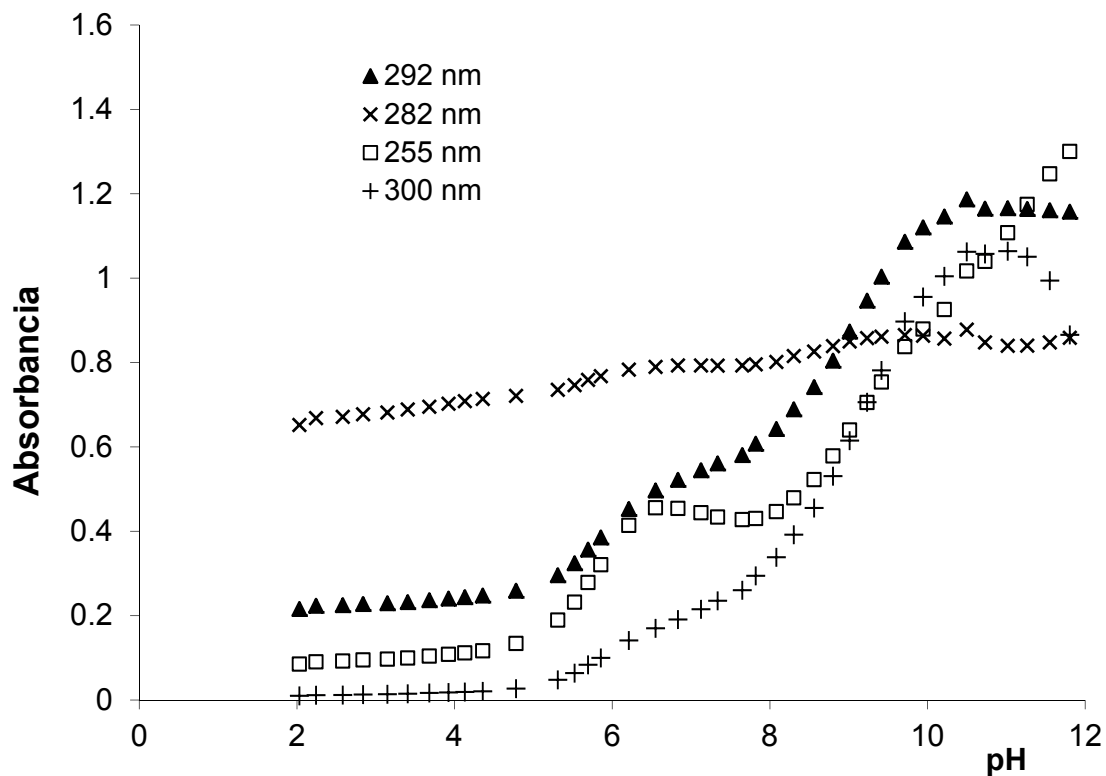


Figura 3.5.2 Curvas de absorbancia en función del pH a tres diferentes longitudes de onda en el intervalo $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$

Se observa en la gráfica cuatro sigmoides, que en conjunto con el punto isobéptico observado nos sugiere la presencia de un par de equilibrios ácido-base para este compuesto en la zona de pH experimental.

El compuesto LQM323 presenta cuatro posibles desprotonaciones, dos corresponden a los OH del anillo fenólico y las otras dos a los átomos de nitrógeno correspondientes a la morfolin.

3.6 LQM322

En la figura 3.6.1 se muestran algunos espectros representativos para el compuesto LQM322 para el intervalo $2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$, se observan dos máximos de absorbancia en 330 y 350 nm para diferentes valores de pH, se hace notar la presencia de un punto isobéptico en 305 nm para este intervalo de pH. Se observa que no todas las curvas pasan por un punto isobéptico, hay un desplazamiento de éste. También se observa un efecto hipocrómico para la longitud de onda de 330 nm conforme el pH disminuye.

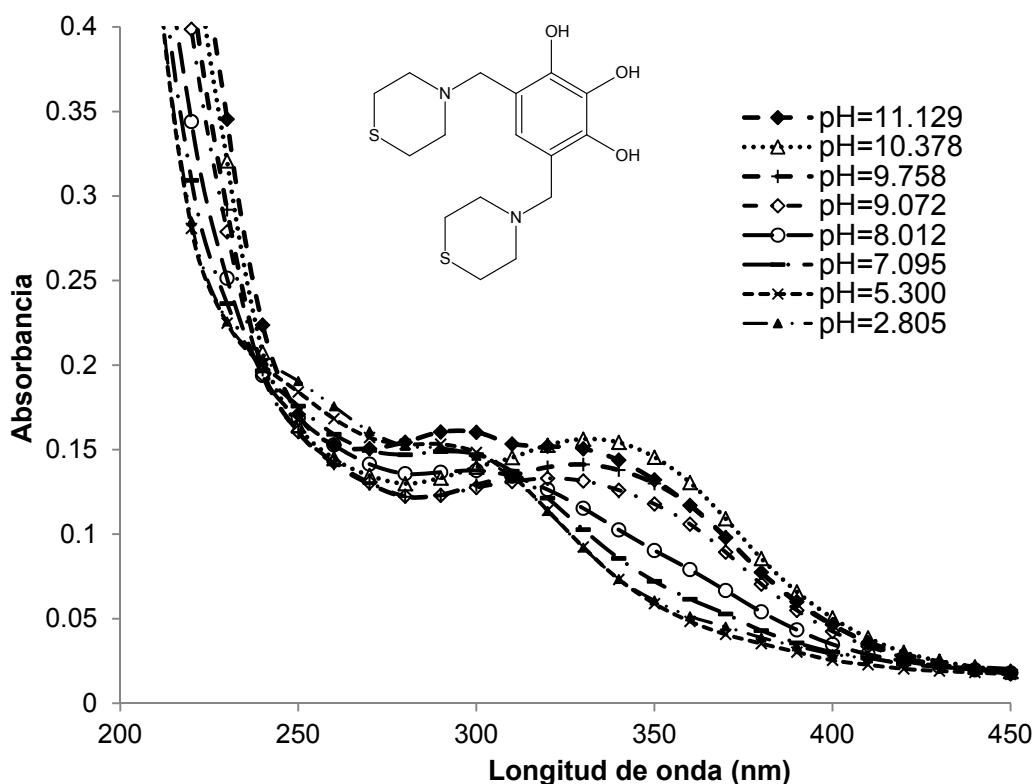


Figura 3.6.1 Espectros de absorción el compuesto LQM322 (1.0×10^{-4} M) en el intervalo $2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$

A continuación se muestra en la figura 3.5.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para las bandas principales de absorbancia máxima en 330 y 350 nm, también se muestra el cambio de absorbancia para la longitud de 270 nm.

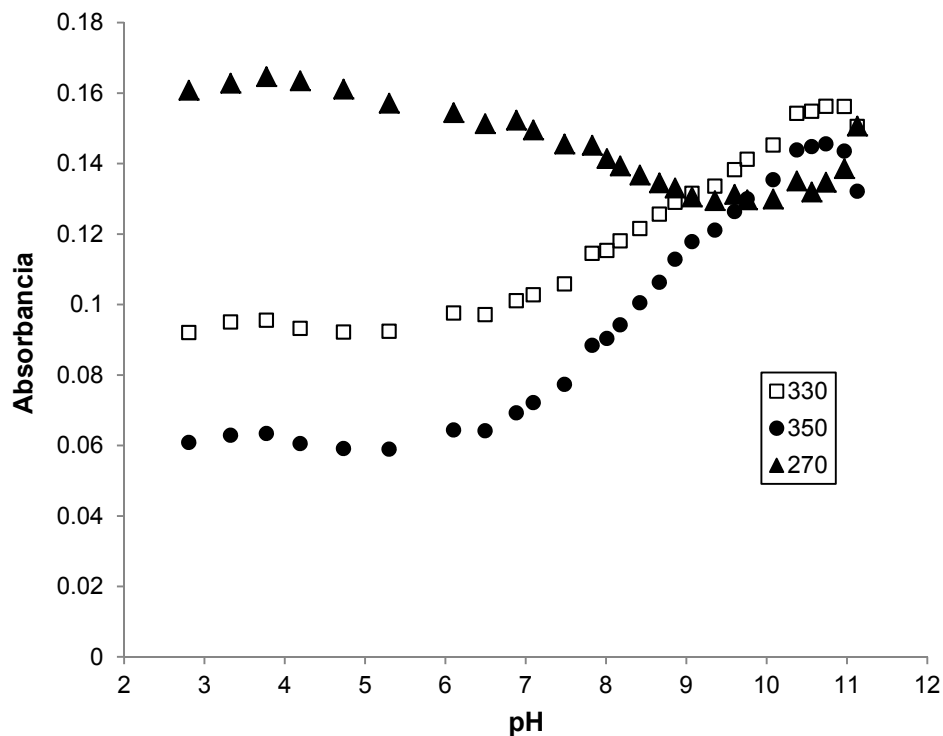


Figura 3.6.2 Curvas de absorbancia en función del pH a tres longitudes de onda diferente en el intervalo $2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$

Se observa en la gráfica tres sigmoides, que en conjunto con el punto isobéptico observado nos sugiere la presencia de un par de equilibrios ácido-base para este compuesto en la zona de pH experimental.

El compuesto LQM322 presenta cinco posibles desprotonaciones, tres corresponden a los OH del anillo fenólico y las otras dos a los átomos de nitrógeno correspondientes a las morfolin.

3.7 LQM329

La figura 3.7.1 muestra algunos espectros representativos de la familia de espectros para el LQM329 para la zona de pH comprendida entre $2.183 \leq \text{pH} \leq 6.897$, se pueden observar dos máximos de absorbancia 288 y 310 nm respectivamente para diferentes valores de pH.

Se hace notar la presencia de puntos isobésticos en 265 y 300 nm respectivamente, los cuales nos sugieren la existencia de un par de valores de pKa en este intervalo de pH. Se presenta un efecto hipocrómico en 288 nm y un efecto hiperocrómico en 250 y 310 nm conforme el pH aumenta.

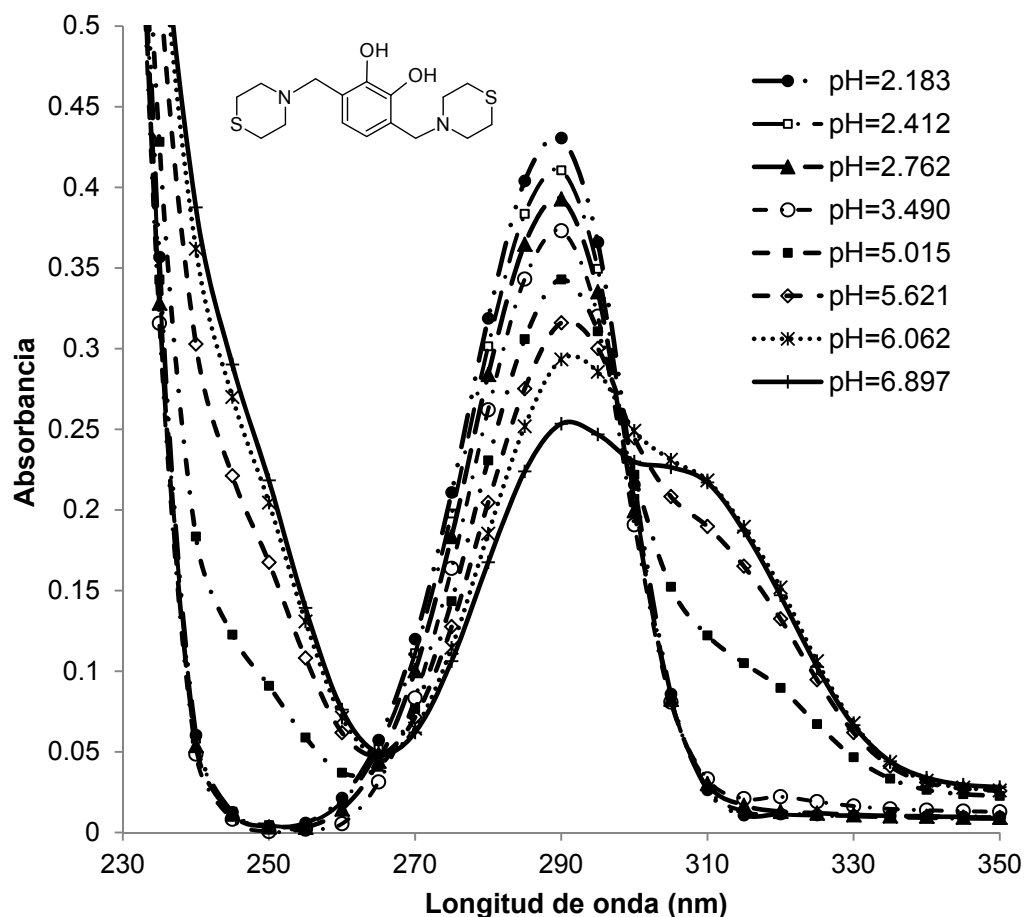


Figura 3.7.1 Espectros de absorción representativos del LQM336 (1.55×10^{-4} M) en el intervalo $2.183 \leq \text{pH} \leq 6.897$

A continuación se muestra en la figura 3.7.2 los cambios de absorbancia con respecto al pH, para las bandas principales de absorbancia máxima 288 y 310 nm respectivamente, también se muestra en la misma gráfica el cambio de absorbancia para la longitud de onda de 250 nm.

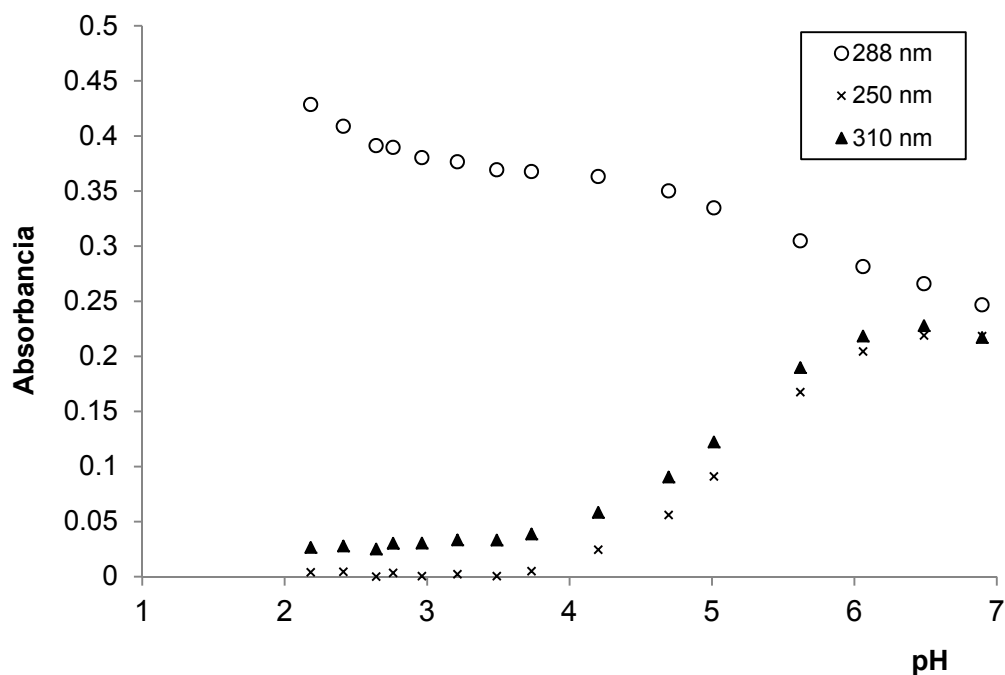


Figura 3.7.2 Curvas de absorbancia como función de pH a dos longitudes de onda diferentes en el intervalo $2.183 \leq \text{pH} \leq 6.897$

Se observa en la figura 3.7.2 tres sigmoides, que en conjunto con los puntos isobélicos observados, nos sugiere la presencia de un par equilibrio ácido-base para la zona ácida. Se sugiere que el valor de pKa se encuentren en el intervalo comprendido entre 4.5 y 7 unidades de pH por la forma de la curva.

En la figura 3.7.3 se muestra la familia de espectros para el LQM329 para la zona comprendida entre $7.196 \leq \text{pH} \leq 11.373$. Se puede observar dos máximos de absorbancia en 315 y 260 nm respectivamente para diferentes valores de pH.

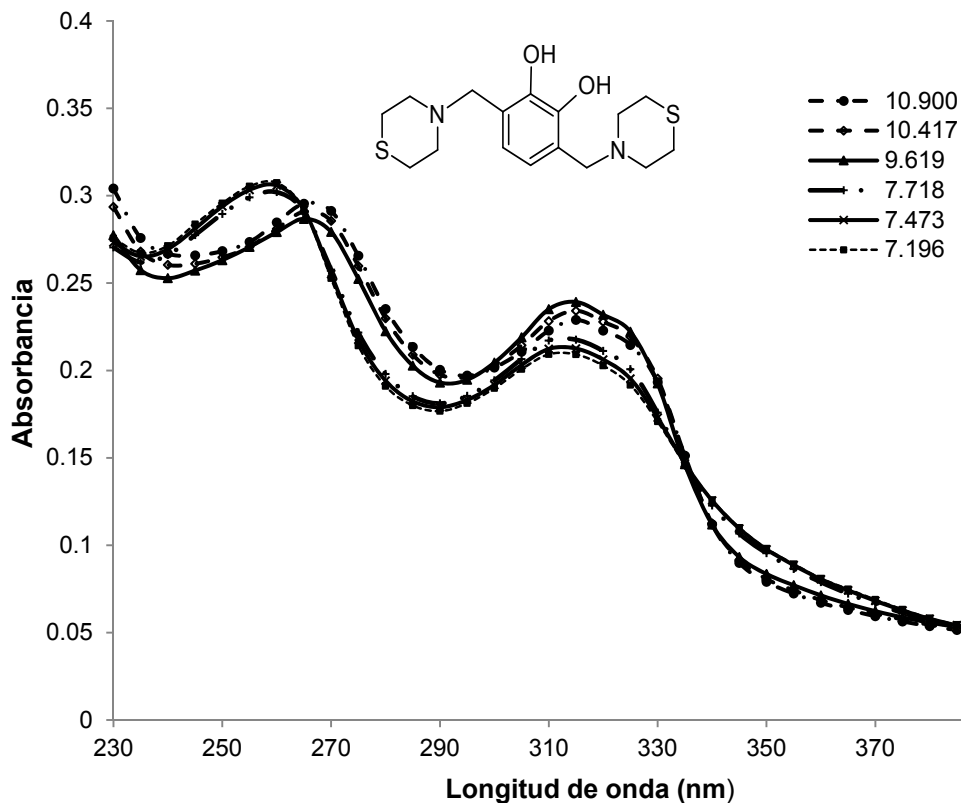


Figura 3.7.3 Espectros de absorción representativos del LQM329 (3.73×10^{-5} M) en el intervalo $7.196 \leq \text{pH} \leq 11.373$

A continuación se muestran en la figura 3.7.4 los cambios de absorbancia con respecto al pH, a partir de la familia de espectros obtenidos, para las bandas absorbancia máxima.

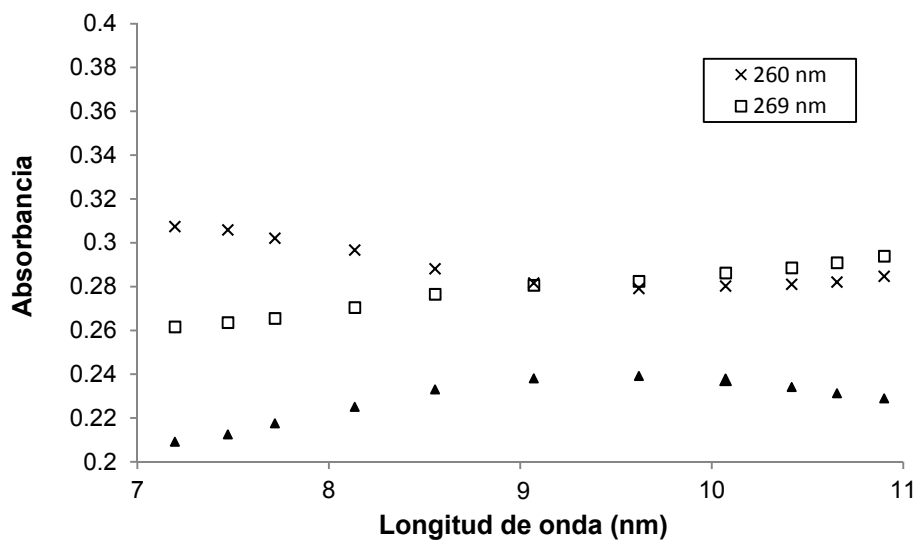


Figura 3.7.4 Curvas de absorbancia como función de pH a dos longitudes de onda diferentes en el intervalo $7.196 \leq \text{pH} \leq 11.373$

En esta figura se observa un ligero cambio en la absorbancia en todas las curvas de absorción, también se muestran dos sigmoides, que en conjunto con el punto isobéptico observado, nos sugiere la presencia de un equilibrio ácido-base para la zona básica, se sugieren dos valores de pKa en el intervalo entre 10- 11.6 unidades de pH por la forma de la curva.

3.8 Determinación de las constantes de acidez utilizando SQUAD

Una vez que se llevaron a cabo valoraciones ácido-base, se introducen los datos de absorbancia en función del pH al programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes. En la tabla 3.8.1 se muestran los parámetros utilizados en cada refinamiento.

Tabla 3.8.1 Parámetros utilizados en el programa SQUAD

LQM's	Número de espectros	Intervalo de longitud de onda (λ)	Intervalo de pH
LQM336	23	$220 \leq \lambda \leq 400$, 10nm	$2.137 \leq \text{pH} \leq 6.986$
	17	$220 \leq \lambda \leq 400$, 10nm	$7.150 \leq \text{pH} \leq 11.460$
LQM335	23	$220 \leq \lambda \leq 400$, 10nm	$2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$
LQM310	22	$240 \leq \lambda \leq 400$, 10nm	$2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$
LQM323	21	$250 \leq \lambda \leq 450$, 10nm	$2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$
LQM322	18	$230 \leq \lambda \leq 450$, 10nm	$2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$
LQM329	16	$230 \leq \lambda \leq 350$, 5nm	$2.183 \leq \text{pH} \leq 6.897$
	13	$230 \leq \lambda \leq 400$, 5nm	$7.196 \leq \text{pH} \leq 11.373$

A continuación se muestra en la tabla 3.8.2 los valores de pKa obtenidos para cada compuesto.

Tabla 3.8.2 Refinamiento de valores de pKa obtenidos a T 310 K

LQM's	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$	$pK_{a4} \pm \sigma$	σ_{reg}, U^a
LQM336 ^a	5.826 ± 0.007	10.595 ± 0.015	-	-	$9.30 \times 10^{-3}, 0.03$
LQM335 ^b	5.901^c	8.745^c	11.255 ± 0.0290	No refinado	$1.27 \times 10^{-3}, 0.06$
LQM310 ^b	5.775 ± 0.112	7.108 ± 0.091	9.147 ± 0.064	11.087 ± 0.039	$6 \times 10^{-3}, 0.032$
LQM323 ^b	5.709 ± 0.220	7.201 ± 0.159	9.141 ± 0.050	11.065 ± 0.030	$9.87 \times 10^{-3}, 0.032$
LQM322 ^b	5.644^c	7.182^c	9.263^c	No refinado	$4.26 \times 10^{-3}, 0.005$
LQM329 ^b	5.166 ± 0.033	7.223^c	10.1^c	No refinado	$3.18 \times 10^{-3}, 0.08$

^a Experimentos fuerza iónica 0.15M

^b Experimentos fuerza iónica variable ($2 \leq \text{pH} \leq 12$)

^c Estos parámetros se mantiene fijos durante en refinamiento en SQUAD.

Se observan en la tabla 3.8.2 los valores de pKa obtenidos con SQUAD para los diferentes LQM's, para el LQM336 se obtuvieron los dos valores de pKa posibles que presenta su estructura. Para los LQM310 y LQM323 se obtuvieron los cuatro valores de pKa que presentan cada uno en su estructura.

No ocurrió lo mismo para el compuesto LQM335, para esta molécula, solamente se observaron 3 valores de pKa de los 4 posibles, el cuarto valor de pKa se sugiere por arriba de pH >12 aproximadamente.

El LQM322 presentó 3 de los 5 valores que puede tener, se sugiere que los otros dos valores de pKa se encuentren en pH >12 aproximadamente, por lo que no se pudieron refinar los otros dos valores.

El LQM329 presentó 3 valores de pKa de los 4 posibles, nuevamente se sugiere que el cuarto pKa se encuentre por arriba pH >12 aproximadamente.

A continuación se muestran los coeficientes de absorptividad de los LQM's

La figura 3.8.1 muestra los coeficientes de absorptividad molar refinados en SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar (menores al 6%) de las 3 especies del LQM336.

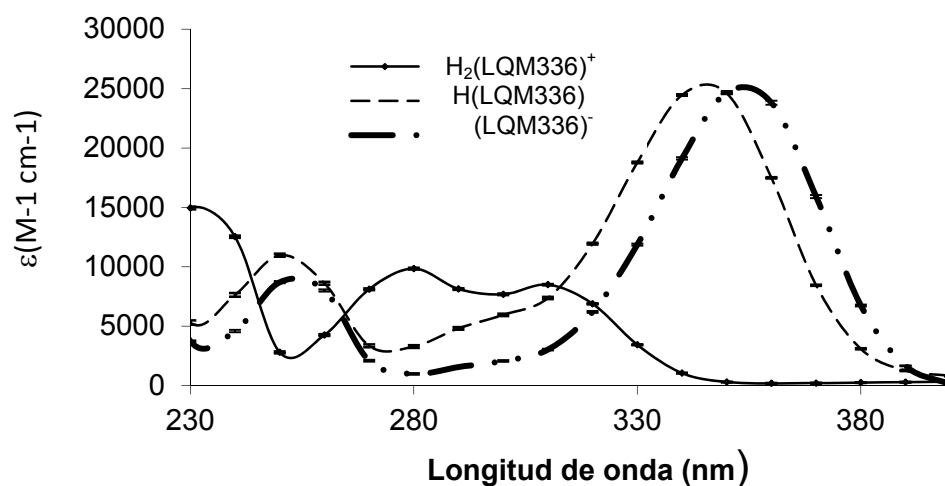


Figura 3.8.1 Coeficientes de absorptividad molar de las diferentes del LQM336 en el intervalo

$2.137 \leq \text{pH} \leq 11.460$ las líneas sólidas representan los coeficientes molares, las líneas verticales en las curvas son las desviaciones estándar.

La figura 3.8.2 muestra los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar (menores al 10%) de las 4 especies del LQM335.

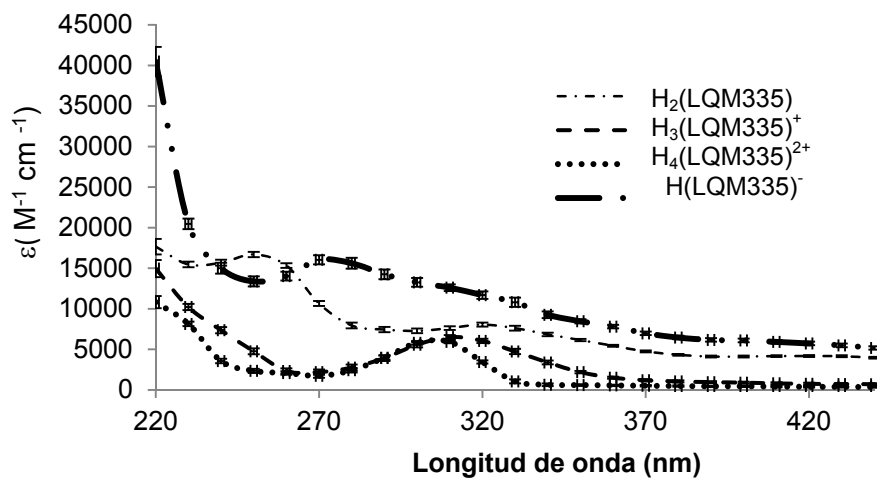


Figura 3.8.2 Coeficientes de absorptividad molar de las diferentes especies del LQM335 en el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$ las líneas sólidas representan los coeficientes molares, las líneas verticales en las curvas son las desviaciones estándar.

La figura 3.8.3 muestra los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar (menores al 10%) de las 5 especies del LQM310.

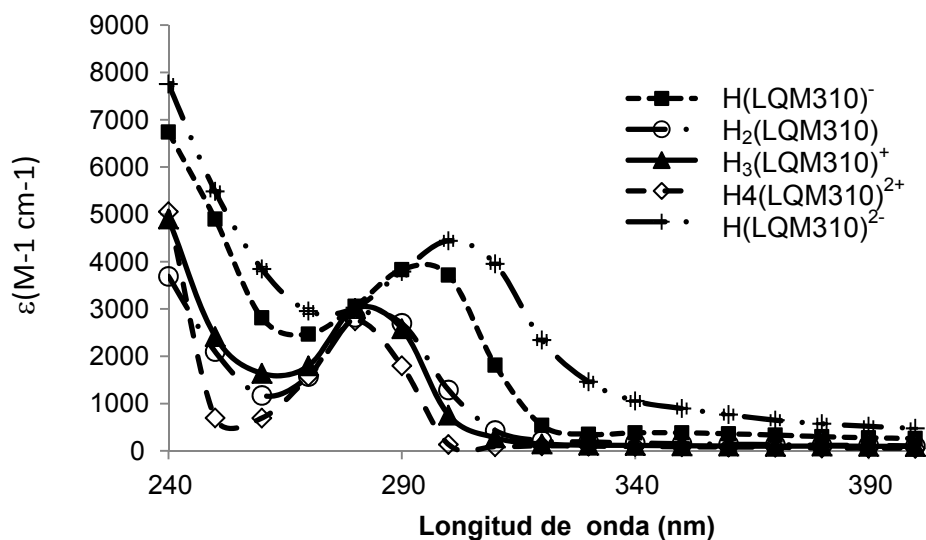


Figura 3.8.3 Coeficientes de absorptividad molar de las diferentes especies del LQM310 en el intervalo de $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$ las líneas sólidas representan los coeficientes molares, las líneas verticales en las curvas son las desviaciones estándar.

La figura 3.8.4 muestra los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar (menores al 10%) de las 5 especies del LQM323.

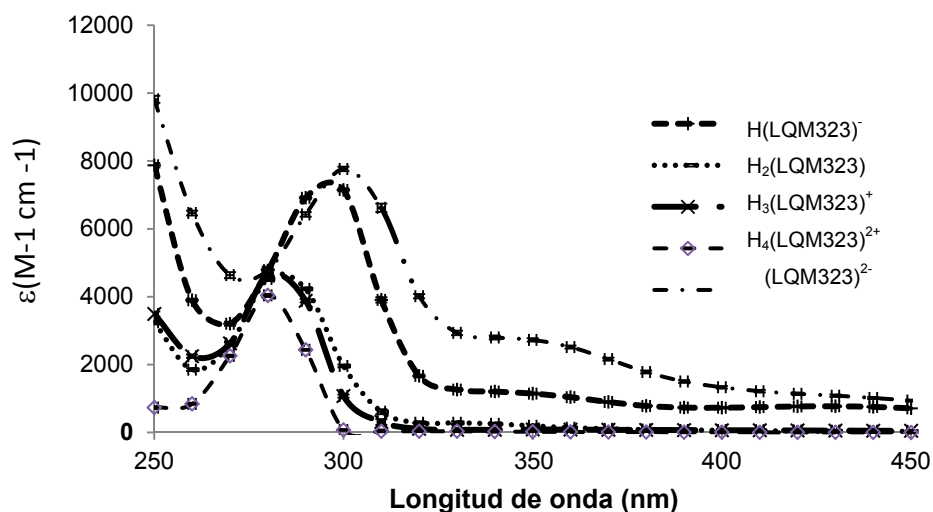


Figura 3.8.4 Coeficientes de absorptividad molar de las diferentes especies del LQM323 en el intervalo de $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$ las líneas sólidas representan los coeficientes molares, las líneas verticales en las curvas son las desviaciones estándar.

La figura 3.8.5 muestra los coeficientes de absorptividad molar obtenidos con el refinamiento en SQUAD con sus respectivas desviaciones estándar (menores al 5%) de las 4 especies del LQM322.

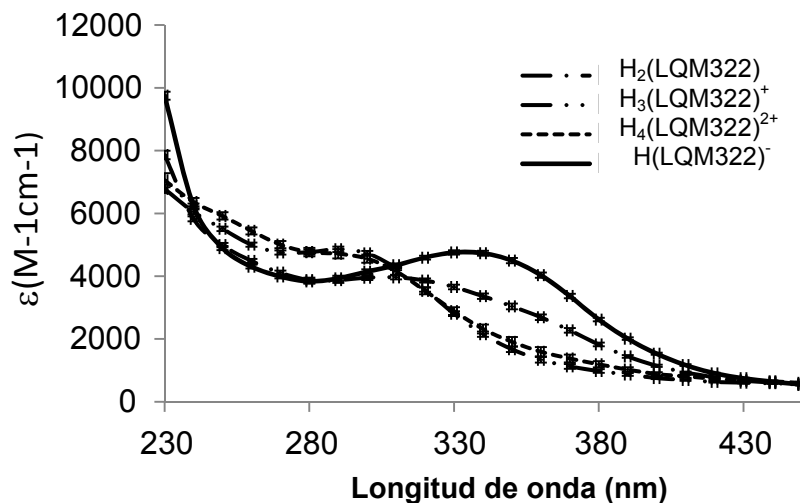


Figura 3.8.5 Coeficientes de absorptividad molar de las diferentes especies del LQM322 en el intervalo de $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$, las líneas sólidas representan los coeficientes molares, las líneas verticales en las curvas son las desviaciones estándar.

3.9 Determinación del número de especies absorbentes presentes en los LQM's con el programa TRIANG.

Por otra parte para corroborar el número de equilibrios proporcionados con SQUAD, se determinó el número de especies absorbentes con el programa computacional TRIANG[44-45] para cada LQM (Apéndice B).

En todos los casos, los datos alimentados a TRIANG fueron los mismos que se alimentaron al programa SQUAD, a continuación se muestran los resultados para los diferentes LQM's.

LQM336

Para determinar el número de especies absorbentes que presenta el LQM336 se realizaron diferentes corridas tanto para la zona ácida ($2.137 \leq \text{pH} \leq 6.986$) como la zona básica ($7.150 \leq \text{pH} \leq 11.460$), éstas se muestran en la tabla 3.9.1.

Tabla 3.9.1 Número de especies absorbentes del compuesto LQM336 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2
b	4	4	4	4	3	3	3	3	3	2

ΔT = (error en las lecturas de transmitancia)

a = número de especies absorbentes en la zona ácida.

b = número de especies absorbentes en la zona básica.

En la tabla 3.9.1 se observa que el número de especies absorbentes podrían ser para este compuesto de dos a tres especies para los diferentes ΔT en la zona ácida y de dos, tres o hasta cuatro especies absorbentes para la zona básica. Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios.

Esta diferencia puede ser atribuida debida a que el programa TRIANG maneja una ecuación de propagación del error muy simple.

A continuación se explica el funcionamiento de TRIANG, la entrada de datos del programa son los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda de una serie de soluciones a diferentes concentraciones (matriz de absorbancias A) y los errores en las lecturas de transmitancia (matriz de errores).

La matriz A de absorbancia es reducida por series de operaciones elementales a una matriz en la cual el elemento mayor se encuentra en la diagonal y todos los elementos debajo son cero (ecuación 3.9.1)

$$a'_{ij} = a_{ij} - \frac{a_{i1}}{a_{11}} a_{1j} \quad \text{Ecuación 3.9.1}$$

El criterio de decisión consiste en reducir una matriz **E** de error, la cual contiene el error esperado asociado a cada proceso de medición mediante el uso de la ecuación 3.9.2

Esta ecuación es la que se usa para la propagación de los errores en la matriz A.

$$e'_{ij} = \left[e_{ij}^2 + e_{1j}^2 \left(\frac{a_{i1}}{a_{11}} \right)^2 + e_{i1}^2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{11}} \right)^2 + e_{11}^2 \left(\frac{a_{i1} a_{1j}}{a_{11}^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 3.9.2}$$

El criterio para determinar el número de especies absorbentes es el siguiente, si el elemento de la matriz **A** diferente de cero es mayor que tres veces el elemento que corresponde a la matriz **E**. Entonces el número de especies que absorben en el sistema se estima como la suma de los elementos de **A'** diferente de cero.

LQM335

A continuación se muestran los resultados del número de especies absorbentes en el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$ ver tabla 3.9.2

Tabla 3.9.2 Número de especies absorbentes del compuesto LQM335 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	8	7	5	5	5	5	5	5	5	5

ΔT = (error en las lecturas de transmitancia)

a = número de especies absorbentes en el intervalo $2.114 \leq \text{pH} \leq 11.947$

En la tabla 3.9.2 se observa que el número de especies que absorben pueden ser cinco, siete y hasta ocho especies.

Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios, nuevamente estas diferencias puede ser atribuida debida a que el programa TRIANG maneja una ecuación de propagación del error muy simple. Estas diferencias se presentan para los LQM's: LQM310, LQM322, LQM322 y LQM329 respectivamente.

LQM310

A continuación se muestran los resultados del número de especies absorbentes en el intervalo $2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$ ver tabla 3.9.3

Tabla 3.9.3 Especies absorbentes del compuesto LQM310 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	7	6	6	4	4	4	4	4	4	4

ΔT =(error en las lecturas de transmitancia)

a= número de especies absorbentes en el intervalo $2.066 \leq \text{pH} \leq 11.895$

En la tabla 3.9.3 se observa que el número de especies absorbentes podrían ser para este compuesto de cuatro, seis y hasta siete especies para los diferentes ΔT . Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios.

LQM323

A continuación se muestran los resultados del número de especies absorbentes en el intervalo $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$ ver tabla 3.9.4

Tabla 3.9.4 Especies absorbentes del compuesto LQM323 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	5	4	4	3	3	3	3	3	3	4

ΔT =(error en las lecturas de transmitancia)

a= número de especies absorbentes en el intervalo $2.032 \leq \text{pH} \leq 11.810$

En la tabla 3.9.4 se observa que el número de especies absorbentes podrían ser para este compuesto de tres, cuatro y hasta cinco especies para los diferentes ΔT . Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios.

LQM322

A continuación se muestran los resultados del número de especies absorbentes en el intervalo $2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$ ver tabla 3.9.5

Tabla 3.9.5 Especies absorbentes del compuesto LQM322 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	4	4	3	3	2	2	2	2	2	2

ΔT =(error en las lecturas de transmitancia)

a= número de especies absorbentes en el intervalo $2.805 \leq \text{pH} \leq 11.129$

En la tabla 3.9.5 se observa que el número de especies absorbentes podrían ser para este compuesto de dos, tres y hasta cuatro especies para los diferentes ΔT . Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios.

LQM329

Los datos alimentados a TRIANG fueron los mismos que se alimentaron al programa SQUAD, a continuación se muestran los resultados para la zona ácida ($2.183 \leq \text{pH} \leq 6.897$) y la zona básica ($7.196 \leq \text{pH} \leq 11.373$) tabla 3.9.6

Tabla 3.9.6 Especies absorbentes del compuesto LQM329 para diferentes errores en la lectura de transmitancia con el programa TRIANG.

ΔT	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
a	5	4	3	3	3	3	3	2	2	2
b	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

ΔT = (error en las lecturas de transmitancia)

a= número de especies absorbentes en la zona ácida

b= número de especies absorbentes en la zona básica

En la tabla 3.9.5 se observa que el número de especies absorbentes podrían ser para este compuesto de dos, tres, cuatro y hasta cinco especies para los diferentes ΔT . Debido a esta diferencia no podemos concluir cuántas especies absorben en el sistema y poder así deducir el número de equilibrios.

En la siguiente sección se presenta la parte experimental para determinar las constantes de acidez mediante la técnica CZE.

Electroforesis Capilar de Zona (CZE)

La metodología utilizada para realizar los experimentos por la técnica CZE de los LQM's piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos es la misma que se presentó en el capítulo 2.

3.10 Movilidades electroforéticas efectivas de los LQM's.

La movilidad electroforética efectiva (u_{ef}) se determinó con la ecuación 2.4.1 para todos los LQM's.

A continuación se muestra la figura 3.10.1 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM335.

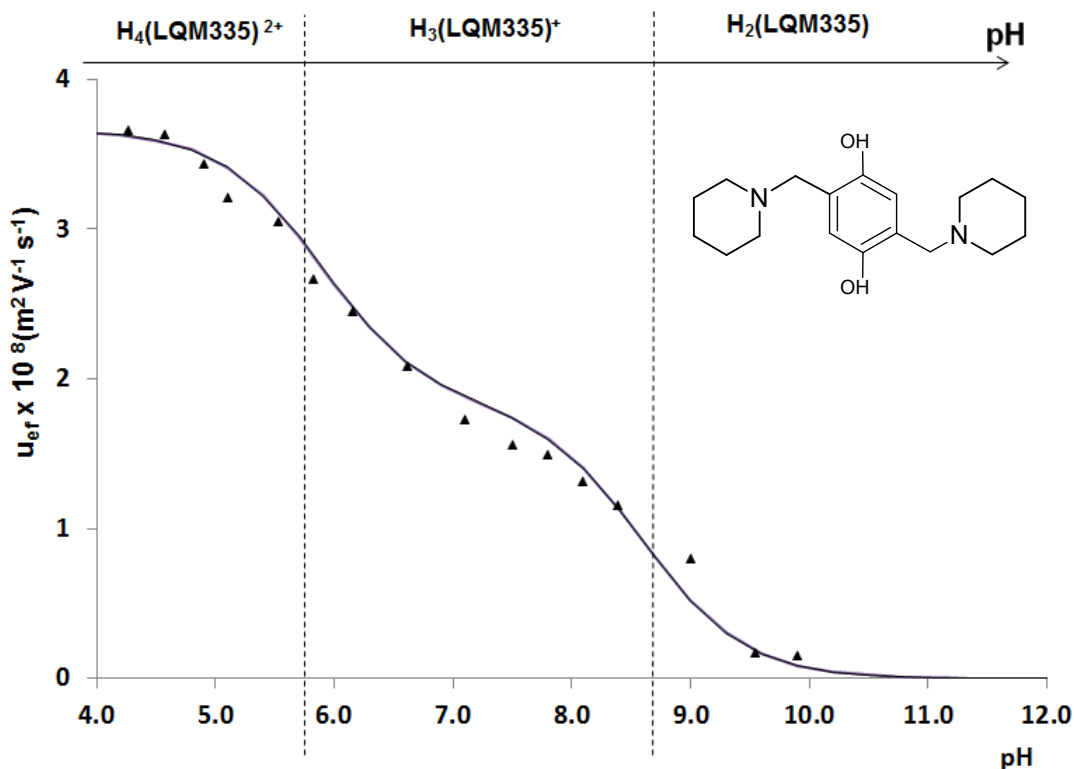


Figura 3.10.1 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM335 a $T=37^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \blacktriangle representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 3.10.1 se observan dos de las cuatro posibles desprotonaciones de este compuesto, una corresponde al dicatión $\text{H}_4(\text{LQM335})^{2+}$ la cual predomina para $\text{pH} < 5$

aproximadamente, el monocatión $H_3(LQM335)^+$ predomina en un intervalo amplio de aproximadamente $6 < \text{pH} < 8.5$ y la especie neutra $H_2(LQM335)$ también se observa.

Cabe mencionar que el monoanión $H(LQM335)^-$ y el dianión $(LQM335)^{2-}$ no se observaron debido a que la tercera y cuarta desprotonación se encuentran a $\text{pH} > 12$ aproximadamente.

A continuación se muestra la figura 3.10.2 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM336.

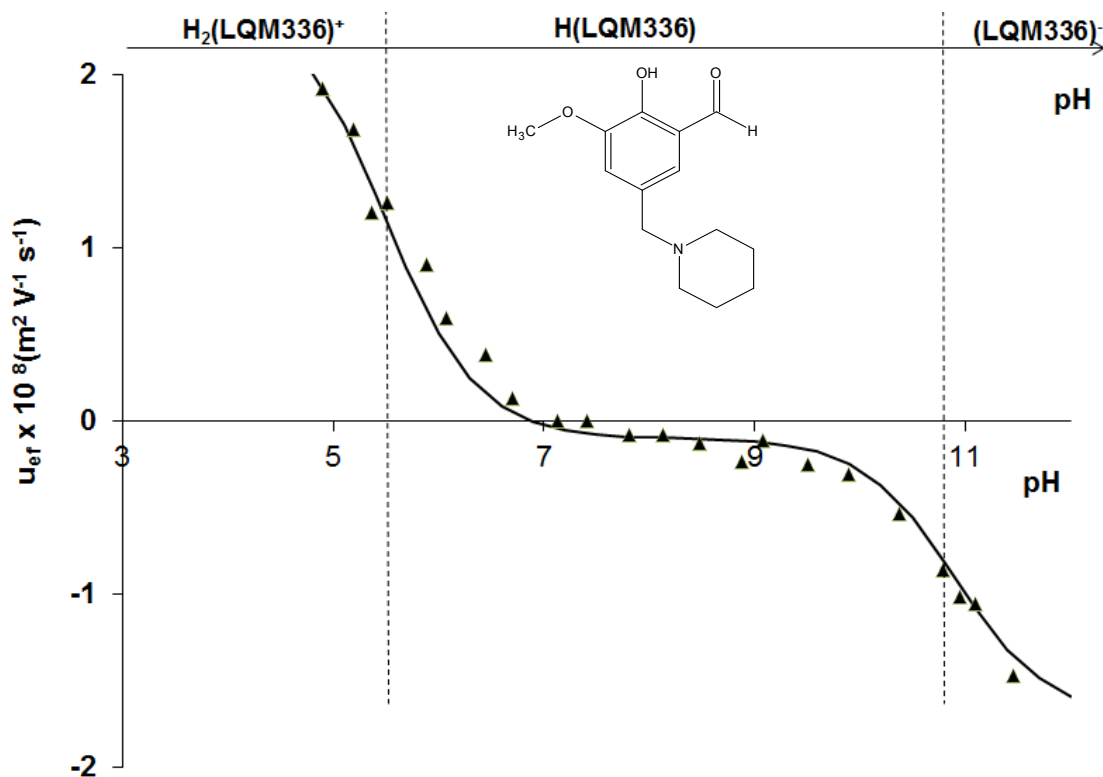


Figura 3.10.2. Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM336 a $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \blacktriangle representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 3.10.2 se observan las dos posibles desprotonaciones de este compuesto, una corresponde al dicatión $H_2(LQM336)^+$ la cual predomina para $\text{pH} < 5$ aproximadamente, la especie neutra $H(LQM336)$ en un intervalo amplio $5.5 < \text{pH} < 10$

aproximadamente y el monoanión (LQM336)⁻ que predominan a pH muy básicos por arriba de pH>11 aproximadamente.

A continuación se muestra la figura 3.10.3 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM310.

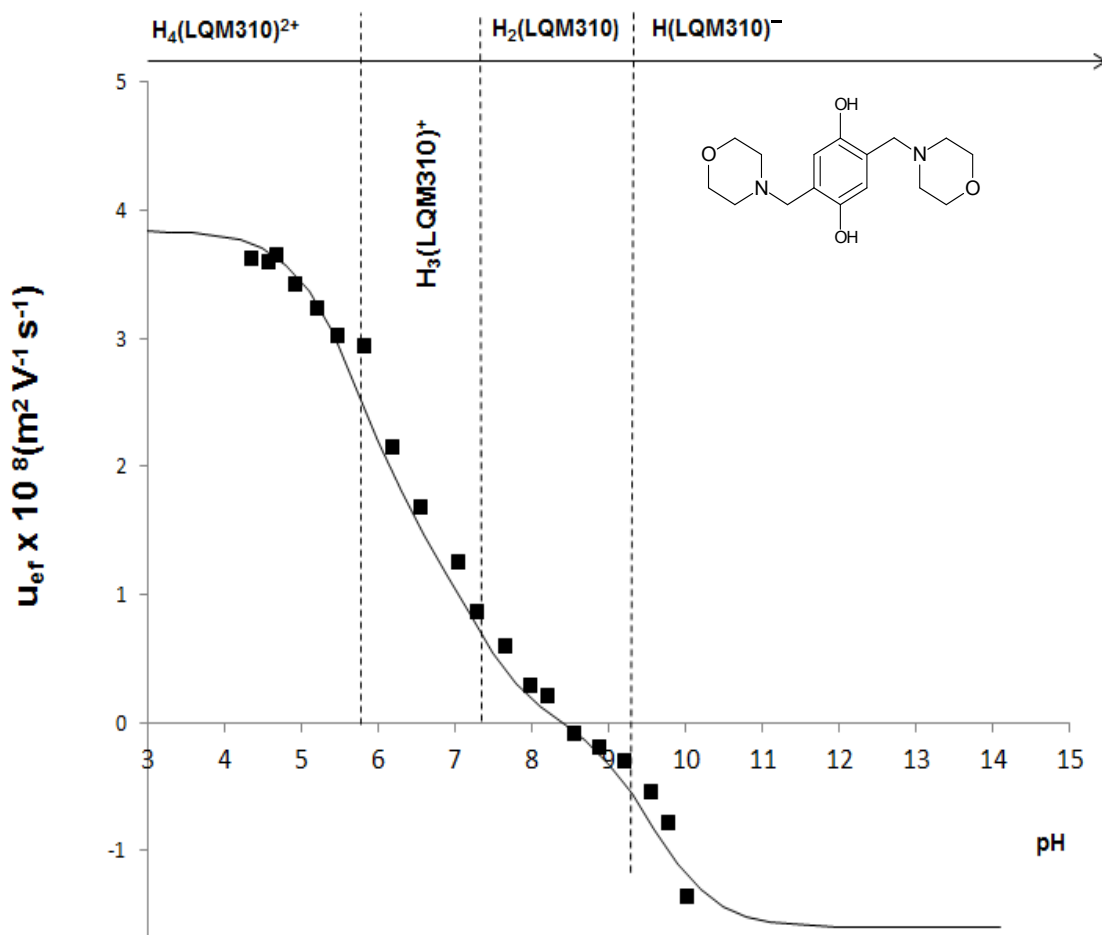


Figura 3.10.3 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM310 a T=37 °C y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores ■ representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de log β obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 3.10.3 se observan tres de las cuatro posibles desprotonaciones de este compuesto, una corresponde al dicatión $H_4(\text{LQM310})^{2+}$ la cual predomina para pH < 5 aproximadamente, el monocatión $H_3(\text{LQM310})^+$ el cual predomina en un intervalo corto 5.5 < pH < 7 aproximadamente y la especie neutra $H_2(\text{LQM310})$ también se observa en un intervalo corto 7 < pH < 9 aproximadamente.

El monoanión $H(LQM310)^-$ y el dianión $(LQM310)^{2-}$ no se observaron debido a que la cuarta desprotonación se encuentran a $pH > 11$ aproximadamente, el cual está fuera del intervalo de trabajo.

A continuación se muestra la figura 3.10.4 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM323.

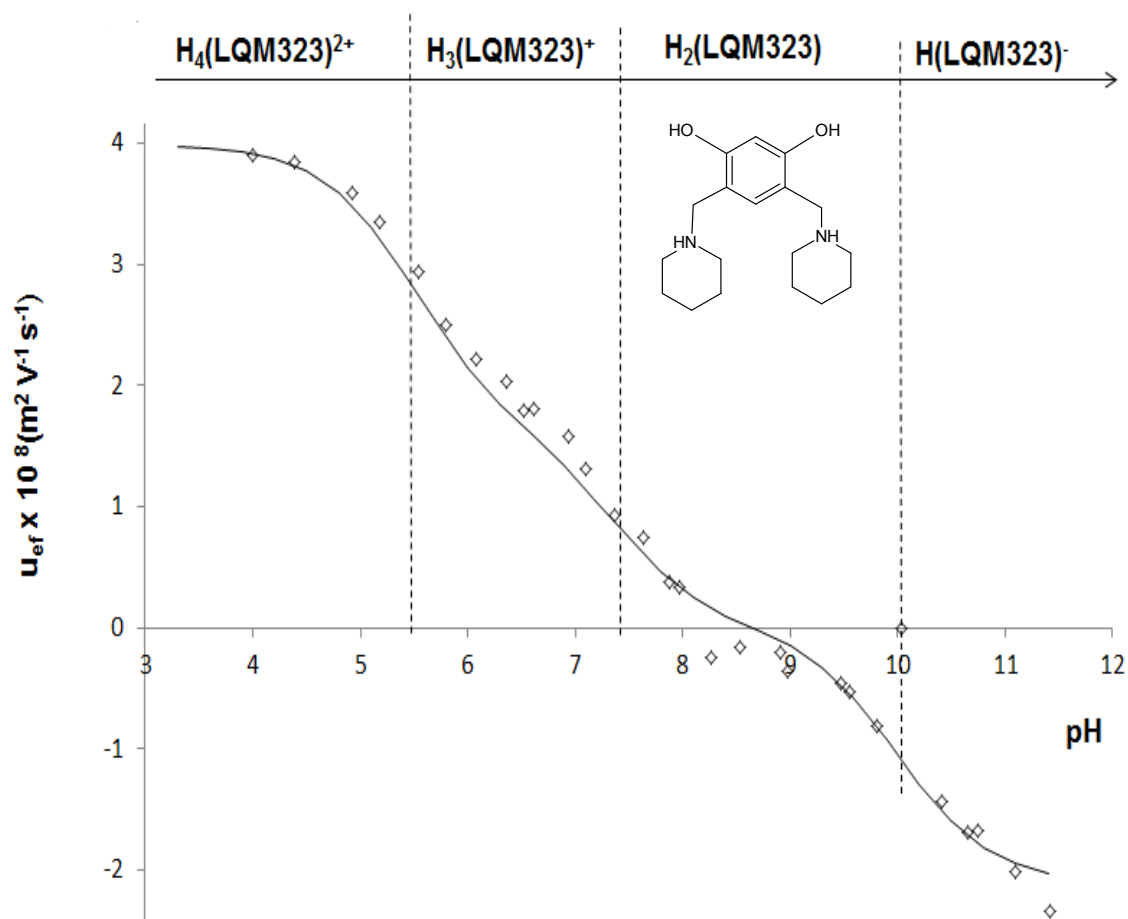


Figura 3.10.4 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM323 a $T=37^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

Caber resaltar que los LQM's LQM310 y el LQM323 son isómeros, en la figura 3.10.4 observan tres de las cuatro posibles desprotonaciones de este compuesto, una corresponde al dicatión $H_4(LQM323)^{2+}$ la cual predomina para $pH < 5.4$ aproximadamente,

el monocación $H_3(LQM323)^+$ el cual predomina en un intervalo corto $5.5 < \text{pH} < 7.5$ aproximadamente y la especie neutra $H_2(LQM323)$ en un intervalo de $7.5 < \text{pH} < 10$ aproximadamente.

El anión $H(LQM323)^-$ y el dianión $(LQM323)^{2-}$ no se observaron debido a que la cuarta desprotonación se encuentran a $\text{pH} > 11$, la cual está fuera del intervalo de trabajo. Se señala que el comportamiento de la curva del LQM310 y LQM323 son muy similares.

A continuación se muestra la figura 3.10.5 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM322.

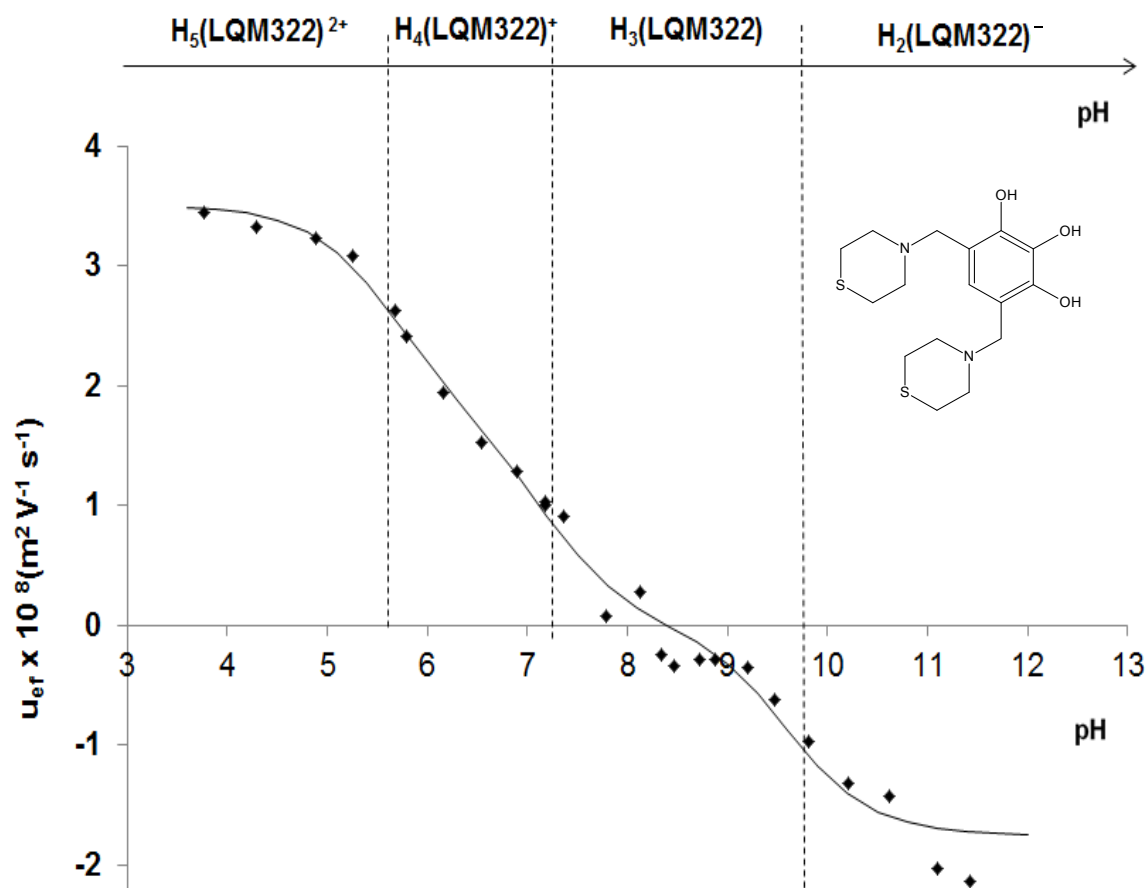


Figura 3.10.5. Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM322 a una $T=37^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \blacklozenge representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 3.10.5 sólo se observan tres de las cinco posibles desprotonaciones, la primera corresponde al dicatión $H_5(LQM322)^{2+}$ la cual predomina para $pH < 5.2$ aproximadamente, el monocatión $H_4(LQM322)^+$ el cual predomina en un intervalo corto $5.5 < pH < 7.2$ aproximadamente y la especie neutra $H_3(LQM322)$ predomina en el intervalo $7.3 < pH < 10$ aproximadamente.

Las tres especies restantes, el monoanión $H_2(LQM310)^-$, el dianión $H(LQM310)^{2-}$ y la especie $(LQM322)^{3-}$ no se observan debido a que éstas se encuentran a pHs fuera del intervalo de trabajo.

A continuación se muestra la figura 3.10.6 el cambio de movilidad electroforética efectiva con respecto al pH para el compuesto LQM329.

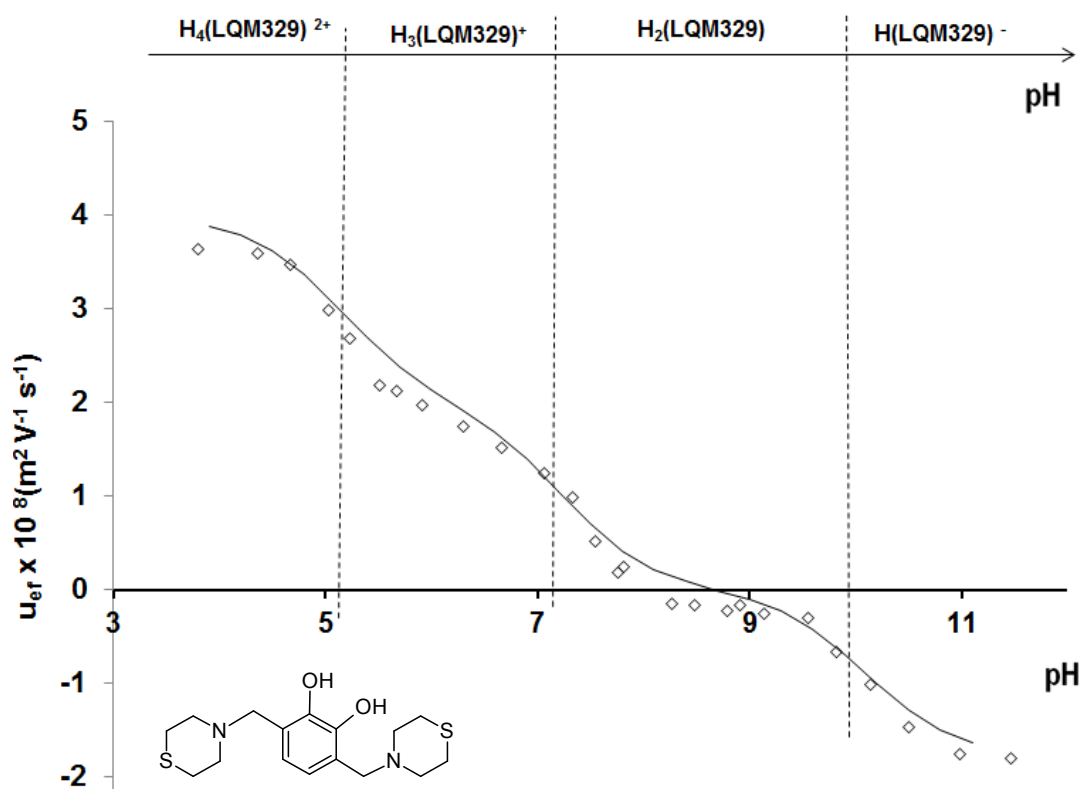


Figura 3.10.6 Movilidad electroforética vs pH para el compuesto LQM329 a $T=37^\circ C$ y fuerza iónica 0.05 M. Los marcadores \diamond representan los valores experimentales de movilidad electroforética efectiva, la línea sólida representa el ajuste obtenido con los valores de $\log \beta$ obtenidos con el programa SQUAD.

En la figura 3.10.6 se observan tres de las cuatro posibles desprotonaciones de este compuesto, una de ellas el dicatión $H_4(LQM329)^{2+}$ predomina para $pH < 4.8$ aproximadamente, el catión $H_3(LQM329)^{2+}$ predomina en un intervalo corto $5 < pH < 7$ aproximadamente y la especie neutra $H_2(LQM29)$ también se observa .

El monoanión $H(LQM329)^-$ y el dianión $(LQM329)^{2-}$ no se observaron debido a que la cuarta desprotonación se encuentran a $pH > 11$ aproximadamente, la cual está fuera del intervalo de trabajo.

3.11 Determinación de las constantes de acidez utilizando SQUAD.

Con los valores de movilidad electroforética efectiva en función del pH, se introducen los datos de movilidad en función del pH al programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes.

A continuación se muestra en la tabla 3.11.1 los valores de pKa obtenidos con el programa SQUAD para los diferentes compuestos LQM's, así como sus coeficientes de movilidad.

Tabla 3.11.1 Equilibrios químicos de los LQM's con el programa SQUAD.

Compuestos y equilibrios relacionados	pK _{ai}	Movilidad electroforética efectiva $(u_{ef})(\times 10^8)m^2V^{-1}s^{-1}$	Conductividad equivalente ^b $(\lambda_{HJ(LQMxxx)_z})$ $cm^2 \Omega^{-1} equiv^{-1}$
$H_4(LQM335)^{2+} \rightleftharpoons H_3(LQM335)^+ + H^+$ $H_3(LQM335)^+ \rightleftharpoons H_2(LQM335) + H^+$ $H_4(LQM335)^{2+}$ $H_3(LQM335)^+$	5.860 ± 0.040 8.695 ± 0.059	LQM335 $\sigma_{reg} = 0.070^c$ 3.664 ± 0.310 1.695 ± 0.037	35.35 ± 2.99 16.35 ± 0.35
$H_2(LQM336)^+ \rightleftharpoons H(LQM336) + H^+$ $H(LQM336) \rightleftharpoons (LQM336)^- + H^+$ $H_2(LQM336)^+$ $H(LQM336)$ $(LQM336)^-$	5.503 ± 0.049 10.910 ± 0.060	LQM336 $\sigma_{reg} = 0.110^c$ 2.439 ± 0.063 0^d -1.800 ± 0.04	23.53 ± 0.60 0 16.94 ± 0.38
$H_4(LQM310)^{2+} \rightleftharpoons H_3(LQM310)^+ + H^+$ $H_3(LQM310)^+ \rightleftharpoons H_2(LQM310) + H^+$ $H_2(LQM310) \rightleftharpoons H(LQM310)^- + H^+$ $H_4(LQM310)^{2+}$ $H_3(LQM310)^+$ $H_2(LQM310)$ $H(LQM310)^-$	5.700^d 7.200^d 9.178^d	LQM310 $\sigma_{reg} = 0.116^c$ 3.845 ± 0.014 1.584 ± 0.083 0^d -1.600 ± 0.024	37.09 ± 0.13 15.23 ± 0.80 0 15.43 ± 0.23
$H_4(LQM323)^{2+} \rightleftharpoons H_3(LQM323)^+ + H^+$ $H_3(LQM323)^+ \rightleftharpoons H_2(LQM323) + H^+$ $H_2(LQM323) \rightleftharpoons H(LQM323)^- + H^+$ $H_4(LQM323)^{2+}$ $H_3(LQM323)^+$ $H_2(LQM323)$ $H(LQM323)^-$	5.513 ± 0.032 7.312 ± 0.051 10.134 ± 0.022	LQM323 $\sigma_{reg} = 0.083^c$ 3.694 ± 0.119 1.736 ± 0.075 0 -1.410 ± 0.075	35.64 ± 1.14 16.74 ± 0.72 0 13.60 ± 0.72

Continuación de la tabla 3.11.1. Equilibrios químicos de los LQM's con el programa SQUAD.

$H_5(LQM322)^{2+} \rightleftharpoons H_4(LQM322)^+ + H^+$ $H_4(LQM322)^+ \rightleftharpoons H_3(LQM322) + H^+$ $H_3(LQM322) \rightleftharpoons H_2(LQM322)^- + H^+$ $H_5(LQM322)^{2+}$ $H_4(LQM322)^+$ $H_3(LQM322)$ $H_2(LQM322)^-$	5.639 ± 0.052 7.205 ± 0.118 9.801 ± 0.012	LQM322 $\sigma_{reg} = 0.150^c$ 3.455 ± 0.031 1.729 ± 0.041 0 -1.690 ± 0.067	33.33 ± 0.29 16.88 ± 0.40 0 16.30 ± 0.64
$H_4(LQM329)^{2+} \rightleftharpoons H_3(LQM329)^+ + H^+$ $H_3(LQM329)^+ \rightleftharpoons H_2(LQM329) + H^+$ $H_2(LQM329) \rightleftharpoons H(LQM329)^- + H^+$ $H_4(LQM329)^{2+}$ $H_3(LQM329)^+$ $H_2(LQM329)$ $H(LQM329)^-$	5.144 ± 0.066 7.233 ± 0.093 9.903 ± 0.078	LQM329 $\sigma_{reg} = 0.025^c$ 3.857 ± 0.014 1.766 ± 0.020 0 -1.778 ± 0.030	37.12 ± 0.13 16.68 ± 0.18 0 17.15 ± 0.28

^a La movilidad electroforética efectiva de las especies estimadas en el refinamiento.

^b Conductividad equivalente de los iones calculados con la ecuación $|z|\lambda H_j(LQMXXX)_z = F u H_j(LQMXXX)_z$ donde F es la constante de Faraday.

^c σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión.

^d Este parámetro ha sido mantenido durante el refinamiento.

En la tabla 3.11.1 se observan dos de los cuatro valores de pKa posibles que presenta estructura química para el LQM335, se sugiere que los otros dos valores de pKa se encuentren por arriba de pH mayores a 11 aproximadamente.

Para el LQM336 se obtuvieron los dos posibles valores de pKa. Caso contrario el LQM310, se obtuvieron solamente 3 de los 4 posibles valores de pKa, se sugiere que el cuarto valor se encuentre a pH mayores de 11. Un caso similar presenta el LQM323. El LQM322 presenta 5 posibles desprotonaciones, se obtuvieron 3 valores de pKa, se sugiere que los otros dos valores se encuentren a pH mayores de 11.6 aproximadamente.

El LQM329 presentan 4 posibles desprotonaciones, se obtuvieron 3 valores de pKa solamente, nuevamente se sugiere que el otro valor se encuentren a pH mayores de 11.5 aproximadamente.

Los valores de movilidad electroforética de cada especie son con coherentes con lo esperado, por ejemplo, el LQM322 su especie totalmente protonada se representa como

$H_5(LQM322)^{2+}$, esta especie presenta un coeficiente de movilidad $u_{H_5(LQM322)^{2+}}$ con un valor de $3.455 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, ahora bien, el valor esperado para la especie $H_4(LQM322)^+$ de este compuesto debe ser un coeficiente de movilidad de la mitad de la especie $H_5(LQM322)^{2+}$, en este caso fue $u_{H_4(LQM322)^+} = 1.729 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. La especie $H_3(LQM322)$ es neutra, esta presentó un coeficiente de movilidad con un valor de 0 tal y como se esperaba, la especie $H_2(LQM322)^-$ debe de tener un valor similar a la especie $H_4(LQM322)^+$ en este caso fue de $-1.778 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

El mismo comportamiento ocurre en todas las curvas mostradas para los diferentes LQM's.

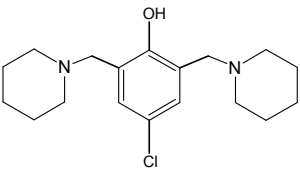
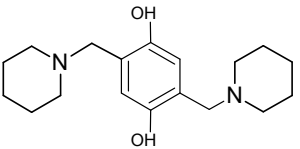
Los datos mostrados en la tabla 3.8.2 muestran valores muy similares a los mostrados en la tabla 3.11.1 lo cual corrobora los valores de pKa obtenidos con ambas técnicas, las diferencias se atribuyen principalmente a que la fuerza iónica utilizada en ambas técnicas no es la misma.

3.12 Discusión general piperidínicos (nuevos), morfolínicos y tiomorfolínicos

Se observa en la tabla 3.12.1 los valores de pKa de LQM335 y LQM346 (este último se muestra con el fin de comparar el efecto de los sustituyentes). Se observa que el sustituyente OH en la posición *para* y el grupo piperidinilmetil en la posición *meta* en la molécula LQM335, tienen el efecto de disminuir la acidez en el primer valor de pKa e incrementarlo en el segundo si se compara con el LQM346. El efecto en el primer pKa podría atribuirse al cambio de sustituyente, ya que el OH es un grupo electrón donador, el cual tiene el efecto de reducir la acidez, el segundo puede deberse al cambio del sustituyente en la posición *meta*.

Cabe mencionar que el LQM336 no pueden compararse los efectos de los sustituyentes debido a que no presenta una estructura similar a los LQM's piperidínicos.

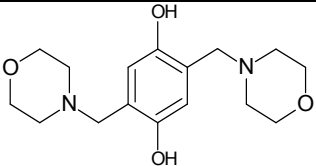
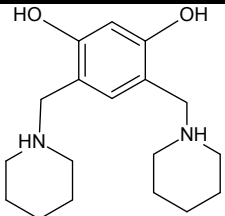
Tabla 3.12.1 Valores de pKa obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$	$pK_{a4} \pm \sigma$
LQM346 	5.480	9.887	<i>No refinado</i>	No es posible una cuarta desprotonación.
LQM335 	5.901	8.745	11.255	pH > 12

A continuación se muestra en la tabla 3.12.2 los valores de pKa del LQM310 y LQM323. Se observa que ambas moléculas tienen los mismos sustituyentes, solo que estos cambian respecto a la posición *orto*, *meta* y *para* en ambas moléculas. Los valores de pKa resultaron ser casi idénticos mediante la técnica Espectrofotometría UV-Vis, no ocurrió lo

mismo con CZE, el tercer valor de pKa difiere en una unidad de pKa, este efecto podría a la fuerza iónica y no a la temperatura ya que se trabajó con la misma temperatura en ambas técnicas.

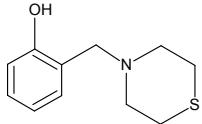
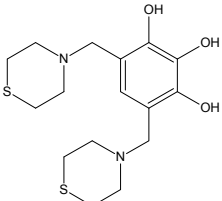
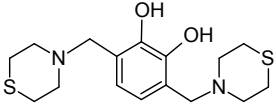
Tabla 3.12.2 Valores de pKa obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis y CZE.

LQM's		pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
 LQM310	Espec. UV-Vis	5.775	7.108	9.147	11.087
	CZE	5.700	7.200	9.178	No se observó experimentalmente
 LQM323	Espec. UV-Vis	5.709	7.201	9.141	11.065
	CZE	5.513	7.312	10.134	No se observó experimentalmente

En seguida se muestra en la tabla 3.12.3 los valores de pKa del LQM331³⁰, LQM322 y LQM329. La adición de los sustituyentes tiomorfolin-metil (grupo electrón-atractor) en la posición *para* y los dos OH (grupo electrón-donador) en *orto* y *meta* respectivamente en el LQM322, tienen el efecto de incrementar la acidez en esta molécula, lo cual se observa en los valores de pKa obtenidos experimentalmente. Este incremento se debe principalmente al efecto del sustituyente en la posición *para*, los fenoles con un sustituyente atractor de electrones son más ácidos debido a que estos sustituyentes deslocalizan la carga negativa.

Si comparamos el LQM329 con el LQM322 son moléculas parecidas, éstas difieren en la ubicación de los sustituyentes. El LQM329 tiene un OH (grupo electrón-donador) menos, esta diferencia además de las posiciones de los sustituyentes podría explicar por qué el primer valor de pKa es más ácido que el LQM322.

Tabla 3.12.3 Valores de pKa obtenidos experimentalmente con espectrofotometría UV-Vis.

LQM's	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
LQM331 	8.889	10.391		
LQM322^b 	5.644	7.182	9.623	pH > 12
LQM329^b 	5.166	7.223	10.100	pH > 12

CAPÍTULO 4

ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO

4.1 Metodología empleada en los cálculos teóricos.

El estudio teórico está enfocado a los compuestos piperidínicos ya que muestran una estructura similar, el LQM344 es la estructura base de los LQM345, LMQ346 y LQM351, estos últimos difieren en el grupo sustituyente en la posición *para* del anillo, debido a esto se realizó el estudio teórico utilizando como base del cálculo el LQM344.

En el caso particular de las piperidinas, que presentan más de un pKa, es importante además determinar el orden de desprotonación en las diferentes estructuras de interés. La determinación de pKas, con exactitud equivalente a la experimental es un reto para la Química Computacional, en especial cuando el medio es agua. Diferentes metodologías han sido probadas con éxito previamente, pero la mejor metodología depende del sistema en cuestión. En el caso de las piperidinas no hay estudios teóricos previos del pKa, por lo que el primer paso para su cálculo será probar diferentes metodologías y establecer cuál es la más adecuada para estos sistemas en particular. Posteriormente se utilizará esta metodología para calcular los diferentes pKas de una serie de piperidinas de interés para ayudar a determinar el mecanismo de desprotonación más probable. Además, se intentará establecer alguna relación estructura-actividad que permita hacer predicciones no sólo dentro de la serie, sino acerca de que modificaciones estructurales conllevarían a la obtención de piperidinas con pKas dentro de un intervalo deseado.

Cálculo de constantes de acidez y pKas utilizando la teoría de Funcionales de la Densidad.

El cálculo teórico de pKas en medio acuoso es un reto para la Química Computacional. En otros solventes valores de buena exactitud son fácilmente obtenibles usando modelos continuos de solvente[46-48].

En el caso del agua, su complejidad radica en la gran cantidad de puentes de hidrógeno que no son tenidos en cuenta en los modelos continuos[49].

Diferentes aproximaciones han sido utilizadas para tratar con el problema de calcular pKas en agua. Una de ellas es incorporar valores experimentales de las energías libres de solvatación del protón, lo cual incrementa la exactitud de los pKas calculados[50-52].

Otra opción es incorporar moléculas de agua explícitamente[53].

Ambas aproximaciones conducen a mejores resultados que utilizar únicamente modelos continuos. Desafortunadamente, el éxito de las diferentes aproximaciones depende del sistema en cuestión. Es por ello que es necesario probar diferentes variaciones de éstas cuando tratamos con cálculos teóricos de pKas para sistemas no estudiados previamente.

En nuestro caso en particular se utilizará la especie más pequeña (LQM344) para el estudio metodológico y la aproximación que mejor funcione se utilizará para el resto de la serie.

Los cálculos se realizaron utilizando el programa computacional Gaussian 03[54]. Para todas las especies modeladas, se llevó a cabo la optimización de la geometría y los cálculos de frecuencia utilizando el funcional híbrido B3LYP[55-57] y el conjunto base **6-31+G (d, p)**.

Las energías se han mejorado mediante cálculos de punto simple en estas geometrías, utilizando el mismo funcional y la base **6-311+G (d, p)**. Las correcciones térmicas a 298 K se incluyeron en el cálculo de las energías relativas.

El análisis conformacional se llevó a cabo utilizando las geometrías optimizadas en solución acuosa, utilizando el modelo continuo polarizable (PCM), específicamente el formalismo de la ecuación integral (IEF-PCM) utilizando agua como disolvente ($\epsilon = 78.39$). En los cálculos de PCM, la elección de la cavidad del soluto es importante porque las energías y las propiedades calculadas dependen fuertemente del tamaño de la cavidad. Para todos los caminos modelados, se usaron los radios atómicos del modelo topológico de átomos unidos (UAHF).

Para los cálculos de pKa, se probaron diferentes enfoques, para el sistema más pequeño (LQM344). En el primer enfoque (A0) se llevaron a cabo todos los cálculos dentro del esquema de PCM. En el segundo enfoque (A1) se llevaron a cabo las optimizaciones de la geometría y los cálculos de frecuencia en fase de gas (al vacío), con una molécula de agua explícita en las proximidades del grupo hidroxilo en el fragmento fenólico. Entonces el efecto del solvente se incluyó a posteriori mediante cálculos de un punto simple en la geometría en fase gas. El tercer enfoque (A2) fue muy similar al segundo, excepto que en

este caso, una segunda molécula de agua se incluyó explícitamente en la vecindad del átomo de N en el grupo piperidínico.

En la tabla 4.1.1 se muestra la comparación entre los resultados obtenidos mediante estas metodologías y los datos experimentales obtenidos por Espectrofotometría y CZE.

Tabla 4.1.1 Desviación de los valores de pKas calculados en base a los valores experimentales para el sistema LQM344.

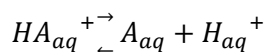
	Espectrofotometría		CZE		RMSE	MUE
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}		
exp (pK_a)	5.559	10.185	5.55	11.0	-	-
A0 ($pK_a^{calc} - pK_a^{exp}$)	0.68	1.69	0.69	0.87	1.066	0.981
A1 ($pK_a^{calc} - pK_a^{exp}$)	0.98	0.68	0.99	-0.14	0.776	0.695
A2 ($pK_a^{calc} - pK_a^{exp}$)	0.22	-0.28	0.23	-1.09	0.586	0.454

Con base a los resultados mostrados en la tabla 4.1.1 se obtuvieron los mejores resultados con el enfoque A2. También es interesante notar que este esquema mixto es computacionalmente menos caro que la realización de todos los cálculos a nivel de PCM. Los resultados de la tabla son coherentes con un informe anterior que muestra que la inclusión de moléculas de agua explícitas, además de un modelo de solvatación continuo puede producir mejores resultados que utilizando sólo un modelo continuo al mismo nivel de la teoría[53].

Sobre la base de estos resultados, se calcularon los valores de pKa para los otros sistemas utilizando el enfoque A2, es decir, las optimizaciones de geometría y los cálculos de frecuencia se obtuvieron utilizando el nivel de teoría **B3LYP/6-31+ G (d, p)**, seguido por un cálculo con PCM y cálculos de punto simple utilizando la combinación de funcional

y conjunto de funciones de base **B3LYP / 6-311++G (d, p)**. Las energías libres de Gibbs obtenidas por este cálculo se utilizaron para calcular las energías libres de Gibbs de reacción correspondientes a los procesos de desprotonación: ΔG_{deprot}^0 .

Esta magnitud se calculó para cada uno:



$$\Delta G_{deprot}^0 = G_{aq}(A) + G_{aq}(H^+) - G_{aq}(AH^+) \quad \text{Ecuación 4.1.1}$$

La energía libre de Gibbs del protón en solución acuosa, el término $G_{aq}(H^+)$, fue estimado mediante valores experimentales:

$$G_{aq}(H^+) = G_{gas}(H^+) + \Delta G_s(H^+) \quad \text{Ecuación 4.1.2}$$

Donde, $G_{gas}(H^+) = -6.28 \text{ kcal/mol}$ y representa la energía libre de Gibbs del protón en fase gas, mientras $\Delta G_s(H^+) = -264.61 \text{ kcal/mol}$ es la energía libre de solvatación del protón. Este procedimiento se ha utilizado anteriormente en el cálculo de los valores de pKa con resultados exitosos[50-52, 58-59].

Las energías libres de Gibbs en solución acuosa para las reacciones de desprotonación son a su vez utilizadas para calcular la constante de equilibrio (K_a) utilizando la siguiente ecuación:

$$K_a = e^{-\Delta G_{deprot}^0/RT} \quad \text{Ecuación 4.1.3}$$

Y utilizando la definición de pKa

$$pK_a = -\log(K_a) \quad \text{Ecuación 4.1.4}$$

4.2. Estudios teóricos de los mecanismos de desprotonación.

La primera etapa teórica fue el estudio conformacional de las especies involucradas. Para ello se realizaron cálculos de exploración relajada en solución acuosa (PCM) utilizando el nivel de teoría **B3LYP/6-31+G(d,p)** para las especies protonadas del sistema monopiperidínico. Los resultados para H_2L^+ ($\text{R} = \text{NO}_2$) se muestran en la Figura 4.2.1

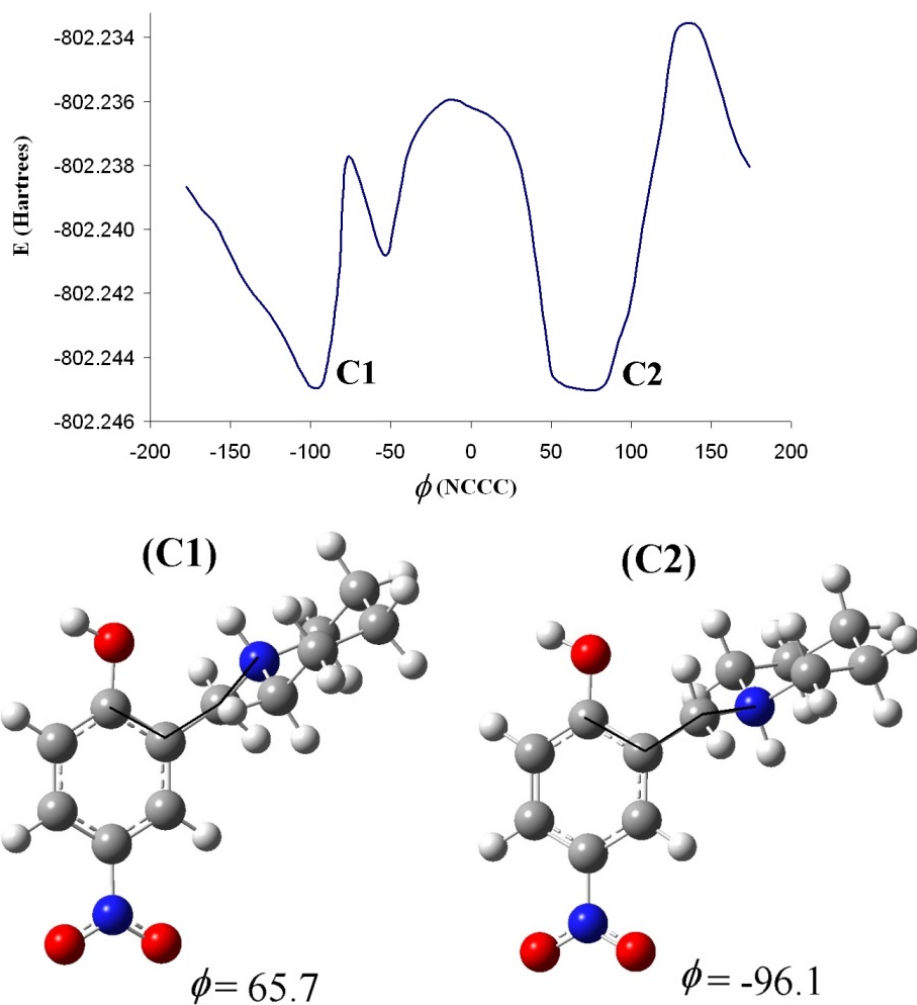
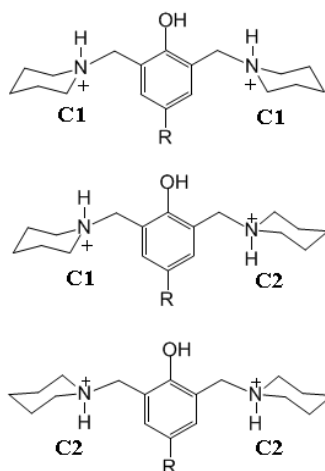


Figura 4.2.1 Cálculos de exploración relajada en solución acuosa (PCM)

Se encontraron dos mínimos en la superficie de energía potencial (PES) con energías electrónicas similares. Estos dos puntos fueron completamente optimizados y sus correcciones térmicas se calcularon a 298.15 K, con el mismo nivel de cálculo y las energías se han mejorado con los cálculos de punto simple utilizando el funcional y base

B3LYP/6-311+ + G (d, p). Se encontró que la configuración C2 es menor energía que el isómero C1 por 0.30 kcal / mol, en términos de energía libre de Gibbs.

Sobre la base de esta información, se consideraron tres conformémeros para los sistemas bipiperidínicos (H_3LL^{2+}): C1-C1, C1-C2, y C2-C2 (Esquema 3)



Esquema 3

Los dos últimos conformémeros resultaron ser casi idénticos en energía libre de Gibbs. En consecuencia la conformación C1-C2 fue la elegida en el caso de la piperidina, en relación con el fenol, quizás ésta pudiese jugar un papel importante en la desprotonación de los átomos de N.

Además, y puesto que hemos elegido utilizar un modelo mixto para el cálculo de la evolución de la energía de los sistemas estudiados, las conformaciones equivalentes se calcularon para la especie H_2L^+ utilizando el enfoque A2, descrito anteriormente, se encontró que el conformémero C2 fue inferior en energía que el conformémero C1 por 0.38 kcal / mol, divergiendo de los cálculos PCM puros por sólo 0.08 kcal / mol, lo que puede considerarse idéntico en términos de precisión mecánico cuántica. Esto también apoya la validez del enfoque A2, por lo menos para los sistemas estudiados en este trabajo.

Sin embargo, aún es necesaria otra validación. Se ha descrito previamente que la geometría en fase gas de los fenoles desprotonados tienden a predecir la distancia más

corta en el enlace O-C: aproximadamente 0.05 Å cuando se compara con la geometría PCM⁵¹.

Por lo tanto parece relevante comprobar si la inclusión de moléculas explícitas de agua en la fase gaseosa resuelve este problema. El sistema de H_2L^+ fue elegido para llevar a cabo este análisis ya que el sustituyente en la posición *para* es el más atrayente de electrones entre todas las estudiadas. En consecuencia, se espera que cause el acortamiento más grande en el enlace O-C fenólico. Se encontró que la diferencia se reduce a 0.015 y 0.006 Å para especies monodesprotonadas y didesprotonadas respectivamente. Dado que la diferencia entre estos valores es muy pequeña, parece que la inclusión de moléculas de agua explícitas especialmente en las proximidades del grupo hidroxilo en el fenol, resuelve el problema de la geometría y que la validez de nuestro modelo es respaldado.

Otra prueba se llevó a cabo todavía antes de usar el enfoque A2. Se espera que los sitios ácidos para una especie molecular estén directamente relacionados con la ubicación del orbital molecular más bajo desocupado (LUMO). Se espera que este sitio donde se encuentre más localizado el LUMO corresponda al H más ácido. Por lo tanto resulta relevante para comprobar si la ubicación del orbital LUMO es la misma dentro del modelo PCM y el enfoque A2. Se encontró que independientemente del número de grupos de piperidina en las especies estudiadas y de la naturaleza del sustituyente en la posición *para* del fenol, ambos enfoques están de acuerdo en la predicción de los sitios más ácidos. Dado que esta prueba también valida el enfoque A2, todos los resultados presentados de ahora en adelante corresponden a los obtenidos con el enfoque A2.

La densidad de superficie LUMO obtenida para las especies H_2L^+ and H_3LL^{+2} se muestran en la figura 4.2.2

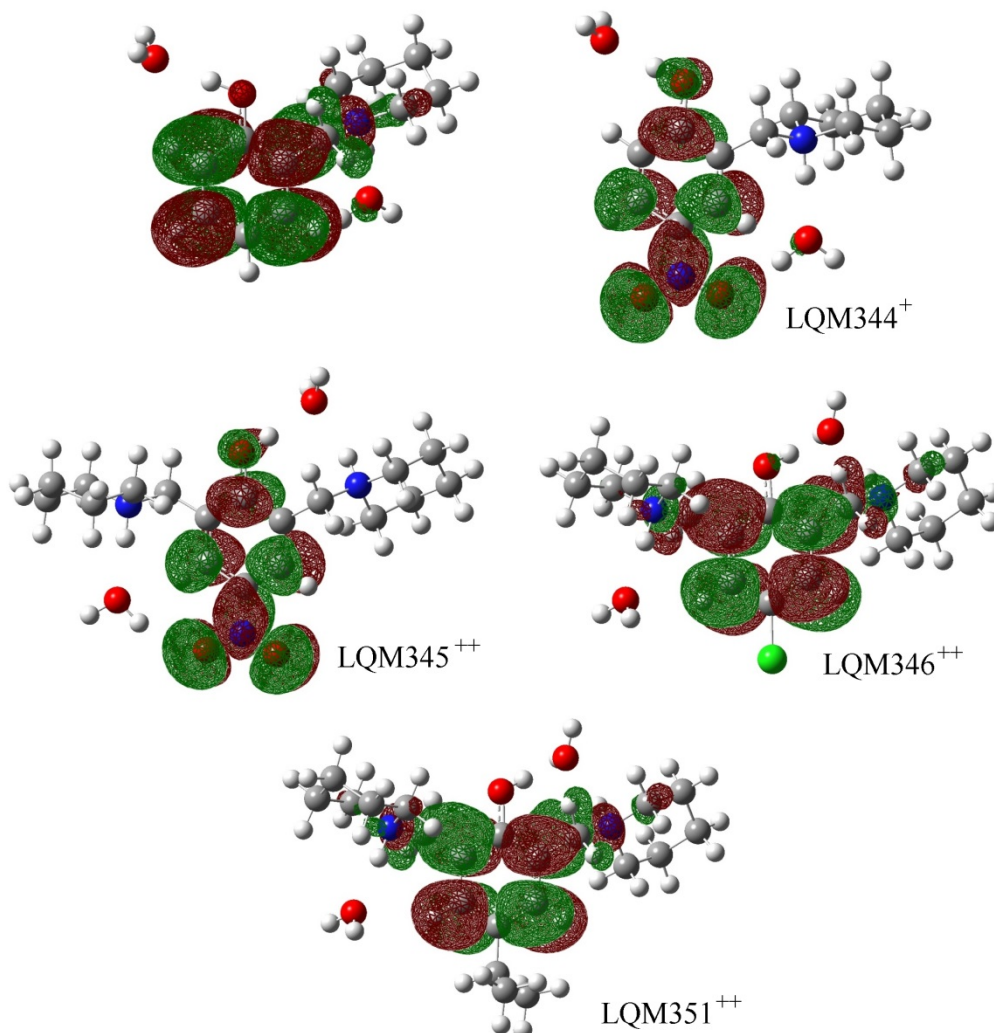


Figura 4.2.2 Superficies de densidad LUMO. Calculadas con un valor de isodensidad 0.02 au.

De acuerdo con este criterio, el sitio más ácido depende del sustituyente en la posición *para* en el grupo fenol. Para las especies con sustituyente nitro, el OH fenólico muestra mayor contribución a la densidad LUMO que los sitios amino, es decir, el H fenólico se espera que sea el más ácido y esté relacionado con el primer valor de pKa. Para todos los otros sustituyentes, los grupos amino contribuyen a las densidades LUMO en mayor proporción que el OH fenólico, es decir, se espera que los sitios más ácidos sean aquellos en los grupos piperidínicos. Sin embargo, para las especies con dos grupos piperidínicos (H_3LL^{2+}), este criterio no es suficiente para establecer cuál de los grupos amino tiene el carácter ácido más alto. Las energías libres Gibbs para todas las posibles reacciones de desprotonación se han calculado a 298.15 K.

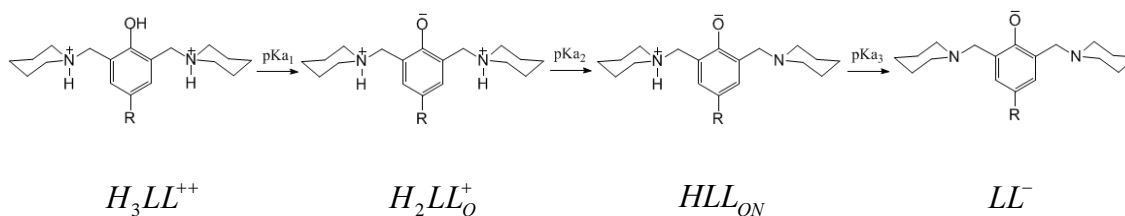
La tabla 4.2.2 muestra los valores correspondientes de $\Delta G_{desprotonación}^0$ para las diferentes vías de exposición considerados para la primera desprotonación.

Tabla 4.2.2 Energías libres de Gibbs de reacción (kcal/mol) para la primera desprotonación por todas las vías posibles presentadas a 298.15K

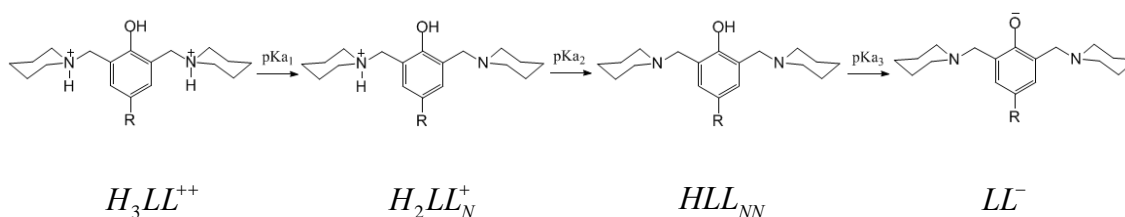
Sistema	Sitios ácidos		
	OH	NH(C1)	NH(C2)
<i>Mono-piperidina</i>			
H_2L^+ , R=NO ₂	7.88	-	8.71
<i>Di-piperidina</i>			
H_3LL^{++} , R=NO ₂	1.88	6.88	7.71
H_3LL^{++} , R=Cl	8.61	7.84	11.60
H_3LL^{++} , R= <i>i</i> -C ₃ H ₇	12.41	12.21	12.75

Estos valores de energía están de acuerdo con las predicciones basadas en la distribución de la densidad LUMO. Para las especies con grupos nitro en los sitios *para* en los grupos fenoles, el proceso más viable es la que implica el OH del grupo fenol, es decir, el primer pKa debe estar asociado con la acidez de este sitio. Para los otros sustituyentes, las desprotonaciones de grupos amino conducen a procesos más favorables, es decir, menos endergónicos. Para los compuestos di-piperidínicos, se encontró que la conformación influye en la acidez del grupo amino. Se encontró sistemáticamente que la conformación C1 favorece el proceso de desprotonación, probablemente debido a la proximidad con el grupo hidroxilo. En consecuencia para los caminos IIB y IIC (Esquema 2), la primera constante de acidez implica la desprotonación de los sitios amino en las configuraciones de C1.

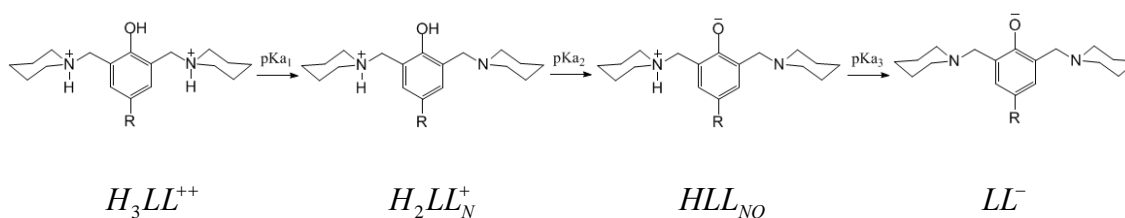
Camino IIA:



Camino IIB:



Camino IIC:

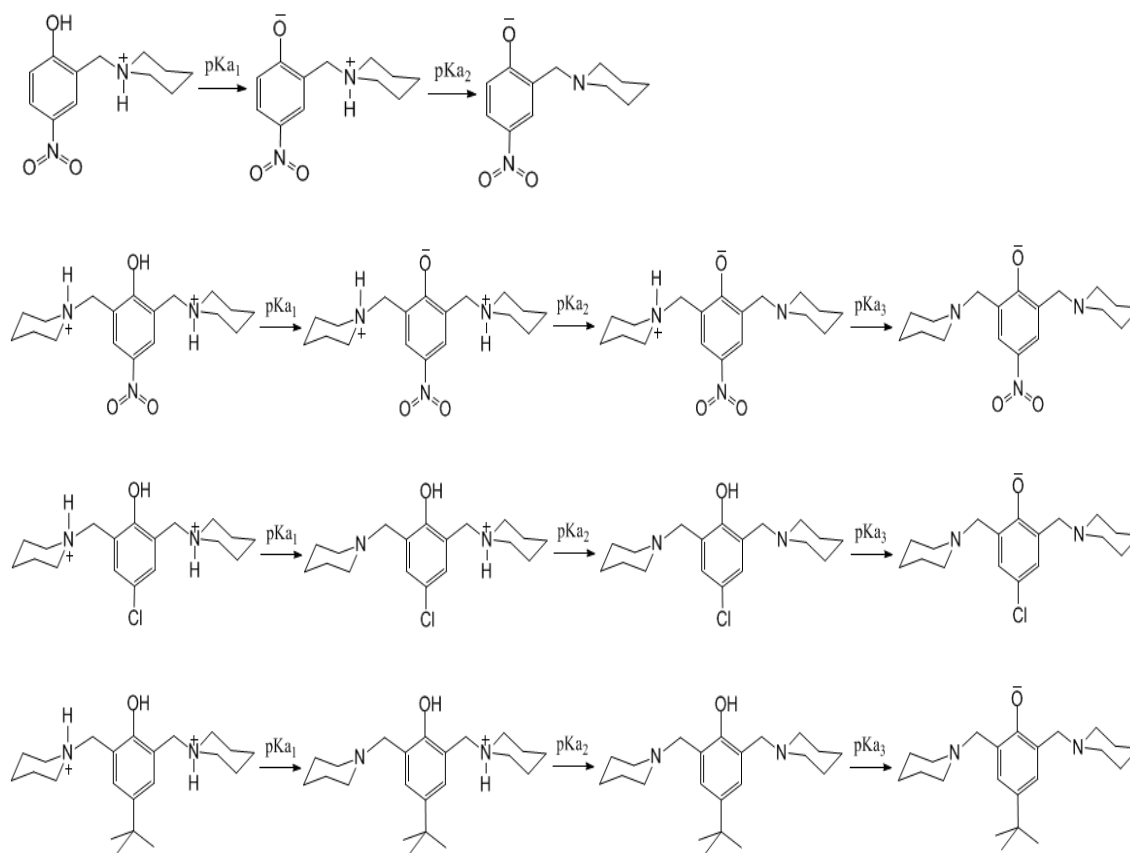
Esquema 2 (R= Cl, *i*-C₃H₇, NO₂)

Una vez que el camino más viable para la primera desprotonación se ha identificado para los sistemas de H_2L^+ , ahora las rutas desprotonación están completamente especificadas, ya que sólo se consideran dos procesos de desprotonación. En consecuencia la ruta IA se propone como la más viable cuando R = NO₂.

Por otra parte para los sistemas H_3LL^{2+} , dos diferentes vías son posibles para el segundo proceso de desprotonación ($H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$). Para H_2L^+ con R = NO₂, las alternativas implican N(C1) y N(C2), mientras que para H_2L^+ con R=Cl, *i*-C₃H₇, la segunda desprotonación puede implicar el NH o el sitio OH. En el primer caso, se encontró que la segunda desprotonación del sitio de N(C2) es energéticamente más favorable. Para H_2LL^+ con R= Cl, *i*-C₃H₇, se encontró que la segunda desprotonación será a partir del nitrógeno

protonado. De hecho, cualquier intento de obtener la geometría correspondiente a desprotonaciones del sitio fenólico para formar H_2LL_{NO} siempre evolucionó hacia H_2LL_{NN} .

De acuerdo con la evolución de la energía libre de Gibbs asociada a las diferentes vías desprotonación modeladas en el presente trabajo, los caminos más viables se representan en el Esquema 4.



Esquema 4

Los valores de pKa calculados de acuerdo con el Esquema 4 se muestran en la tabla 4.2.3

Tabla 4.2.3 pKa calculados de acuerdo con las vías en el Esquema 4

	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
H_2L^+ , R=NO ₂	5.78	9.91	-
H_3LL^{++} , R=NO ₂	1.38	9.00	11.34
H_3LL^{++} , R=Cl	5.75	10.10	17.18
H_3LL^{++} , R= <i>i</i> -C ₃ H ₇	8.49	10.35	18.14

Los cálculos teóricos reproducen las tendencias experimentales, que también están de acuerdo con la intuición química. Por ejemplo, la presencia del grupo nitro en el sitio *para* del fenol, aumenta significativamente la acidez del protón fenólico, lo que se explica por el carácter electrón-atractor de este sustituyente. Por otra parte, todo el conjunto de valores de pKa disminuye cuando este sustituyente está presente, lo que sugiere que también influye en la acidez de los protones en los átomos de N de los grupos piperidínicos, a pesar de la presencia de un grupo metileno entre piperidinas y el grupo fenólico. Además, el tercer pKa que no se observó experimentalmente para los compuestos LQM346 y LQM351, se prevé que sea mayor de 12, es decir, fuera del intervalo de trabajo.

Analizando las desprotonaciones del Esquema 4, se propone que las especies neutras del LQM344 y LQM345 son especies zwitteriónicas, mientras que las especies LQM346 y LQM351 son especies neutras moleculares. Quizás esta característica está relacionada con la baja solubilidad de estos últimos y con el último valor de pKa3 a pH mayores que 12, como se observa en la figura 2.4.6 y 2.4.7

El carácter no zwitteriónico o molecular de las especies neutras de LQM346 y LQM351 podría permitir proponer alguna predisposición para que éstas se adsorban en el capilar de sílice fundida, y que podría explicar las dificultades experimentales para obtener una buena señal electroforética en medio básico. Además, este carácter diferente puede desempeñar un papel significativo en la eficiencia de las moléculas estudiadas para el

cruce de la membrana lipídica. Esta información también debe ser tenida en cuenta en su aplicación farmacológica.

Las desviaciones de los valores de pKa calculados a partir de los obtenidos mediante técnicas de espectrofotometría y CZE se presentan en la tabla 4.2.4, en términos de los errores con signo promedio (MSE), de los errores sin signo promedio (MUE), y los errores de raíz cuadrada media (RMSE).

Tabla 4.2.4 Errores con signo promedio (MSE), errores sin signo promedio MUE) y los errores de raíz cuadrada media (RMSE) para los valores de pKa calculados con respecto a a los estimados con las técnicas Espectrofotometría y CZE.

	Espectrofotometría	CZE
MSE	0.171	0.338
MUE	0.661	0.907
RMSE	0.968	1.155

Dado que la exactitud química teórica se acepta generalmente en alrededor de 1 kcal / mol, para los niveles más altos de la teoría y esto implica un error de alrededor de 0,8 unidades de pKa, a 298 K, se puede afirmar que los presentes cálculos, reproducen con precisión la valores experimentales. Este acuerdo valida la metodología utilizada, así como las predicciones teóricas, y apoya la elucidación de las rutas de desprotonación propuestas anteriormente.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS LQM's.

5.1 Descripción del método DPPH

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad o capacidad antioxidante. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical: la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración.

Diversos compuestos cromógenos (ABTS⁺, DPPH) son utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos y polifenólicos, operando así en contra de los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno[60].

El término de actividad antioxidante es ampliamente utilizado como un parámetro (junto con otros) para caracterizar diferentes materiales vegetales (frutas, verduras, vinos, tés, aceites, etc.) Esta actividad está relacionada con compuestos capaz de proteger un sistema biológico contra los efectos potencialmente nocivos de los procesos o reacciones que causa la oxidación excesiva, con la participación especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

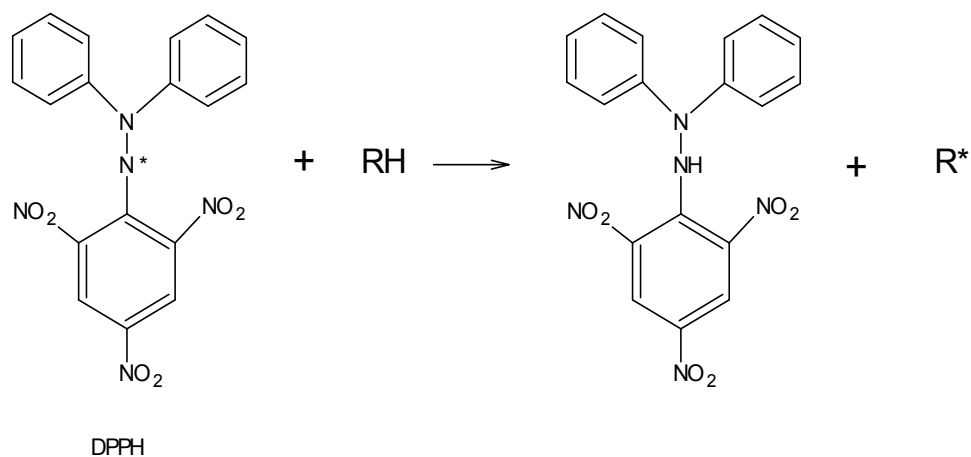
La presencia de un antioxidante conduce a la desaparición de estos radicales libres cromógenos, los dos más utilizados son los radicales ABTS⁺ y el DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, pero también muestran algunas diferencias importantes en su respuesta a los antioxidantes y en su manipulación.

El DPPH es un radical libre que se adquiere directamente sin preparación, mientras que el radical ABTS⁺ debe ser generado por una enzima (peroxidasa, mioglobina) o a través de métodos químicos (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP).

El radical ABTS⁺ puede ser solubilizado en una solución acuosa y en medios orgánicos, mientras que el DPPH solamente se puede disolver en medio orgánico.

El método DPPH que determina la capacidad antioxidante, este radical, el cual es un radical libre muy estable, presenta una coloración violeta, ya que el electrón impar en el radical libre DPPH tiene una fuerte absorción en un máximo de absorción en 514 nm. El color regresa de morado a amarillo cuando la solución de DPPH se mezcla con una

sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces aparece la forma reducida DPPH-H el cual provoca el cambio de color.



El método de DPPH puede usarse para sólidos o muestras líquidas y no es específica para ningún antioxidante en particular. En este método se mide el cambio en la absorbancia del DPPH (reacción con el antioxidante) con respecto al tiempo.

Parte experimental

A continuación se describe la metodología empleada en los experimentos para determinar la capacidad antioxidante como equivalentes de trolox (TEAC por sus siglas en inglés).

A las soluciones obtenidas se les determinó su espectro de absorción con un espectrofotómetro Perkin-Elmer lamdba 950, utilizando celdas de cuarzo de una longitud de paso óptico igual a 1 cm.

Reactivos

Se utilizó el compuesto 2, 2,-difeníl picril hidracil (DPPH) ($394.32 \text{ g mol}^{-1}$), Ácido (S)-(-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico o trolox 97% ($250.32 \text{ g mol}^{-1}$) Sigma-Aldrich, Etanol JT Baker.

Se preparó la siguiente solución del radical libre DPPH $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en etanol, tres soluciones del antioxidante de referencia trolox 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 10^{-5} M en etanol. También se preparó una solución del compuesto trolox a una concentración de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Los compuestos piperidínicos, morfolínicos y tiomorfolínicos se disolvieron en etanol. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de su uso.

5.3 Curva de calibración con el antioxidante de referencia trolox

En seguida se describe el procedimiento empleado en la preparación de soluciones para realizar la curva de calibración con el antioxidante de referencia trolox y el radical libre DPPH.

Se muestra en la tabla 5.3.1 la descripción detallada de cada solución preparada de trolox en la curva de calibración. Se puede observar que siempre se mantiene fija la concentración del radical libre DPPH.

Tabla 5.3.1 Soluciones empleadas en la curva de calibración para el antioxidante de referencia trolox.

Solución	[trolox] _{final} (μM)	$V_{\text{DPPH}} 10^{-3}\text{M}$ (μL)	V_{etanol} (μL)	$V_{\text{Trolox}} 10^{-4}\text{M}$ (μL)	$\lambda = 514\text{nm}$, $t = 2\text{min}$
1	0	200	1800	0	
2	10	200	1600	200	
3	20	200	1400	400	
4	40	200	1000	800	
5	50	200	800	1000	

$[\text{Trolox}]_{\text{final}}$ es la concentración del trolox en la muestra.

V_{DPPH} es el volumen empleado del DPPH en la celda.

V_{etanol} es el volumen de etanol empleado en la celda

V_{trolox} es el volumen de trolox empleado en la celda.

Se hace reaccionar el DPPH frente al trolox, se mide la absorbancia del DPPH dos minutos después de que se ha inyectado el antioxidante de referencia trolox en la solución del DPPH, la absorbancia se mide a una longitud de onda de 514 nm en todos los experimentos, cada experimento se repite por triplicado.

5.4 Método empleado en la determinación del TEAC con los compuestos LQM's.

En estos experimentos se utiliza la misma curva de calibración de trolox, sólo que en lugar de agregar éste, se agregan diferentes volúmenes de LQM's.

En la tabla 5.4.1 se muestra la descripción detallada de cada solución preparada con el LQM en la curva de calibración. Se puede observar nuevamente que siempre se mantiene fija la concentración del radical libre DPPH

Tabla 5.4.1 Soluciones empleadas en la curva de TEAC para cada LQM

Solución	$[\text{LQM}]_{\text{final}}$ (μM)	V_{DPPH} 10^{-3}M (μL)	V_{etanol} (μL)	V_{LQM} 10^{-x}M (μL)	$\lambda = 514\text{nm}$, $t = 2\text{min}$
1		200	1800		
2		200	1600		
3		200	1400		
4		200	1000		
5		200	800		

5.5 Procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante.

A continuación se describen las ecuaciones para determinar el TEAC.

A partir de la curva de calibración realizada con el antioxidante de referencia trolox se obtiene la siguiente ecuación lineal:

$$\text{Abs}^{t=2\text{min}} = m * [\text{trolox}]_{\text{final}} + b \quad \text{Ecuación 5.5.1}$$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen, cuando $[\text{Trolox}]_{\text{final}} = 0$, la absorbancia es igual a b , en este caso es la absorbancia del radical libre DPPH.

Posteriormente se adiciona el compuesto LQM con el radical libre DPPH y se toma el valor de la absorbancia a los dos minutos, esto se realiza para diferentes soluciones manteniendo fija la concentración del radical libre DPPH y variando la concentración del compuesto LQM y el volumen del etanol.

Una vez obtenida la absorbancia se puede determinar la concentración de trolox equivalente a partir de la ecuación 5.5.2

$$[\text{trolox}]_{\text{equivalentes}} = \frac{\text{Absorbancia del LQM}^{t=2 \text{ minutos}} - b}{m} \quad \text{Ecuación 5.5.2}$$

Una vez obtenidas las concentraciones de trolox equivalentes, se procede a calcular los moles de trolox equivalentes presentes en la celda.

$$\text{Moles de trolox}_{\text{equivalentes}} = [\text{Volumen total de la celda}] \text{trolox}_{\text{equivalentes}} \quad \text{Ecuación 5.5.3}$$

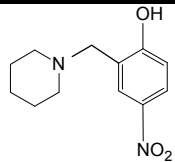
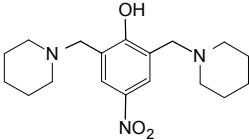
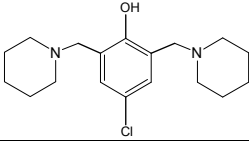
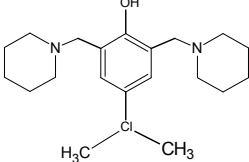
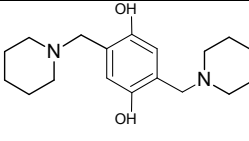
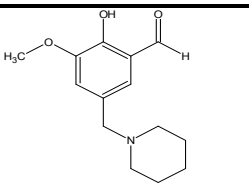
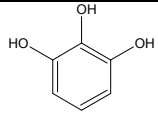
Una vez obtenidos los moles de trolox equivalentes se divide por los moles de antioxidante presentes en la celda para obtener el índice TEAC ver ecuación 5.4.4

$$\text{TEAC} = \frac{\text{moles de trolox}_{\text{equivalentes}} \text{ en la celda}}{\text{moles de antioxidante (LQM)}} \quad \text{Ecuación 5.4.4}$$

5.6 Determinación de la capacidad antioxidante.

A continuación se muestra en la tabla 5.6.1 el índice TEAC para los compuestos piperidínicos y para algunos compuestos antioxidantes como lo son el pirogalol, catecol, hidroquinona y resorcinol, se calcularon los TEAC de estos últimos antioxidantes con el único fin de compararlos con nuestros LQM's.

Tabla 5.6.1 Capacidad antioxidante de los compuestos piperidínicos.

LQM's	TEAC (Mol de trolox / Mol de antioxidante)	Estructura
LQM344	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
LQM345	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
LQM346	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
LQM351	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
LQM335	0.260 ± 0.037	
LQM336	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
Pirogalol	3.24 ± 0.066	

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH se muestran en la tabla 5.6.1 se han expresado en equivalentes de trolox (TEAC), para los distintos distintos compuestos piperidínicos.

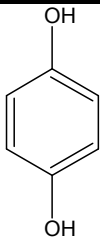
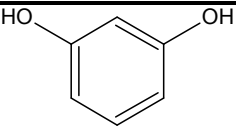
La mejor respuesta obtenida fue para el compuesto LQM335 lo cual se esperaba ya que esta molécula presenta dos grupos OH en su estructura, se mencionó con anterioridad que en la literatura se menciona que moléculas que contengan más de un grupo –OH en su estructura tienden en la mayoría de los casos a presentar un mayor índice TEAC debido a que estos grupos pueden donar su hidrógeno para reaccionar con el radical libre DPPH.

Los LQM's LQM344, LQM345, LQM346, LQM351 no mostraron actividad antioxidante, el grupo piperidínico presente en las estructuras no tiene influencia en la capacidad antioxidante. A continuación se muestra en la tabla 5.6.2 el índice TEAC para los compuestos LQM's morfolínicos y tiomorfolínicos.

Tabla 5.6.2 Capacidad antioxidante de los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos

LQM's	TEAC (Mol de trolox / Mol de antioxidante)	Estructura
LQM322	1.66±0.05	
LQM310	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
LQM329	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
Pirogalol	3.24 ± 0.06	
Catecol	1.03±0.13	

Continuación de la tabla 5.6.2. Capacidad antioxidante de los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos

Hidroquinona	0.40 ± 0.02	
Resorcinol	SIN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	

A partir de la tabla 5.6.2 podemos observar que el pirogalol presenta aproximadamente el triple de la actividad antioxidante de trolox, el LQM322 presenta el doble de la actividad antioxidante y el LQM310 presenta aproximadamente una décima parte del trolox.

La actividad antioxidante principalmente se debe a los grupos OH como se mencionó anteriormente. Si se observan las moléculas y se observa la tabla 5.6.4 las mayores capacidades antioxidantes fueron para los compuestos catecol, LQM322 y el pirogalol principalmente.

La mejor respuesta obtenida fue para el compuesto pirogalol lo cual se esperaba ya que esta molécula presenta tres grupos OH en su estructura al igual que el compuesto LQM322. Sin embargo al comparar los TEAC del LQM322 y el pirogalol, se observa una disminución en el TEAC, los dos anillos tiomorfolínicos presentes en el LQM322 disminuyen la actividad antioxidante.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se realizaron las pruebas de estabilidad de los compuestos LQM's para obtener los intervalos de tiempo de trabajo, además de que se obtuvieron las concentraciones óptimas de trabajo con el fin de tener buenas lecturas de absorbancia.

Los valores de pKa de los LQM's fueron obtenidos con las técnicas Espectrofotometría UV-Vis y CZE, ambas técnicas muestran una buena correlación entre los valores de pKa.

Se obtuvieron los mecanismos de desprotonación a partir del estudio teórico realizado para la familia de LQM's piperidínicos. A partir de estos, también se puede proponer el efecto en la naturaleza del sustituyente en la posición *para* del grupo fenol.

La presencia del grupo nitro en el sitio *para* del fenol, aumenta significativamente la acidez del protón fenólico, que se explica por el carácter electrón-aceptor de este sustituyente. Todo el conjunto de valores de pKa disminuye cuando este sustituyente está presente, lo que sugiere que también influye en la acidez de los protones en los átomos de N de los grupos piperidínicos, a pesar de la presencia de un grupo metileno entre piperidinas y el anillo fenólico.

El tercer pKa que no se observó experimentalmente para los compuestos LQM346 y LQM351, se prevé que sea mayor de 12, es decir, fuera del intervalo de trabajo.

Las especies neutras del LQM344 y LQM345 son zwitteriónicos, mientras que las especies LQM346 y LQM351 son especies neutras moleculares. Además, este carácter diferente puede desempeñar un papel significativo en la eficiencia de las moléculas estudiadas para el cruce de la membrana lipídica.

Se realizaron las pruebas para determinar la capacidad antioxidante para todos los LQM's piperidínicos utilizando el radical libre DPPH, éstos no presentaron actividad antioxidante a excepción del LQM335, para este LQM se esperaba esta actividad ya que la molécula presenta dos grupos OH en su estructura, se concluye que los sustituyentes piperidínicos no tienen una contribución en la capacidad antioxidante. Lo mismo sucede para los compuestos LQM323, LQM310 y LQM329, los anillos morfólinicos y tiomorfólinicos disminuyen capacidad antioxidante del compuesto base.

La mejor respuesta obtenida fue para el LQM322, lo cual se esperaba, ya que esta molécula presenta tres grupos OH en su estructura. Sin embargo al comparar los TEAC del LQM322 y el pirogalo, se observó una disminución en la capacidad antioxidante, los dos anillos tiomorfolínicos presentes en el LQM322 disminuyen la actividad antioxidante debido a que estos son grupos donadores de electrones.

PERSPECTIVAS

- Mediante el uso de cálculos teóricos determinar el orden de desprotonación de los compuestos morfolínicos, tiomorfolínicos y los dos restantes LQM335 y LQM336.
- Determinar la constante de reparto de los LQM's en sistemas octanol/agua a diferentes valores de pH ya que en farmacología este parámetro es muy útil debido a que se utiliza para determinar su afinidad a la fase lipídica (membrana celular) con respecto a la fase acuosa.
- Realizar una corrección de temperaturas en los valores de las constantes de acidez de los LQM344, LQM345, LQM346 y LQM351.
- Determinar la capacidad antioxidante de todos los LQM's con el radical libre ABTS⁺.
- Interacción con algunos iones metálicos de interés biológico como son hierro, zinc y cobre (formación de complejos).

REFERENCIAS

- ¹ Fields LE, Burt VL, Cutler JA, Hughes J, Roccella EJ, Sorlie P. *Hypertension*, **2004**, 44, 398-404.
- ² Stevens G, Dias RH, Thomas KJA, Rivera JA, Carvalho N, Barquera S, Hill K, Ezzati M. *Plos Medicine*. **2008**. e125.
- ³ Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH. *The New England Journal of Medicine*, **2001**, 344, 3-10.
- ⁴ Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. *Hypertension*, **2003**, 1206-1252.
- ⁵ Alexander P, Bahret MJ, Chaves J, Courts G, D'Alessio NS. *Biología. La circulación*. Editorial Prentice Hall. New Jersey, **1992**, 534-540.
- ⁶ Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension*, **2003**, 21, 1011-53.
- ⁷ Halliwell B. Free radicals and antioxidants: - quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, **2011**, 32, 125-130.
- ⁸ Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, Halliwell B. *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, 48, 560-566.
- ⁹ Pun PB, Gruber J, Tang SY, Schaffer S, Ong RL, Fong S, Ng LF, Cheah I, Halliwell B. *Biogerontology*, **2010**, 11, 17-30.

-
- ¹⁰Shahidi F, Janitha P K and Wanasundara PD, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1992**, 32, 67-103.
- ¹¹Halliwel B, *Anuual review of nutrition*, **1996**, 13, 30-50.
- ¹²Halliwel B. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **1989**, 82, 747-752.
- ¹³Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. *The Analyst*, **2001**, 127, 183-198.
- ¹⁴Prakash, A. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, **2001**, 19, 1-4.
- ¹⁵Kuskoky EM, Asuero AG. García-Parilla MC, *Ciencia y Tecnología de alimentos*. **2004**, 24, 4, 691-693.
- ¹⁶Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. *Lebensm Wiss u Technol*, **1995**, 28, 25–30.
- ¹⁷Cuvelier ME, Richard H, Berset C. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1992**, 56, 324-325.
- ¹⁸Mcgowan JC, Powell T, Raw R. *Journal of the Chemical Society*, **1959**, 3103-3110.
- ¹⁹Hogg JS, Lohmann DH, Rosell KE. *Canadian Journal of Chemistry*, **1961**, 39, 1588-1594.
- ²⁰G. Cuevas, F. Cortes. "Introducción a la química computacional" 1ª Edición, Fondo de cultura económica, México, **2003**, 163-167.
- ²¹Rebollar-Zepeda A.M, Galano A. *International Journal Quantum Chemistry*, **2012**, 112 (21), 3449–3460.
- ²²Stout DM, Mtier WL, Barcelon-Yang C. Reynolds RD, Brown BS. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1983**, 26, 808-813.

-
- ²³Stout DM, Mtier WL, Barcelon-Yang C, Reynolds RD y Brown BS. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1984**, 27, 1347-1350.
- ²⁴Stout DM, Mtier WL, Barcelon-Yang C, Reynolds RD y Brown BS. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1985**, 28, 295-298.
- ²⁵Codding PW, Glówka ML, Dargie RL. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1991**, 34, 2678-2684.
- ²⁶Angeles E, Velázquez Ma, Torres LA, Díaz G, Ramírez A, Hernández R, Santillán H, Martínez L, Martínez I, Díaz-Barriga S, Abrego V, Balboa MA, Camacho B, López-Castañares R, Dueñas-González A, Cabrera G. *ARKIVOC*, **2006**, 150-161.
- ²⁷Velázquez AM, Martínez L, Abrego V, Balboa MA, Torres LA, Camacho B, Díaz-Barriga S, Romero A, López-Castañares R, Angeles E. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43, 486-500.
- ²⁸Abrego VH, Martínez-Pérez B, Torres LA, Ángeles E, Martínez L, Marroquín-Pascual JL, Moya-Hernández R, Amaro-Recillas HA, Rueda-Jackson JC, Rodríguez-Barrientos D, Rojas-Hernández A. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, 4622-4630.
- ²⁹Reynoso OA. Los antioxidantes en alimentos perspectivas de aplicación. Tesis de licenciatura de la Facultad de Ciencias Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, **1998**.
- ³⁰Sanpedro K, Martínez B, Galano A, Ángeles E, Abrego E, Ramírez MT, Rojas A. *Journal of chemical and engineering data*, **2010**, 55, 4323-4331.
- ³¹Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, Rivera García, Fundamentos de Electroforesis Capilar, Universidad Nacional Autónoma de México, **2005**.
- ³²Lipinski CA, *Drug Discovery Today: Technologies*. **2004**, 1, 337-341.

-
- ³³Islas Martínez JM. Determinación de las constantes de acidez de compuestos piperidínicos de interés biológico. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, **2007**.
- ³⁴Islas-Martínez JM, Rodríguez-Barrientos D, Galano A, Angeles E, Torres LA, Olvera F, Ramírez-Silva MT, Rojas-Hernández A, *The Journal of Physical Chemistry B*, **2009**, 113, 11765–11774.
- ³⁵Wescott CC, pH Measurements, Academia Press, **1978**.
- ³⁶R.G. Bates. Determination of pH, 2nd ed., John Wiley and Sons, **1973**.
- ³⁷Determinación de los valores de pka del compuesto LQM301 bajo condiciones pseudofisiológicas. Memorias in extenso XX Congreso Nacional de Química Analítica **2006**.
- ³⁸Legget DJ. Computational Methods for Determination of Formation Constants; Plenum Press: New York, **1985**.
- ³⁹Legget DJ, McBryde WAE. *Analytical Chemistry*, **1975**, 47, 1065-1070.
- ⁴⁰Rodríguez-Barrientos D, Rojas-Hernández A, Moya-Hernández, R, Gómez-Balderas R, Ramírez-Silva MT, *Talanta*, 80, **2009**, 754–762.
- ⁴¹(a) Rojas-Hernández A, Ramírez MT, González I. *Journal of Chemical Education*, **1995**, 72, 1099-1105. (b) Moya-Hernández R, Rueda-Jackson JC, Ramírez MT, Vázquez GA, Havel J, Rojas-Hernández A, *Journal of Chemical Education*, **2002**, 79, 389-392.
- ⁴²Wingrove AS, Caret RL. Química Orgánica, espectroscopia 1- Métodos espectroscópicos: Espectroscopia del Infrarrojo y Ultravioleta. Editorial Harla, México **1984**, 559-572.
- ⁴³Linder P, Murray K. *Talanta*, **1982**, 29, 371-382.

-
- ⁴⁴Alcock R, Burgess C, Hartley F. "SOLUTION EQUILIBRIA". Ellis Horwood. Inglaterra, **1980**.
- ⁴⁵Arreola D. Determinación de los pka's de rojo de cresol en medio acuoso, utilizando los paquetes computacionales SQUAD y TRIANG. Tesis de licenciatura de la Facultad de Ciencias Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, **1999**.
- ⁴⁶Almerindo GI, Tondo DW, Pliego JR Jr, *The Journal of Physical Chemistry A*, **2004**, 108, 166-171.
- ⁴⁷Fu Y, Liu L, Li R, Liu R, Guo Q. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 814-822.
- ⁴⁸Magill AM, Cavell KJ, Yates BF. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 8717-8724.
- ⁴⁹Cramer CJ, Truhlar DG. *Chemical Reviews*, **1999**, 99, 2161-2200.
- ⁵⁰Liptak MD, Shields GC. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123, 7314-7319.
- ⁵¹Liptak MD, Gross KC, Seybold PG, Feldgus S, Shields GC. *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, 124, 6421-6427.
- ⁵²Murlowska K, Sadlej-Sosnowska N. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2005**, 109, 5590-5595.
- ⁵³Pliego JR Jr, Riveros JM. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2002**, 106, 7434-7439.
- ⁵⁴Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JAJr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene, M.; Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich

S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. *Gaussian 03*, revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, **2004**.

⁵⁵ Becke A.D. *Physical Review A*, **1988**, 38, 3098-100.

⁵⁶ Becke, A.D. *Journal of Chemical Physics*, **1993**, 98, 5648-5652.

⁵⁷ Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. *Journal of Chemical Physics*, **1994**, 98, 11623-11627.

⁵⁸ Palascak MW, Shields GC. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2004**, 108, 3692-3694.

⁵⁹ Brown TN, Mora-Diez N. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2006**, 110, 9270-9279.

⁶⁰ Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. *Ciencia y tecnología de los Alimentos*, **2005**, 25, 726- 732.

APÉNDICES

Apéndice A

Descripción del programa computacional del Programa SQUAD.

SQUAD es un programa creado por Legget escrito en lenguaje FORTRAN. Está diseñado para refinar constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto, empleando la aproximación de mínimos cuadrados no lineales, de datos de absorbancia obtenidos al variar las longitudes de onda y el pH del sistema en solución acuosa.

Para cada valor de absorbancia la ecuación A.1

$$A_{i,k} = \sum_1^J [Especies]_{i,j} \times \varepsilon_{i,k} \quad \text{Ecuación A.1}$$

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

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH y el refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los residuos entre los valores experimentales de absorbancia y los valores calculados por SQUAD ecuación A.2:

$$U = \sum_1^K \sum_1^I \left(A_{i,k}^{\text{experimental}} - A_{i,k}^{\text{calculada}} \right)^2 \quad \text{Ecuación A.2}$$

Donde

I= todas las soluciones.

K = todas las longitudes de onda.

$A_{i,k}^{\text{experimental}}$ = Absorbancia calculada por SQUAD en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

$A_{i,k}^{\text{calculada}}$ = Absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

Para conocer los valores de absorbancia SQUAD necesita resolver la ecuación de Beer y la Ley de aditividad; SQUAD propone los coeficientes de absortividad molar por especie a cada longitud de onda en caso de que no se conozcan, y determina la concentración de

cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson. La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo 0.1% para cada constante.

SQUAD calcula el número de parámetros estadísticos que pueden usarse para validar el modelo, no obstante se debe emplear la información y conocimientos químicos para corroborar un modelo. El primer parámetro es el de correlación (matriz). El segundo es la desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{Datos}), sobre las constantes ($\sigma_{\text{constantes}}$), la desviación estándar por espectro (σ_{espectro}) y la desviación estándar sobre los coeficientes de absorptividad molar (σ_{coef}).

Apéndice B

Descripción del programa computacional del Programa TRIANG.

PROGRAMA TRIANG

TRIANG es un programa computacional escrito en lenguaje FORTRAN, es utilizado para analizar datos espectrofotométricos y así determinar el número de especies que absorben radiación que se encuentran presentes en solución.

La entrada de datos del programa son los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda de una serie de soluciones a diferentes concentraciones y los errores en las lecturas de transmitancia. Los datos son analizados asumiendo que la Ley de Beer y la Ley de aditividades son válidas para cada componente.

La matriz **A** de absorbancia es reducida por series de operaciones elementales a una matriz en la cual el elemento mayor se encuentra en la diagonal y todos los elementos debajo son cero ecuación B.1

$$a'_{ij} = a_{ij} - \frac{a_{i1}}{a_{11}} a_{1j} \quad \text{Ecuación B.1}$$

Sin embargo el mayor problema radica en decidir cuál es cero. Como en un sistema real los errores aleatorios causan que los elementos sean diferentes de cero.

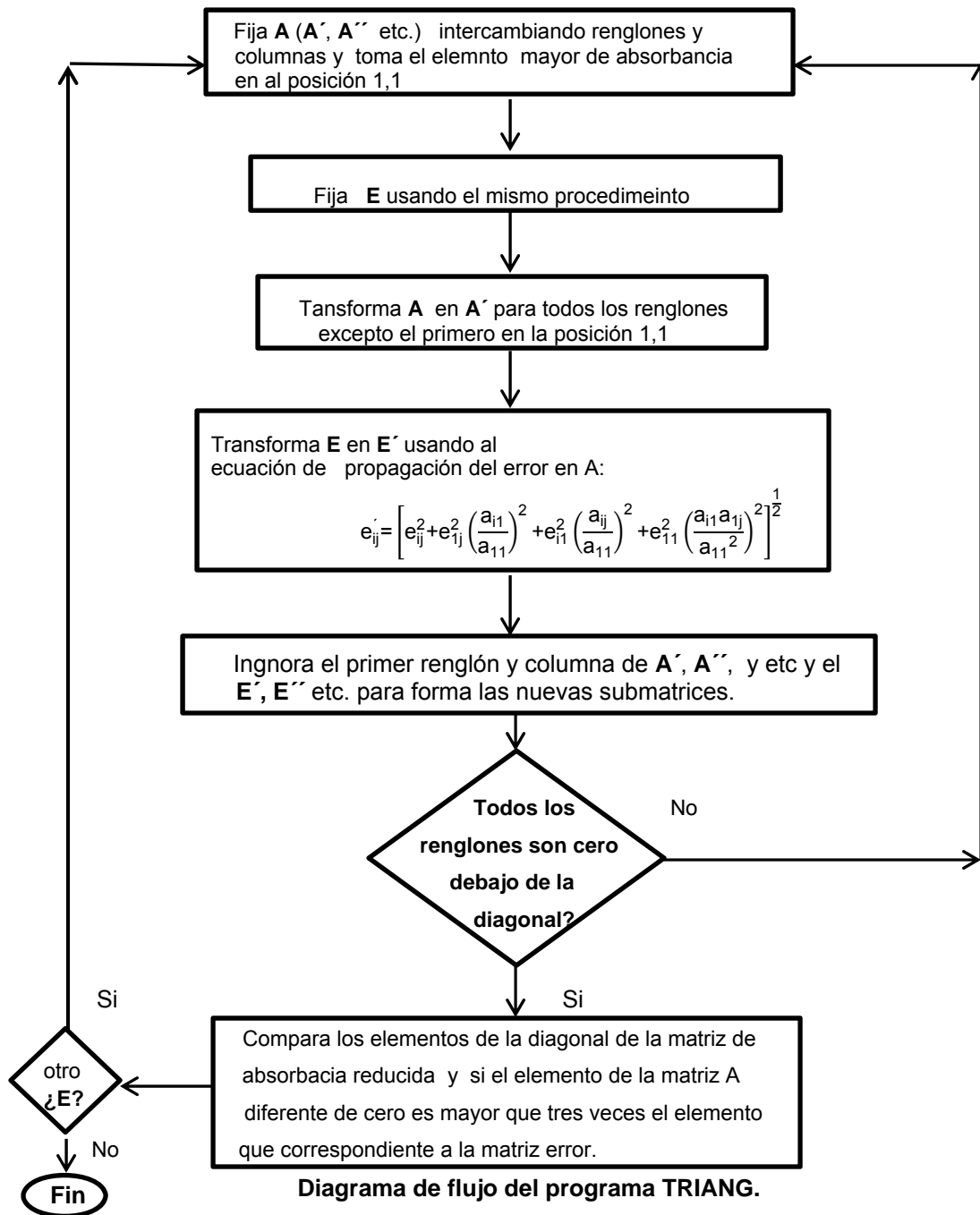
El criterio de decisión consiste en reducir una matriz **E** de error, la cual contiene el error esperado asociado a cada proceso de medición mediante el uso de la ecuación B.2 . Esta ecuación es la que se usa para la propagación de los errores en la matriz A.

$$e'_{ij} = \left[e_{ij}^2 + e_{1j}^2 \left(\frac{a_{i1}}{a_{11}} \right)^2 + e_{i1}^2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{11}} \right)^2 + e_{11}^2 \left(\frac{a_{i1} a_{1j}}{a_{11}^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación B.2}$$

El error en las lecturas de transmitancia ΔT , se define como la raíz cuadrada de la suma del error instrumental al cuadrado y el error volumétrico al cuadrado. El error instrumental es igual al error que se comete al hacer la lectura de absorbancia y es directamente proporcional al espectrofotómetro empleado. Mientras que el error volumétrico está asociado fundamentalmente al material utilizado en el experimento para la manipulación y

medición de líquidos. El criterio para determinar el número de especies absorbentes es el siguiente, si el elemento de la matriz **A** diferente de cero es mayor que tres veces el elemento que corresponde a la matriz **E**. Entonces el número de especies que absorben en el sistema se estima como la suma de los elementos de **A'** diferente de cero.

A continuación se muestra en el siguiente diagram de flujo utilizado por TRIANG.



Apéndice C

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)

Durante muchos años, las técnicas electroforéticas se realizaron en geles hidrofílicos y otros medios de soporte, pero en los últimos años, se han llevado a cabo en capilares de sílice fundida de sólo unas cuantas micras de diámetro interno. Se ha demostrado su gran utilidad en la separación de diversas sustancias, especialmente macromoléculas y su uso se ha extendido a muchas áreas de la ciencia.

A fin de seguir un orden lógico y comprensible, primero se describe en que consiste el proceso electroforético en general y posteriormente la Electroforesis Capilar y sus ventajas.

Proceso electroforético

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración (Figura C.1).

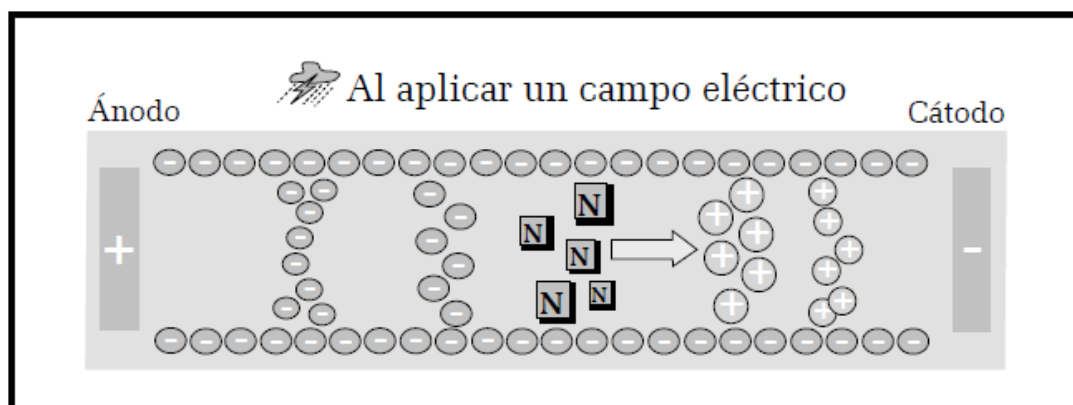


Figura C.1 Proceso de separación electroforético.

Las partes básicas de dicho sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor. La electroforesis clásica se ha utilizado tradicionalmente para analizar y purificar biopolímeros, sin embargo los métodos de separación para esta clase de compuestos son generalmente lentos y requieren de un intenso trabajo.

La electroforesis realizada en tubos capilares ha aumentado el interés en esta técnica desde el punto de vista analítico, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, ampliado increíblemente el campo de aplicación de esta técnica.

Sus principales ventajas son: alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra, separación de un sin número de compuestos, y una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva. La CZE se asemeja a las técnicas electroanalíticas de separación en las que las variables electrolíticas son decisivas en el proceso separativo, no obstante, existe una diferencia fundamental, **se minimiza la electrólisis**, ya que los electrodos están lo suficientemente separados para dicha disminución (figura C.2).

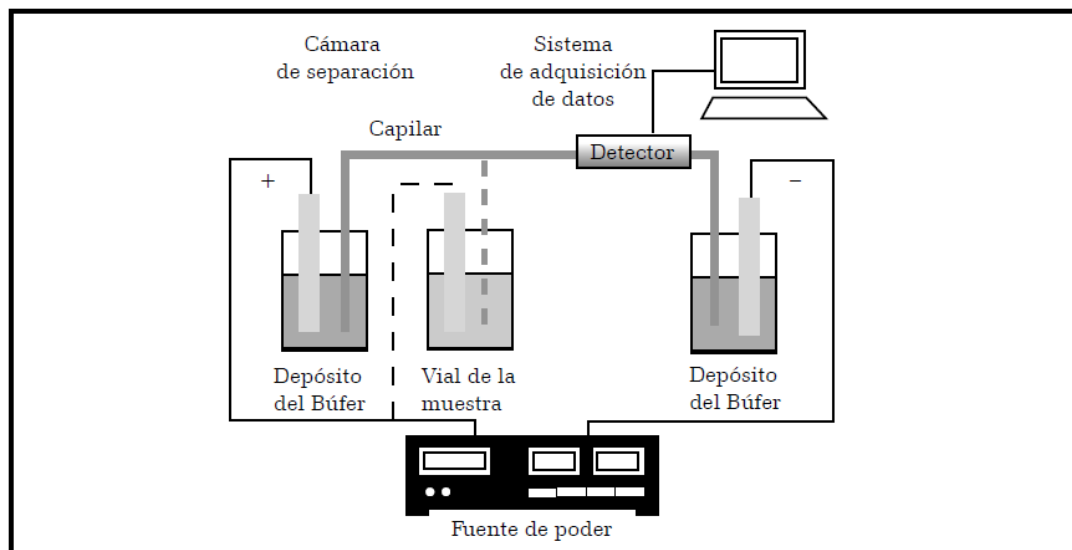


Figura C.2 Sistema general del equipo en CZE.

Es importante hacer notar que aunque superficialmente este método se parece a Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), los diferentes tipos de CZE no se basan en fundamentos cromatográficos, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos.

El mecanismo de separación en la CZE es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación masa/carga y con la conformación de los analitos. La CZE consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico.

Un sistema de CZE consiste básicamente en las siguientes partes básicas, como se muestra en la figura C.2:

- Dos electrodos (ánodo y cátodo)
- Fuente de poder
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte respectivamente
- Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación)
- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido)
- Un sistema que introduce la muestra
- Un detector

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente búfer) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La introducción de una muestra se realiza sustituyendo un depósito de búfer por el contenedor con la muestra (generalmente un vial) durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje por algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma.

La EC difiere de las técnicas clásicas de zona en dos aspectos:

1. Se realiza en capilares pequeños de un diámetro interno generalmente entre 10 y 200 μm .

2. No es necesario usar un medio anticonvectivo aunque a veces los geles sean usados como medios de tamizado de macromoléculas.

Estas características proporcionan las siguientes ventajas:

1. La disipación del calor en el tubo capilar es buena, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.
2. Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta de 30 kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.
3. El gasto en disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al ambiente, porque casi no hay generación de residuos tóxicos.
4. La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros.
5. El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
6. Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto “en línea” o “fuera de línea”, o bien varios a la vez.
7. Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
8. Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos, como espectrómetro de masas

Fundamento de la técnica

Muchas moléculas importantes en biología, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como cationes (+) o como aniones (-). Además, las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones carga/masa, debido a inherentes diferencias de peso molecular. En conjunto, estas diferencias constituyen la base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico, por la imposición de una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos.

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que

migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas. El material de la muestra debe estar en solución, puede ser en agua o en un disolvente miscible con el agua, de tal manera que sea miscible con el medio conductor (electrólito soporte) para que tenga efecto el fenómeno electroforético. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos están sumergidos en viales que contienen búfer.

La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y el tamaño del analito, así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, el pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analito y, en el caso de moléculas grandes, sobre su forma y tamaño hidrodinámico.

Movilidad electroforética

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito, cuando ningún flujo electroosmótico está presente puede ser dada por la ecuación C.1

$$v = u E \quad \text{Ecuación C.1}$$

donde:

v = la velocidad del analito

u = la movilidad electroforética

E = campo eléctrico

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

De la ecuación siguiente C.2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

$$u = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad \text{Ecuación C.2}$$

donde

u = la movilidad electroforética del analito

q = carga del analito

η = viscosidad de la solución

r = radio molecular

Flujo electroosmótico

Un constituyente fundamental de la CZE es el llamado Flujo Electroosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 4) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica.

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H^+) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico.

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas figura C.3.

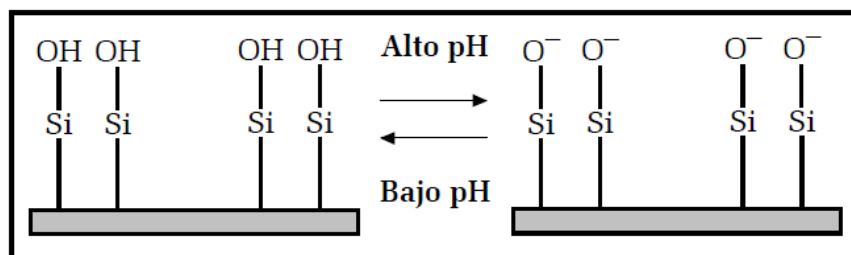


Figura C.3 Representación del equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar de sílice fundida en función al pH

Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base), de la adsorción de las especies iónicas a la superficie, o de ambas. Para la sílice fundida

probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma ionizada (SiO⁻).

Un beneficio del FEO es provocar movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo. Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo, pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo.

Así idealmente, los cationes y aniones, pueden ser separados en una sola corrida individual, ya que todos tendrán una migración neta en la misma dirección, aún los neutros. Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones. Como se muestra en la figura C.4, los cationes son impulsados por el FEO a mayor velocidad.

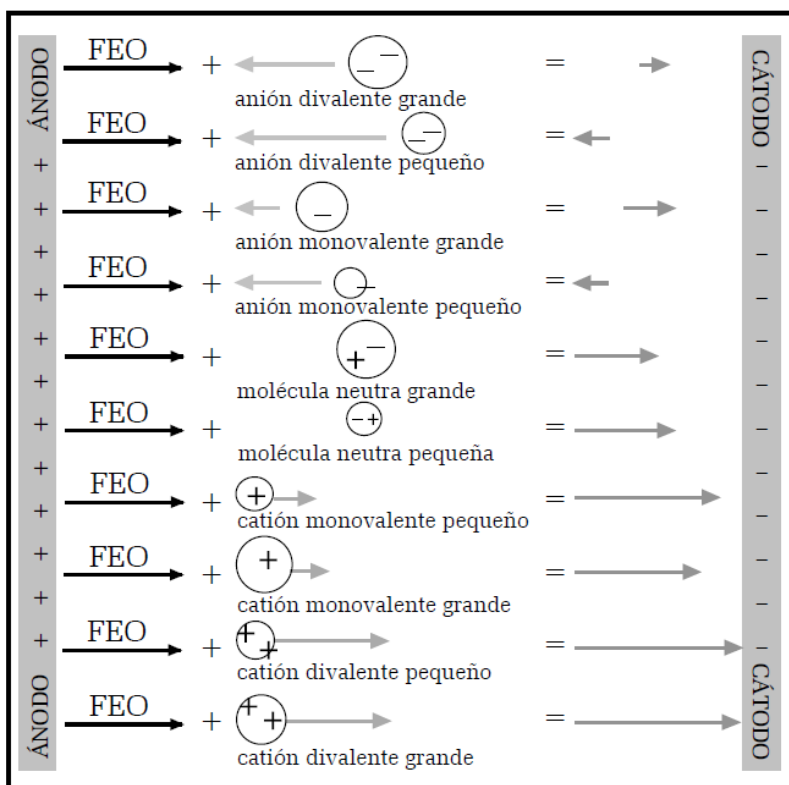


Figura C.4. Velocidad relativa del analito

Si, por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo electroosmótico, este hecho es utilizado experimentalmente para determinar la velocidad del FEO en un sistema dado.

Movilidad aparente y tiempo de migración

El tiempo requerido por un analito para migrar desde el punto de introducción de la muestra hasta el punto de detección es llamado “tiempo de migración” y está dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración. El tiempo de migración y otros parámetros experimentales pueden ser utilizados para calcular la movilidad aparente (u_a) del analito, mediante la siguiente ecuación C.3

$$u_a = \frac{1}{tE} = \frac{L}{tV} \quad \text{Ecuación C.3}$$

Dónde:

u_a = es la movilidad aparente

V = voltaje aplicado (V)

l = longitud efectiva del capilar (al detector) (m)

L = longitud total del capilar (m)

t = tiempo de migración (seg)

E = campo eléctrico (V/m)

En presencia del FEO la movilidad medida es llamada movilidad aparente, u_a . La movilidad efectiva, u_e , es la movilidad del analito independiente de las condiciones experimentales y puede ser calculada de la movilidad aparente midiendo independientemente el FEO, usando un marcador neutro que se mueve a una velocidad igual a la del FEO.

La longitud efectiva es la distancia entre el punto de introducción y el punto de detección. Para la detección espectrofotométrica sobre el capilar, esta longitud es típicamente de 5-10 cm más corta a la longitud total.

Apéndice D

Corrección de constantes de acidez utilizando dos puntos a diferente fuerza iónica.

A continuación se muestra el procedimiento utilizado en la corrección de constantes de formación a determinada fuerza iónica para uno o dos puntos.

Una ampliación de la ecuación de Debye-Hückel es la mostrada en la ecuación D.1

$$-\log \gamma_i = Az_i^2 \left[\frac{(I)^{\frac{1}{2}}}{(1 + B\alpha_i(I)^{\frac{1}{2}})} \right] + Cl \quad \text{Ecuación D.1}$$

donde I es la fuerza iónica de la solución, γ_i es el coeficiente de actividad del ion i , z es la carga del ion, A y B son constantes características del solvente ($A = 0.509$ y $B = 0.328$ para agua a $T = 25^\circ\text{C}$), α es el parámetro relacionado con el tamaño iónico de las especies.

Para la reacción de complejación entre un ion metálico y un ligando L^{z_L} se tiene el siguiente equilibrio de complejación mostrado en la ecuación D.2



La constante de equilibrio K' y K'' con fuerzas iónicas I' y I'' respectivamente, ambas constantes están relacionadas por la ecuación D.3

$$K'' = \frac{\Gamma'' K'}{\Gamma'} \quad \text{Ecuación D.3}$$

En la ecuación 3 el término Γ nos indica un cociente de coeficientes de actividad, expresado generalmente por la ecuación D.4

$$\Gamma = \frac{(Y_M)^p (Y_L)^q}{(Y_{M_pL_q})} \quad \text{Ecuación D.4}$$

donde γ es el coeficiente de actividad de cada especie indicado por subíndices.

Estos coeficientes de actividad pueden ser calculados con la ecuación D.1 siempre y cuando se cuenten con los valores de los coeficientes α y c . Cuando estos no se conocen pueden utilizar las siguientes aproximaciones:

Para iones orgánicos pequeños $\alpha = z_i + 4$

Para iones inorgánicos $\alpha = 2z_i + 4$

Se asume que los valores de c tienen el mismo valor para cada ion en el equilibrio de complejación.

Combinando las ecuaciones D.1, D.3 y D.4 obtenemos la ecuación D.6

$$\log K'' = \log K' + Af\left(\alpha_i, (I)^\frac{1}{2}\right) + c(I'' - I')(1-p-q) \quad \text{Ecuación D.6}$$

donde

$$f\left(\alpha_i, (I)^\frac{1}{2}\right) = (pz_M + qz_L)^2 \left(\frac{(I'')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_{M_p L_q}(I'')^\frac{1}{2}} - \frac{(I')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_{M_p L_q}(I')^\frac{1}{2}} \right) -$$

$$pz_M^2 \left(\frac{(I'')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_M(I'')^\frac{1}{2}} - \frac{(I')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_M(I')^\frac{1}{2}} \right) - pz_L^2 \left(\frac{(I'')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_L(I'')^\frac{1}{2}} - \frac{(I')^\frac{1}{2}}{1 + Ba_L(I')^\frac{1}{2}} \right)$$

Los valores de c pueden ser calculados utilizando la ecuación D.6 y a su vez utilizarse en la ecuación D.1 para predecir la constante de formación que se requiere a distintos valores de fuerza iónica.

PUBLICACIÓN

Deprotonation Mechanism of New Antihypertensive Piperidinylmethylphenols: A Combined Experimental and Theoretical Study

José Manuel Islas-Martínez,[†] Damaris Rodríguez-Barrientos,[†] Annia Galano,[†] Enrique Ángeles,^{*,‡} Luis A. Torres,[‡] Fabiola Olvera,[‡] María Teresa Ramírez-Silva,[†] and Alberto Rojas-Hernández^{*,†,§}

Departamento de Química, Área de Química Analítica, Universidad Autónoma Metropolitana—Iztapalapa, Ap. Postal 55-534, San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina, 09340 México, D.F. México, Departamento de Ciencias Químicas, Laboratorio de Química Medicinal, Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, Campo 1, Av. Iero de Mayo S/N. Col. Sta. María las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México, and Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, Campo 4, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Col. San Sebastián Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

Received: May 13, 2009; Revised Manuscript Received: July 8, 2009

Four new antihypertensive piperidinylmethylphenol compounds were synthesized for their potential antihypertensive and antiarrhythmic properties. The pK_a values were determined experimentally, with the aid of the program SQUAD, by capillary zone electrophoresis (CZE) at $T = 298.15$ K and 0.015 M ionic strength ($I = 0.05$ M) and by UV spectrophotometry at pseudophysiological conditions ($T = 310.15$ K and $I = 0.15$ M), obtaining good agreement between the values determined with both techniques. A theoretical study was followed in order to propose a deprotonation mechanism for each compound.

1. Introduction

Hypertension is one of the most common and dangerous health disorders that jeopardizes the quality of human life. It increases the risk of heart attacks, heart failure, strokes, kidney diseases, and other life-threatening illnesses. It is often called “the silent killer” because one-third of people with high blood pressure are unaware of having the condition.¹ In addition to genetic predisposition there are several modifiable trigger factors increasing the risk of developing hypertension: obesity, heavy alcohol consumption, smoking, and high salt intake. The imbalance of other nutrients has been implied as well, they are the following: potassium, calcium, magnesium, and saturated fats.^{2,3} The most common treatment for fighting hypertension is through antihypertensive drugs. Nowadays there are a large number of such substances available. Unfortunately, most of them have adverse secondary effects. Therefore, the development and detailed study of new potential antihypertensive substances are of current and vital interest.

In 2006 Velázquez et al.⁴ revisited the previous research by Stout et al.² and synthesized a new series of piperidin compounds. Some of them are shown in Table 1. They are intended to show antihypertensive activity and low toxicity since their physicochemical properties are similar to those of chángrolin and its derivatives.⁵ However, there are not reported data on the acid constants of these piperidin compounds. Thus, it is the main aim of the present work to estimate them for the substances shown in Table 1, under pseudophysiological conditions of

temperature and ionic strength. It is also our purpose to propose a probable deprotonation mechanism for each of the studied compounds, i.e. to establish the relative order in which the deprotonation processes take place. It provides information on the prevailing structure at each pH interval, which is very important since different structures interact in different ways with the surrounding species present in biological environments. In order to establish the more plausible deprotonation mechanisms for the LQMs studied, the deprotonation paths shown in Schemes 1 (for LQM344) and 2 (for LQM345, 346, and 351) were taken into account in this work.

2. Experimental Section

Reagents. NaOH (99%, Merck) and HCl (37%, Merck) were used to prepare acidic and basic solutions for spectrophotometric experiments and to adjust the pH of buffers in capillary zone electrophoresis (CZE). Methanol (Spectroscopic grade, Baker), NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 (99%, Fluka), Na_3PO_4 (96%, Aldrich), and H_3PO_4 (85.4%, Baker) were employed in order to prepare the buffers for CZE experiments or stock solutions of the LQMs synthesized. All aqueous solutions were prepared with deionized water (18.2 M Ω cm), purified with Millipore Milli-Q Gradient equipment.

General Synthesis Procedure. An appropriate substituted phenol (1 equiv), formaldehyde (2 equiv), and piperidine (1 or 2 equiv) (solvent free) were mixed in a round flask fitted with a condenser. The mixture was irradiated with infrared light using a medicinal infrared lamp (250 W), and the reaction was monitored by thin layer chromatography. The mixture was separated by column chromatography on silica gel using a hexane/ethyl acetate gradient solvent.

4-Nitro-2-(piperidin-1-ylmethyl)phenol (LQM344). Recrystallized from ethylacetate/hexane gradient, pale plates. mp 85–87 °C. 85% yield. IR (CHCl₃ film) cm^{-1} , 3460 (OH), 3190 (Csp²H Ar), 2885 (Csp³H). ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 10.0 (1H, s, OH), 8.13 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 2.7 Hz), 7.92 (1H, d, $\delta = 2.7$ Hz), 6.82

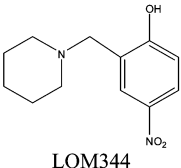
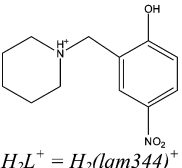
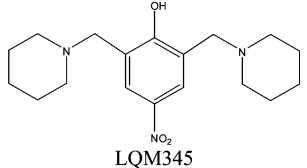
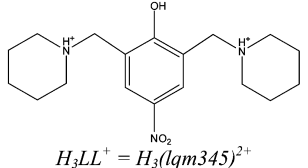
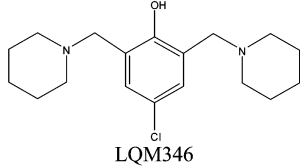
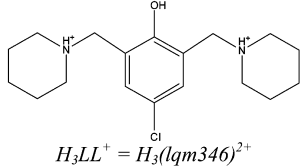
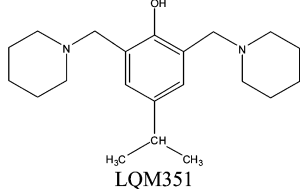
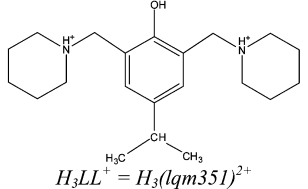
* To whom correspondence should be addressed: (E.A.) E-mail: angeles@unam.mx; Phone: (+52) 5556232066; (A.R.-H.) E-mail: suemi918@xanum.uam.mx; Phone: (+52) 5558044670; Fax: (+52) 5558044666.

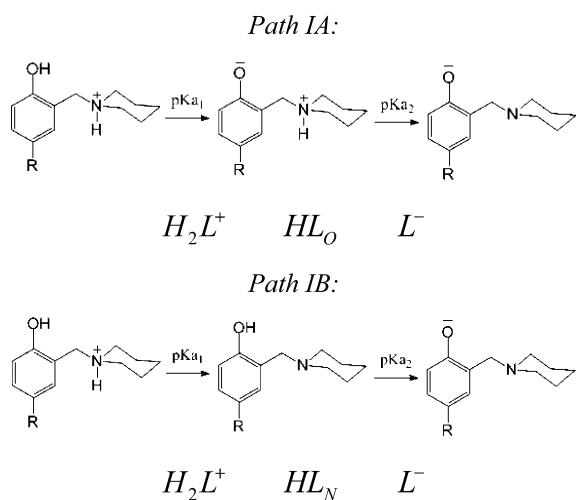
[†] Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

[‡] Departamento de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

[§] Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Universidad Nacional Autónoma de México. On leave from Departamento de Química, UAM-Iztapalapa.

TABLE 1: Piperidinylmethylphenol Ions of the Compounds Studied in This Work

Name of the synthesized compound	Formula of the synthesized compound	Fully protonated species
4-nitro-2-(piperidin-1-ylmethyl)phenol	 LQM344	 $H_2L^+ = H_2(lqm344)^+$
4-nitro-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol	 LQM345	 $H_3LL^+ = H_3(lqm345)^{2+}$
4-chloro-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol	 LQM346	 $H_3LL^+ = H_3(lqm346)^{2+}$
4-isopropyl-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol	 LQM351	 $H_3LL^+ = H_3(lqm351)^{2+}$

SCHEME 1^a^a R = NO₂.

(1H, d, *J* = 8.4 Hz), 3.82 (2H, s, Ar-CH₂), 2.08 (4H, m), 1.73 (8H, m, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃) δ ppm: 165.9 (C), 139.32 (C), 125.53 (CH), 124.88 (CH), 120.69 (C), 116.70 (CH), 61.08 (Ar-CH₂), 53.59 (CH₂), 25.18 (CH₂), 25.37 (CH₂). FAB-MS *m/z* (*M*+ 1) 237 (40%), 152 (100%, *M* - C₅H₁₀N), 138 (30%).

4-Nitro-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol (LQM345). Recrystallized from ethylacetate, yellow plates. mp 109–111 °C. 80% yield. IR (CHCl₃ film) cm⁻¹, 3450 (OH), 3150 (Csp₂H Ar), 2903 (Csp₃H). ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 8.93 (1H, s, OH), 8.07 (2H, s), 3.81 (2H, s, Ar-CH₂), 2.66 (4H, m), 1.72 (4H, m, CH₂); 1.52 (2H, m, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃) δ ppm: 164.74 (C), 138.93 (C), 125.83 (CH), 121.44 (C), 57.91 (Ar-CH₂), 53.34

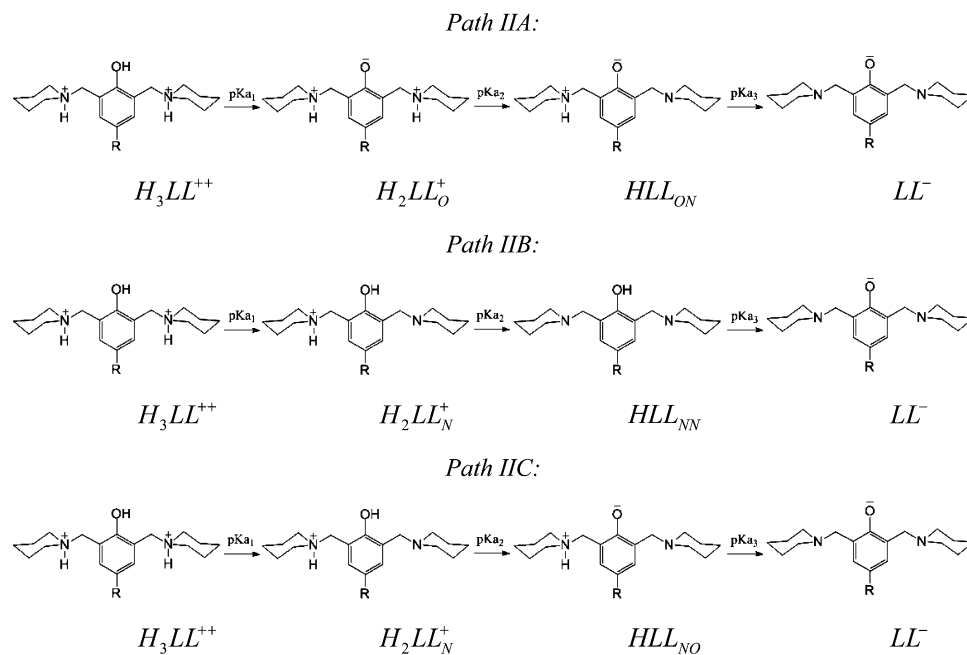
(CH₂), 24.84 (CH₂), 23.37 (CH₂). FAB-MS *m/z* (*M*+ 1) 334 (35%), 240 (100%, *M* - C₅H₁₀N), 226 (23%).

4-Chloro-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol (LQM346). Recrystallized from ethylacetate/hexane gradient, colorless plates. mp 53–55 °C. 86% yield. IR (CHCl₃ film) cm⁻¹, 3550 (OH), 3120 (Csp₂H Ar), 2965 (Csp₃H). ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 8.61 (1H, s, OH), 7.62 (2H, s), 4.35 (4H, s, Ar-CH₂), 3.46 (4H, m), 3.06 (8H, m, CH₂); 1.94 (8H, m, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃) δ ppm: 154.69 (C), 135.06 (CH), 125.64 (C), 121.35 (C), 54.80 (Ar-CH₂), 52.87 (CH₂), 22.72 (CH₂), 21.68 (CH₂). FAB-MS *m/z* (*M*+ 1) 325, 323 (24%), 231, 229 (100%, *M* - C₅H₁₀N), 217, 215 (29%).

4-Isopropyl-2,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)phenol (LQM351). Synthesized and purified as described elsewhere.⁶

CZE Study. Conditions for the Electropherogram Acquisition. CZE experiments were achieved with a Beckman P/ACE MDQ with DAD equipment. A fused silica capillary with 50 μm of internal diameter, a total length (*L_t*) of 30.2 cm, and an effective length from injection to detector (*L_d*) of 20.0 cm on the long side or 10.2 cm on the short side. The sample injection was hydrodynamic using 1.0 psi for 10 s. The temperature was imposed at 25 °C, and the voltage (*V*), at 20 kV (using reverse polarity only for pH < 3.1). Acetone was used as electroosmotic flow marker and internal standard. pH of buffers was measured with a pH/Ion Analyzer MettlerToledo potentiometer and a combined pH electrode. Calibration of potentiometer was achieved with three buffer standard solutions of 4.00, 7.00, and 10.00 (Radiometer Analytical).

Capillary Conditioning and Storing. At the beginning of the day, as usual, the capillary was washed with 0.1 M NaOH for at least 5 min at 20 psi, followed by another 5 min, 20 psi,

SCHEME 2^a

wash with deionized water, and a last 15 min, 20 psi, phosphate buffer wash (pH 7). Each run was started by a 1 min, 20 psi, wash with 0.1 M NaOH, followed by a 1 min, 20 psi, deionized water wash and, then, a 2 min, 20 psi, phosphate buffer wash of the desired pH. The capillary was stored full of deionized water.

Buffers Employed and Stock Solutions of LQMs. Buffer pH solutions, 50 mM in phosphates, were prepared by mixing adequate volumes of stock 0.50 M H₃PO₄, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, or PO₄³⁻ aqueous solutions, adjusting finally the pH of each solution with 0.1 M NaOH or HCl as required, before filling of the 25.00 mL volumetric flask to the mark. Individual solutions of LQM344, 345, 346, and 351 were prepared solving around 5 mg of each compound in the minimum amount of methanol before filling to the mark with buffer pH 6.8 the 5.00 mL volumetric flask (or the 10.00 mL volumetric flask for the case of LQM346). The sample injected was added with acetone (as needed to have a 5% acetone solution v/v).

Procedure to Obtain Effective Electrophoretic Mobility. At least three independent acquisitions of electropherograms were achieved for each pH value and compound. Effective electrophoretic mobilities (u_{eff}) were determined as the difference between the apparent (observed) mobility ($u_{\text{app}} = u_{\text{LQM}}$)—related with the reciprocal of its migration time (t_{LQM})—and the mobility of the electroosmotic flow marker (u_{eof})—related with the reciprocal of its migration time (t_{eof})—in agreement with the following equation:⁷⁻⁹

$$u_{\text{eff}} = u_{\text{app}} - u_{\text{eof}} = u_{\text{LQM}} = \frac{L_d L_d}{V} \left(\frac{1}{t_{\text{LQM}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right)$$

Spectrophotometric Study. Solutions Preparation. An acidic solution, at an adequate concentration for spectrophotometric measurements, was prepared by solving a convenient mass of the LQM desired on a volume of 0.01 M HCl with 0.14 M NaCl aqueous mixture. Also a basic solution was prepared by solving a convenient mass of the LQM desired on

a volume of 0.01 M NaOH with 0.14 M NaCl aqueous mixture. Then, for each LQM, the acidic solution was titrated with the basic solution (and vice versa), in order to maintain the ionic strength (I) equal to 0.15 M during titration. The temperature of the titration cell was maintained at 37 °C with a Cole-Parmer recirculator. The atmosphere over the solution was kept inert over passing a dry nitrogen flow.

pH Measurements. The solution's pH, with a resolution of $\Delta\text{pH} = \pm 0.001$, was measured with a Tacussel LHP 430T potentiometer equipped with a Radiometer Analytical combined pH electrode F-69627. The pH of solution was corrected by cell efficiency^{10,11} with the following equation:^{12,13}

$$\text{pH}_{\text{corrected}} = \text{pH}_{\text{observed}} + \left[\frac{\text{pH}_{\text{calibration}} - \text{pH}_{\text{observed}}}{\text{pH}_{\text{calibration}}} \right] \text{Ef}$$

Ef is an empirical parameter related to potentiometric cell efficiency that tends to zero while cell efficiency tends to 100%. The results obtained with this equation are practically the same that the methods proposed by Wescott¹⁰ or Bates.¹¹

Conditions for the Absorption Spectra Acquisition. Absorption spectrum for each solution was achieved with a Perkin-Elmer Lambda 950 spectrophotometer, using quartz cells of 1 cm path length and a temperature of 37 °C.

Determination of Equilibrium Constants. The SQUAD program was used in order to obtain the formation constants by fitting UV absorption spectra¹⁴ or effective electrophoretic mobilities¹² with the pH and chemical composition of the solutions.

Computational Details. All the electronic calculations were performed with the Gaussian 03¹⁵ package of programs. For all the modeled species, full geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the B3LYP hybrid HF-density functional¹⁶⁻¹⁸ and the 6-31+G(d,p) basis set. The energies were improved by single point calculations, at these geometries, using the same functional

TABLE 2: Deviation of the Calculated pK_a Values from the Experimental Values for the LQM344 System

	spectrophotometry		electrophoresis		RMSE	MUE
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}		
exp (pK_a)	5.559	10.185	5.55	11.0		
A0 (pK_a^{calc} - pK_a^{exp})	0.68	1.69	0.69	0.87	1.066	0.981
A1 (pK_a^{calc} - pK_a^{exp})	0.98	0.68	0.99	-0.14	0.776	0.695
A2 (pK_a^{calc} - pK_a^{exp})	0.22	-0.28	0.23	-1.09	0.586	0.454

and the 6-311++G(d,p) basis set. Thermodynamic corrections at 298 K were included in the calculation of the relative energies.

Conformational analyses were conducted with geometries optimized in aqueous solution, using polarizable continuum model (PCM), specifically the integral-equation-formalism (IEF-PCM)¹⁹ with water as solvent ($\epsilon = 78.39$). In PCM calculations, the choice of the solute cavity is important because the computed energies and properties strongly depend on the cavity size. For all modeled paths, atomic radii from the united atom topological model (RADII = UAHF) has been used.

For pK_a calculations, different approaches were tested for the smallest system (LQM344). The first approach (A0) was to perform all the calculations within the PCM scheme. In the second approach (A1) geometry optimizations and frequency calculations were carried out in gas phase (vacuum) with one explicit water molecule in the vicinity of the

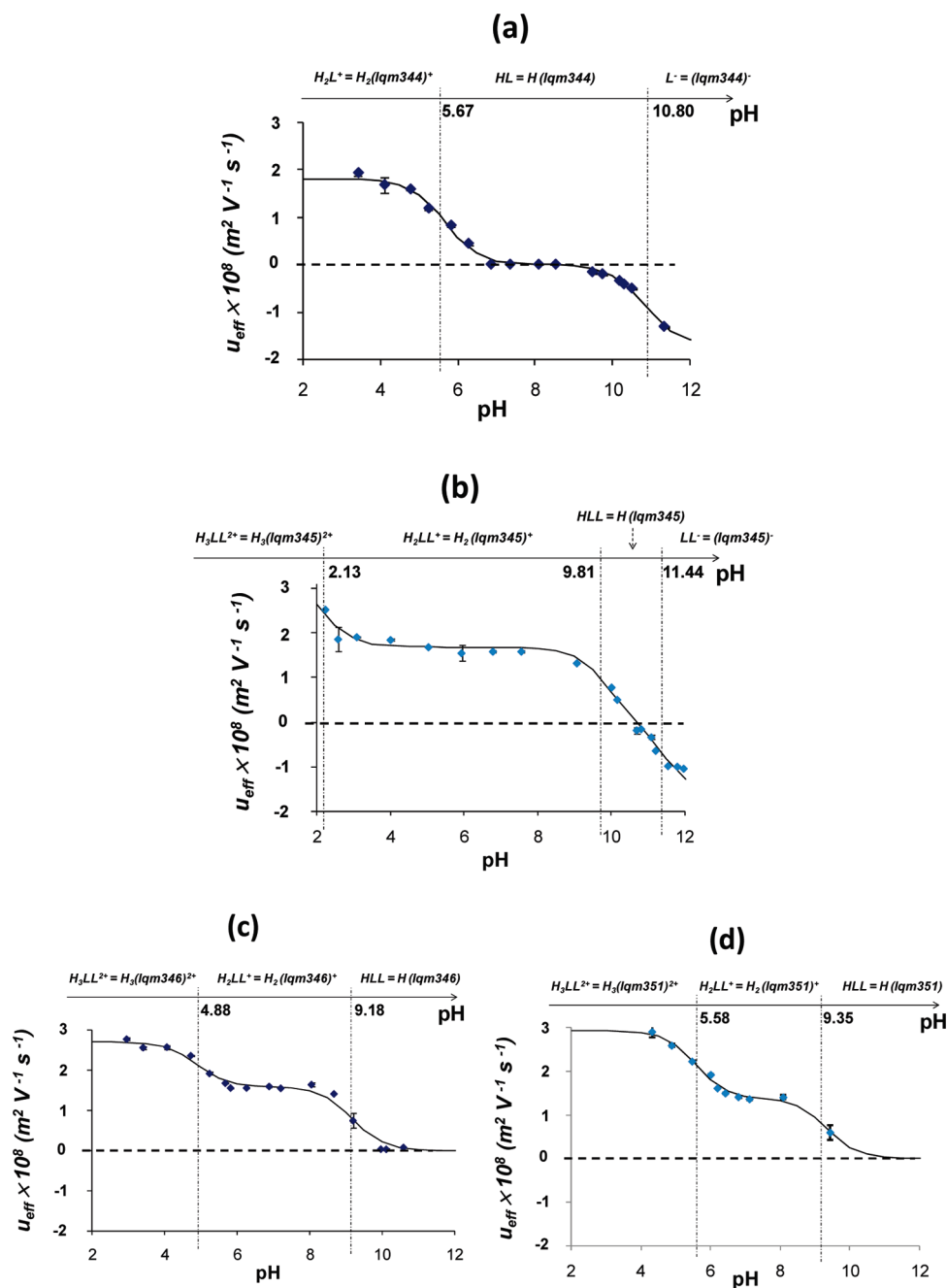


Figure 1. Mobility curves as a function of pH, obtained at 298 K and ionic strength 0.05 M. The markers represent the experimental results, and the solid lines, the fittings obtained with the aid of the program SQUAD. In the top of each figure, the corresponding predominance-zone diagram of the species²⁶ is represented. (a) LQM344. (b) LQM345. (c) LQM346. (d) LQM351.

TABLE 3: pK_a Values ($T = 25$ °C and $I = 0.05$ M) Refined with SQUAD from Electrophoretic Mobilities (Figure 1)^a

compounds and related equilibria	pK_{ai}	effective ionic mobility ($u_{H_j(lqm3XX)^-}$) ($\times 10^8$) $m^2 V^{-1} s^{-1}$	equivalent conductivity ^b ($\lambda_{H_j(lqm3XX)^-}$) $cm^2 \Omega^{-1} equiv^{-1}$
LQM344 $\sigma_{reg} = 0.080^c$			
$H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$	5.669 ± 0.053		
$HL \rightleftharpoons L^- + H^+$	10.803 ± 0.039		
H_2L^+		1.806 ± 0.104	17.13 ± 0.99
L^-		-1.677 ± 0.099	15.9 ± 0.94
LQM345 $\sigma_{reg} = 0.150^c$			
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	2.125 ± 0.099		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.806 ± 0.073		
$HLL \rightleftharpoons LL^- + H^+$	11.440 ± 0.039		
H_3LL^{2+}		3.360^d	15.94^d
H_2LL^+		1.681 ± 0.111	15.9 ± 1.1
LL^-		-1.68^d	15.94^d
LQM346 $\sigma_{reg} = 0.126^c$			
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	4.882 ± 0.153		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.184 ± 0.064		
H_3LL^{2+}		2.702 ± 0.123	12.82 ± 0.58
H_2LL^+		1.584 ± 0.083	15.02 ± 0.79
LQM351 $\sigma_{reg} = 0.097^c$			
$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	5.577 ± 0.141		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.351 ± 0.077		
H_3LL^{2+}		2.927 ± 0.119	13.88 ± 0.56
H_2LL^+		1.365 ± 0.075	12.95 ± 0.71

^a The effective ionic mobility of all the involved species were also estimated during refining. ^b Equivalent conductivities of ions are calculated with the equation: $|\lambda_{H_j(lqm3XX)^-}| = F u_{H_j(lqm3XX)^-}$, where F accounts for the constant of Faraday.^{12,27} ^c σ_{reg} represents the standard deviation of the regression. ^d This parameter has been maintained constant during refining.

hydroxyl moiety in the phenol group. Then, the bulk effect of the solvent was included a posteriori by single point calculations at the gas phase geometries. The third approach (A2) was very similar to the second one, except that in this case a second water molecule was explicitly included in the vicinity on the N atom in the piperidin group. A comparison of the results from these methodologies with the experimental data is reported in Table 2. As the values in this table show, the best results were obtained with the A2 approach. It is also interesting to notice that this mixed scheme is computationally less expensive than performing all the calculations at PCM level. The results in Table 2 are coherent with a previous report showing that including explicit water molecules in addition to a continuum solvation model can produce better results than using only a continuum model at the same level of theory.²⁰

On the basis of these results, the pK_a values for all the other systems were calculated using the A2 approach, i.e. geometry optimizations and frequency calculations were performed at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory, followed by PCM single point calculations at the B3LYP/6-311++G(d,p) level. The Gibbs free energies obtained that way were used to calculate the Gibbs free energies of reaction corresponding to the deprotonation processes: ΔG_{deprot}^0 . This magnitude was computed for each $HA_{aq}^+ \rightleftharpoons A_{aq} + H_{aq}^+$ reaction as

$$\Delta G_{deprot}^0 = G_{aq}(A) + G_{aq}(H^+) - G_{aq}(AH^+) \quad (1)$$

The Gibbs free energy of the proton in aqueous solution, i.e. the $G_{aq}(H^+)$ term, was estimated from experimental values as

$$G_{aq}(H^+) = G_{gas}(H^+) + \Delta G_s(H^+) \quad (2)$$

where $G_{gas}(H^+) = -6.28$ kcal/mol and represents the Gibbs free energy of the proton in gas phase, while $\Delta G_s(H^+) = -264.61$ kcal/mol and is the solvation free energy of the proton. This procedure has been previously used in calculation of pK_a values with successful results.²¹⁻²⁵

The aqueous Gibbs free energies for the deprotonation reactions are in turn used to compute the acid equilibrium constant (K_a), according to

$$K_a = e^{-\Delta G_{deprot}^0/RT} \quad (3)$$

Then, and using the pK_a definition,

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (4)$$

3. Results and Discussion

Stability of LQM Compounds. The stability studies on the four studied compounds were carried out by spectrophotometrical analysis of their aqueous solutions that were followed in function of time for acid, basic, and neutral solutions. The nitro compounds (LQM344 and LQM345) showed higher stability than the other two (LQM346 and LQM351). The last compounds start to slowly precipitate after a few hours. On the basis of these results, we have used fresh solutions, prepared as diluted as possible.

Capillary Zone Electrophoresis (CZE) at $T = 298$ K and $I = 0.05$ M. After the stability tests, the following step was the determination of the pK_a values of each LQM compound, at 298 K and $I = 0.05$ M by capillary zone electrophoresis. The mobility curves as function of pH are shown in Figure 1 and the parameters of their fitting with the program SQUAD, as explained elsewhere,¹² are shown in Table 3. An equation¹² of the effective mobility as a function of pH for LQM344 species is presented in eq 5:

$$u_L = u_{L^-}f_{L^-} + u_{HL}f_{HL} + u_{H_2L^+}f_{H_2L^+}$$

$$= \frac{u_{L^-} + u_{H_2L^+}[10^{(pK_{a1}+pK_{a2}-2pH)}]}{1 + 10^{(pK_{a2}-pH)} + 10^{(pK_{a1}+pK_{a2}-2pH)}} \quad (5)$$

where f_{L^-} , f_{HL} , and $f_{H_2L^+}$ are the molar fractions of the distribution diagram²⁶ of the LQM344 species, u_{L^-} , u_{HL} , and $u_{H_2L^+}$ are their corresponding ionic mobilities, and pK_{a1} and pK_{a2} are the minus logarithmic values of the acidity constants of H_2L^+ and HL species, respectively.

A general equation of the same kind¹² for LQM345, LQM346, or LQM351 species is presented in eq 6:

$$u_{LL} = u_{LL^-}f_{LL^-} + u_{HLL}f_{HLL} + u_{H_2LL^+}f_{H_2LL^+} + u_{H_3LL^{2+}}f_{H_3LL^{2+}}$$

$$= \frac{u_{LL^-} + u_{H_2LL^+}[10^{(pK_{a2}+pK_{a3}-2pH)}] + u_{H_3LL^{2+}}[10^{(pK_{a1}+pK_{a2}+pK_{a3}-3pH)}]}{1 + 10^{(pK_{a3}-pH)} + 10^{(pK_{a2}+pK_{a3}-2pH)} + 10^{(pK_{a1}+pK_{a2}+pK_{a3}-3pH)}} \quad (6)$$

where f_{LL^-} , f_{HLL} , $f_{H_2LL^+}$, and $f_{H_3LL^{2+}}$ are the molar fractions of the distribution diagram²⁶ of the LQM345, LQM346, or

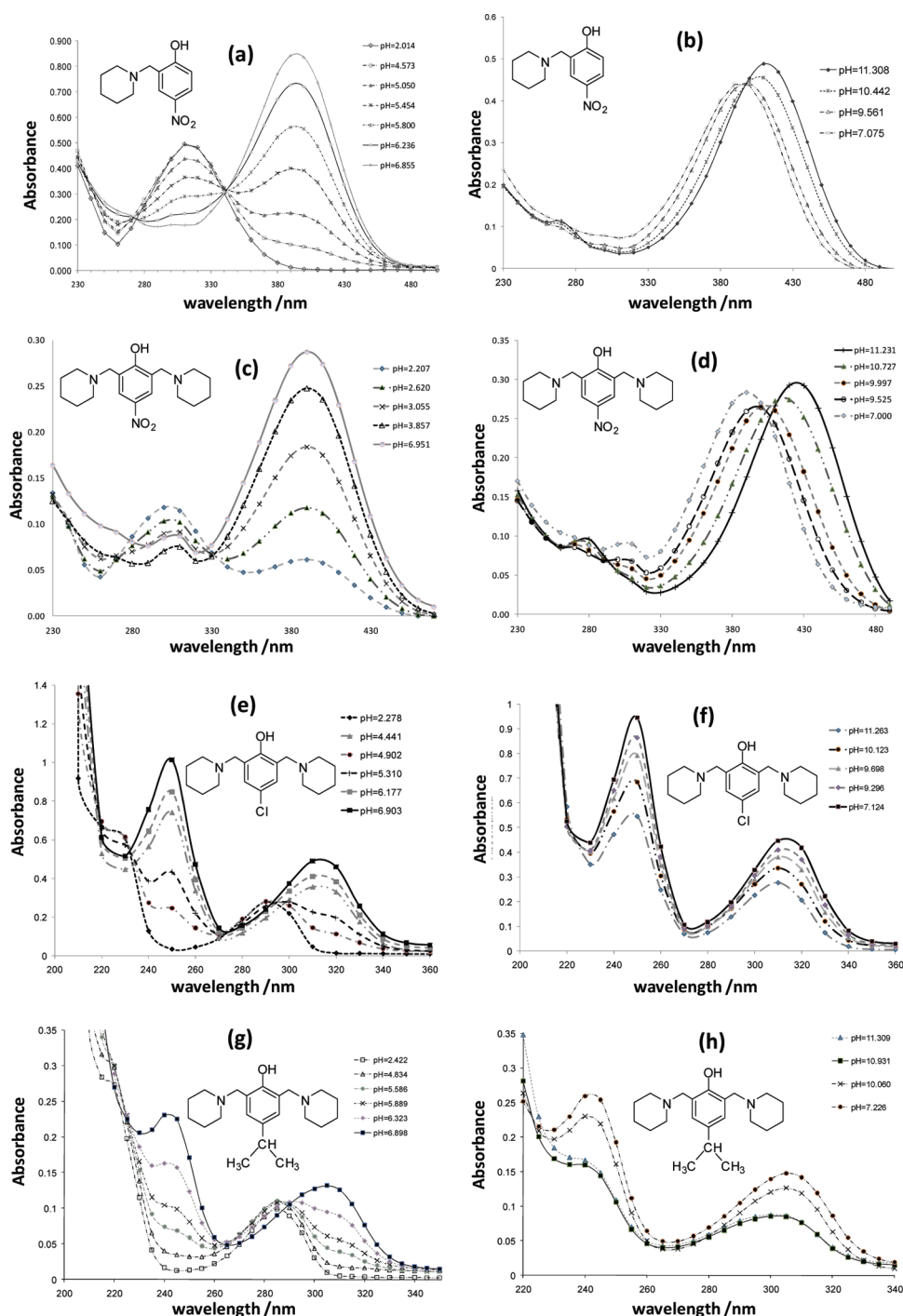


Figure 2. UV absorption spectra of the LQM compounds studied in this work. (a) [LQM344] = 6.8×10^{-5} M within the $2 \leq \text{pH} \leq 7$ interval. (b) [LQM344] = 3.4×10^{-5} M within the $7 \leq \text{pH} \leq 12$ interval. (c) [LQM345] = 2.016×10^{-5} M ($2 \leq \text{pH} \leq 7$). (d) [LQM345] = 2.016×10^{-5} M ($7 \leq \text{pH} \leq 12$). (e) [LQM346] = 1.015×10^{-4} M ($2 \leq \text{pH} \leq 7$). (f) [LQM346] = 1.015×10^{-4} M ($7 \leq \text{pH} \leq 12$). (g) [LQM351] = 3.144×10^{-5} M ($2 \leq \text{pH} \leq 7$). (h) [LQM351] = 3.144×10^{-5} M ($7 \leq \text{pH} \leq 12$).

TABLE 4: pK_a Values Obtained under Pseudophysiological Conditions ($T = 310$ K and $I = 0.15$ M), Refined with SQUAD from Spectrophotometric Data (Figure 2)

	$pK_{a1} \pm \sigma$	$pK_{a2} \pm \sigma$	$pK_{a3} \pm \sigma$	σ_{reg}, U^a
LQM344	5.559 ± 0.004	10.185 ± 0.015	not found	0.007, 0.015
LQM345	2.829 ± 0.017	9.273 ± 0.057	10.632 ± 0.020	0.005, 0.010
LQM346	5.480 ± 0.005	9.887 ± 0.017	>12	0.008, 0.038
LQM351	6.154 ± 0.014	10.425 ± 0.025	>12	0.004, 0.008

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

LQM351 species, u_{LL^-} , u_{HLL} , $u_{\text{H}_2\text{LL}^+}$, and $u_{\text{H}_3\text{LL}^{2+}}$ are their corresponding ionic mobilities, and pK_{a1} , pK_{a2} , and pK_{a3} are the minus logarithmic values of the acidity constants of H_3LL^{2+} , H_2LL^+ , and HLL species, respectively.

Compound LQM344, which has only one piperidin moiety in its structure, shows the expected behavior (Figure 1a). The double-protonated species corresponds to a monocation ($\text{H}_2\text{L}^+ = \text{H}_2(\text{lqm344})^+$) while the fully deprotonated one corresponds to a monoanion ($\text{L}^- = (\text{lqm344})^-$). Therefore, the monoprotonated electrically neutral species ($\text{HL} = \text{H}(\text{lqm344})$) prevails on the system with a main predominance ($f_{\text{HL}} \geq 0.99$) in the $7 < \text{pH} < 9$ range (Figure 1a).

On the other hand, not all the possible deprotonation processes were observed for the dipiperidinic compounds (Figure 1b–d). The three expected acid functions were observed only for LQM345. This probably means that the missing deprotonations for LQM346 and LQM351 take place at pH values out of the studied range. In fact, it was difficult to obtain a signal of them in the electropherograms for pH values higher than 8, which may be due to the low solubility of HLL species or to its adsorption in these conditions. The corresponding data are reported in Table 3. These values were used to construct the continuous line in Figure 1 and were refined with the program SQUAD.¹²

It is important to remark that the more stable species for LQM345 is $\text{H}_2\text{LL}^+ (= \text{H}_2(\text{lqm345})^+)$, with a main predominance in the $3 < \text{pH} < 9$ range, while the zero-charged species (HLL

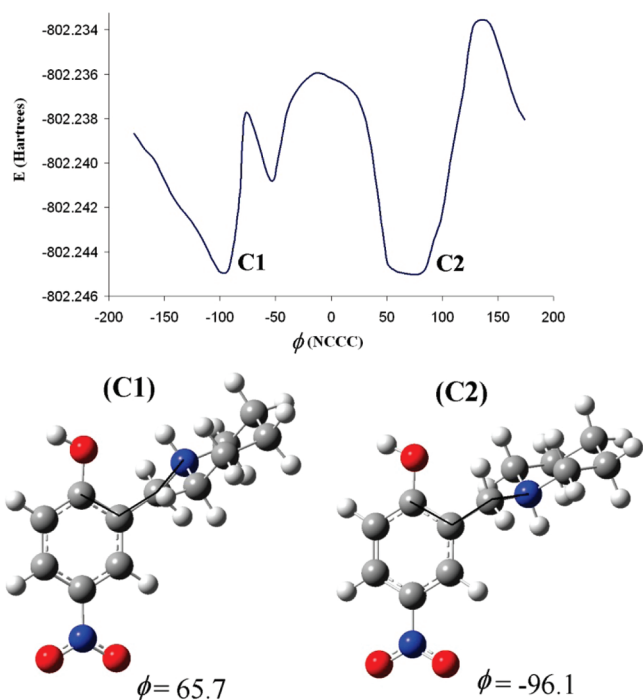


Figure 4. Relaxed scan calculations in aqueous solution (PCM) for $\text{H}_2(\text{lqm344})^+$.

$= \text{H}(\text{lqm345})$) has a small predominance interval—around $9.9 < \text{pH} < 11.4$ —with a single zero-charge point near $\text{pH} 10.67$ (Figure 1b).

In the case of the LQM346 and LQM351 compounds, the behavior is similar. The species $\text{H}_3\text{LL}^{2+} (= \text{H}_3(\text{lqm346})^{2+}$ or $\text{H}_3(\text{lqm351})^{2+}$) is more important in acidic media, followed by the predominance of the species $\text{H}_2\text{LL}^+ (= \text{H}_2(\text{lqm346})^+$ or $\text{H}_2(\text{lqm351})^+$) near neutral and slightly basic media, arriving finally at the predominance of the neutral species $\text{HLL} (= \text{H}(\text{lqm346})$ or $\text{H}(\text{lqm351}))$ at $10 < \text{pH} < 12$ and a zero-

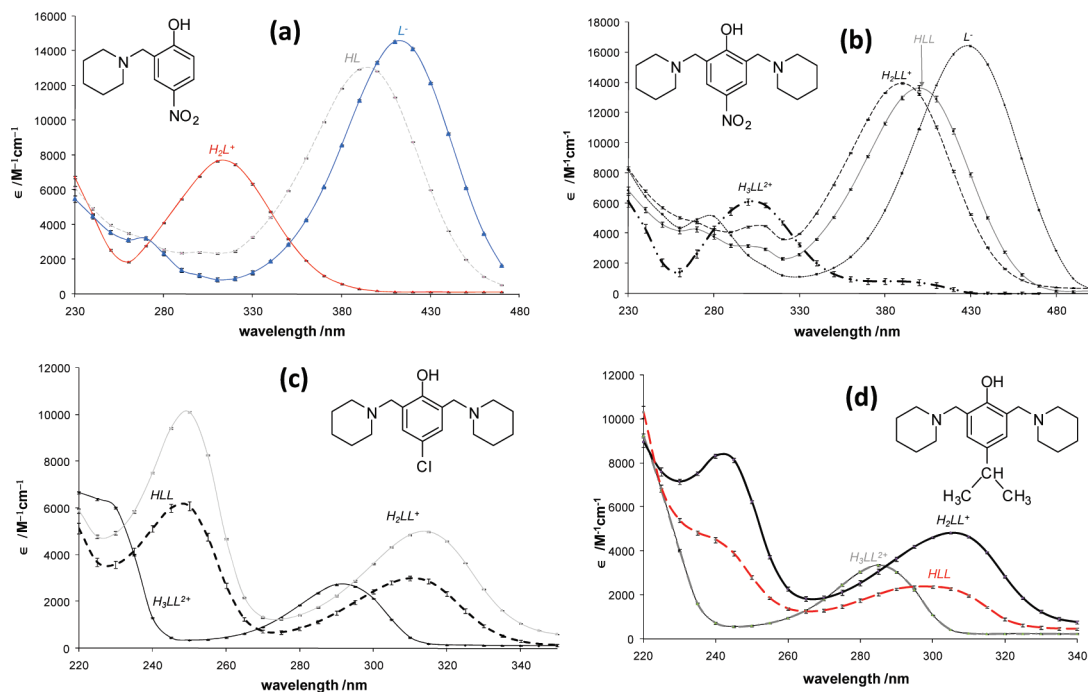
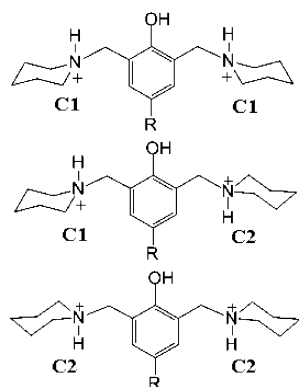


Figure 3. Molar absorptivity coefficients of the LQM compounds studied in this work, determined by the program SQUAD. (a) LQM344. (b) LQM345. (c) LQM346. (d) LQM351.

SCHEME 3



charge interval in $11 < \text{pH} < 12$ (Figure 1b and c). As it has been said before, the formation of the totally deprotonated species ($\text{LL}^- = (\text{lqm346})^-$ or $(\text{lqm351})^-$) was not observed in the pH range studied in the present work.

UV Spectrophotometry at Pseudophysiological Conditions ($T = 310 \text{ K}$ and $I = 0.15 \text{ M}$). Due to the potential medical applications of the studied compounds, the UV spectrophotometric study was carried out under pseudophysiological conditions: 310 K and $I = 0.15 \text{ M}$. The most representative spectra, in acidic and basic media, are shown in Figure 2. Several isosbestic points, corresponding to acid–base equilibria, are observed. This information, together with the data gathered from CZE for number and nature of species in aqueous solutions, allows us to refine the same models with the program SQUAD.¹⁴ The refined pK_a results are reported in Table 4, while the refined molar absorptivity coefficients are shown in Figure 3.

Theoretical Study of the Deprotonation Mechanisms. The first step of the theoretical modeling was the conformational study of the involved species. For that purpose, relaxed scan calculations in aqueous solution (PCM) at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory were performed for the protonated species of monopiperidin system. The results for H_2L^+ ($\text{R} = \text{NO}_2$) are shown in Figure 4. Two different minima were found on the potential energy surfaces (PES) with similar electronic energies. These two points were then fully optimized and their thermodynamic corrections were computed at 298.15 K , at the same level of calculation, and the energies were improved by single point calculations at the B3LYP/6-311++G(d,p) level. It was found that C2 configuration is lower than the C1 isomer by 0.30 kcal/mol , in terms of Gibbs free energy.

On the basis of this information, three different conformers were considered for bipiperidin systems (H_3LL^{2+}): C1–C1, C1–C2, and C2–C2 (Scheme 3). The latter two were found to be almost identical in Gibbs free energy. Accordingly conformations C1–C2 were chosen in the case that the conformation of piperidin, relative to phenol, might play a role in the deprotonation ability of the N atoms.

In addition, and since we have chosen to use a mixed model for computing the energy evolution of the studied systems, the equivalent conformations were computed for H_2L^+ using the A2 approach, described above, and the C2 conformer was found to be lower in energy than C1 by 0.38 kcal/mol , diverging from pure PCM calculations by only 0.08 kcal/mol , which is meaningless in terms of quantum mechanical accuracy. This finding also supports the validity of the A2 approach, at least for the systems studied in this work.

However another validation is still needed. It has been previously described that gas phase geometries of deprotonated phenols tend to predict the O–C bond distance too short: by

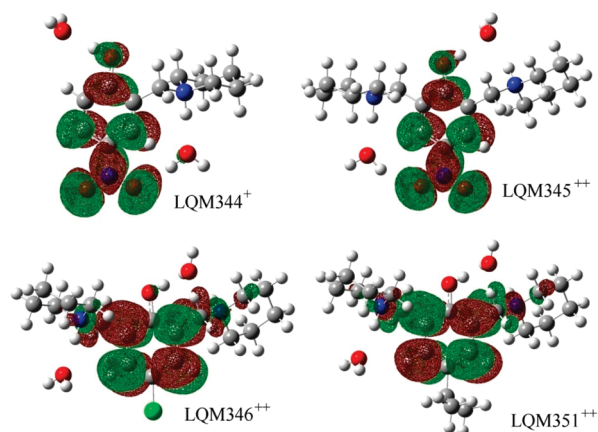


Figure 5. LUMO density surfaces, computed with an isodensity value of 0.02 au . $\text{LQM344}^+ = \text{H}_2(\text{lqm344})^+$, $\text{LQM345}^{++} = \text{H}_3(\text{lqm345})^{2+}$, $\text{LQM346}^{++} = \text{H}_3(\text{lqm346})^{2+}$, $\text{LQM351}^{++} = \text{H}_3(\text{lqm351})^{2+}$.

TABLE 5: Gibbs Free Energies of Reaction (kcal mol^{-1}) for all Possible First Deprotonation Pathways, at 298.15 K

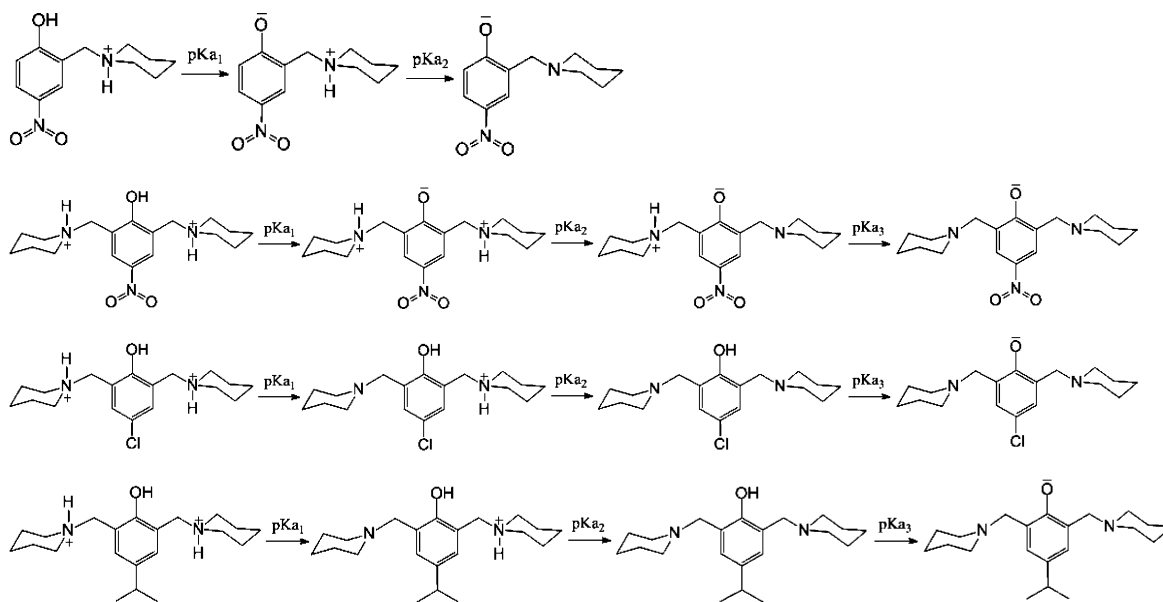
system	acid sites		
	OH	NH(C1)	NH(C2)
monopiperidin			
H_2L^+ , $\text{R} = \text{NO}_2$	7.88		8.71
dipiperidin			
H_3LL^{2+} , $\text{R} = \text{NO}_2$	1.88	6.88	7.71
H_3LL^{2+} , $\text{R} = \text{Cl}$	8.61	7.84	11.60
H_3LL^{2+} , $\text{R} = i\text{-C}_3\text{H}_7$	12.41	12.21	12.75

$\sim 0.05 \text{ \AA}$ when compared with PCM geometries.²² Accordingly it seems relevant to check if the inclusion of explicit water molecules in the gas phase optimizations solves this issue. The H_2L^+ system was chosen to perform this analysis since the para substituent is the most electron-withdrawing from all the studied ones. Accordingly it is expected to cause the largest shortening in the phenolic O–C bond. It was found that the discrepancy is reduced to 0.015 and 0.006 \AA for monodeprotonated and dideprotonated species, respectively. Since the difference between these values is very small, it seems that the inclusion of explicitly water molecules, especially in the vicinity of the hydroxyl group in the phenol, solves the geometry issue mentioned above and that the validity of our model is supported.

Another test was still performed before using the A2 approach. The sites of acidity for a molecular species are expected to be directly related to the location of the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO). The site contributing the most to the LUMO density is expected to be the most acidic one. Accordingly it is relevant to check if the location of the LUMO is the same within the pure PCM and the A2 approaches. It was found that regardless of the number of piperidine groups in the studied species, and of the nature of the substituent in the phenol para position, both approaches agree in the prediction of the most acidic site. Since this test also validates the A2 approach, from this point on, all the reported results will correspond to those obtained within this scheme.

The LUMO density surfaces obtained for the H_2L^+ and H_3LL^{2+} species are shown in Figure 5. According to this criterion, the site with highest acid character depend on the para substituent in the phenol group. For those species with nitro substituent, the phenolic OH shows larger contribution to the LUMO density than the amino sites, i.e. the phenolic H is expected to be the most acid one and the one involved in the first pK_a . For all the other para substituents, the amino groups

SCHEME 4



contribute to the LUMO densities in larger proportion than the phenolic OH, i.e. the most acid sites are expected to be those in the piperidin groups. However, for species with two piperidin groups (H_3LL^{2+}), this criterion is not enough to establish which of the amino groups has higher acid character.

Gibbs free energies for all possible deprotonation reactions have been computed at 298.15 K. Table 5 shows the $\Delta G_{\text{deprot}}^0$ values corresponding to the different pathways considered for the first deprotonation. These energy values are in good agreement with the predictions based on the LUMO density distribution. For the species with nitro groups at the para sites of phenols, the most feasible process is the one involving the OH in the phenol group, i.e. the first pK_a should be associated with the acidity of this site. For all the other substituents, the pathways involving amino groups lead to more favorable processes, i.e. less endergonic. For dipiperidin compounds, the conformation was found to influence the acidity of the amino group. It was systematically found that conformation C1 favors the deprotonation process, probably because of the vicinity with the hydroxyl group. Accordingly for paths IIB and IIC (Scheme 2), the first acid constant involves deprotonation from amino sites in C1 configurations.

Once the most viable path for the first deprotonation has been identified for H_2L^+ systems, the deprotonation routes are completely specified since only two deprotonation processes are considered. Accordingly path IA is proposed as the most viable one when $R = NO_2$.

For H_3LL^{2+} systems, on the other hand, two different pathways are possible for the second deprotonation process ($H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$). For H_2LL^+ with $R = NO_2$, the alternatives involve N(C1) and N(C2), while for H_2LL^+ with $R = Cl, i-C_3H_7$, the second deprotonation may involve the NH or the OH sites. In the first case, it was found that the second deprotonation from the N(C2) site is energetically more favored. For H_2LL^+ with $R = Cl, i-C_3H_7$, the second deprotonation was found to occur from the protonated nitrogen. In fact, any attempt to obtain the geometry corresponding to deprotonations from the phenolic site to form H_2LL_{NO} invariably evolved toward H_2LL_{NN} .

According to the Gibbs free energy evolution associated to the different deprotonation pathways modeled in the present work, the most viable paths seems to be that depicted in Scheme 4.

TABLE 6: Calculated pK_a Values, According to Pathways in Scheme 4

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
H_2L^+ , $R = NO_2$	5.78	9.91	
H_3LL^{2+} , $R = NO_2$	1.38	9.00	11.34
H_3LL^{2+} , $R = Cl$	5.75	10.10	17.18
H_3LL^{2+} , $R = i-C_3H_7$	8.49	10.35	18.14

The pK_a values calculated according to Scheme 4 are reported in Table 6. They are in excellent agreement with those obtained experimentally (Tables 3 and 4). A correlation between calculated and experimental pK_a values is shown in Figure 6. The theoretical calculations reproduce the experimental trends, which are also in line with chemical intuition. For instance, the presence of the nitro group at the para site of phenol, significantly increases the acidity of the phenolic proton, which is explained by the high electron-withdrawing character of this substituent. Moreover, the whole set of pK_a values decrease when this substituent is present, which suggest that it also influences the acidity of the protons in the N atoms of piperidin groups, despite of the presence of a methylene group between piperidines and the phenolic ring. In addition, the third pK_a that was not experimental observed for compounds

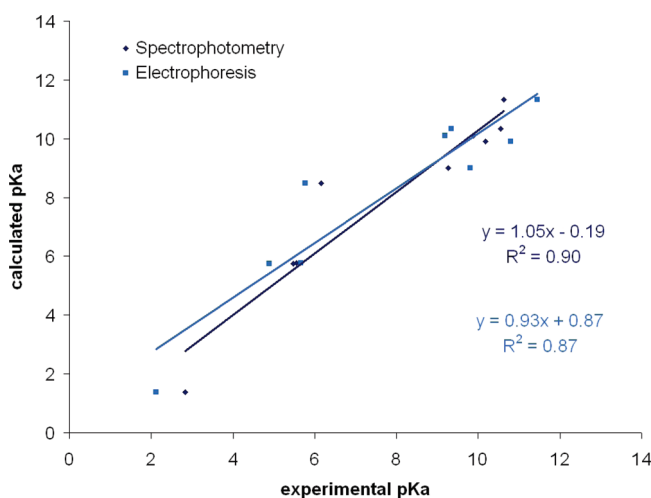


Figure 6. Correlation between calculated and experimental pK_a values.

TABLE 7: Mean Signed Errors (MSE), Mean Unsigned Errors (MUE), and Root Mean Square Errors (RMSE) for Calculated pK_a Values with Respect to Those Estimated by Spectrophotometric and Electrophoresis Techniques

	spectrophotometry	electrophoresis
MSE	0.171	0.338
MUE	0.661	0.907
RMSE	0.968	1.155

LQM346 and LQM351 are predicted to be higher of 12, i.e. out of the working range.

Analyzing the deprotonation Scheme 4, it is remarkable that neutral species of LQM344 and LQM345 are *zwitterionic*, while for LQM346 and LQM351 neutral species are molecular. It may be that this characteristic is related with the low solubility of the latter and with a pK_{a3} value greater than 12, as suggested by Figure 1c and d. Even more, the *nonzwitterionic* or molecular character of neutral species of LQM346 and LQM351 could allow proposing some predisposition to adsorb in the fused silica capillary that might explain the experimental difficulties to obtain a good electrophoretic signal in basic medium. In addition, this different character can play a significant role on the efficiency of the studied molecules for crossing the lipid membrane. This information should also be taken into account in their pharmacological implementation.

The deviations of the calculated pK_a values from those obtained by spectrophotometric and electrophoresis techniques are reported in Table 7, in terms of mean signed errors (MSE), mean unsigned errors (MUE), and root-mean-square errors (RMSE). Since the theoretical chemical accuracy is generally accepted to be around 1 kcal/mol, for the highest levels of theory and this would imply an error of about 0.8 units of pK_a , at 298 K, it can be stated that the present calculations accurately reproduce the experimental values. This agreement validates the used methodology, as well as the theoretical predictions, and supports the elucidation of the deprotonation paths proposed above.

4. Conclusions

Stability tests of the studied compounds were found in order to safely choose the work concentrations and the titration conditions.

The pK_a values for the four antihypertensive studied compounds were determined by UV spectrophotometry and CZE. These experimental results permit to predict a better physiological behavior of LQM344 by the main predominance of its electrically neutral species in these conditions.

The deprotonation mechanisms were elucidated using theoretical calculations. From the theoretical results can also be proposed that the nature of the para substituent in the phenol group influences not only the acidity of the different protons (phenolic and piperidinic) in H_2L^+ and H_3LL^{2+} but also the route of the consecutive deprotonation processes. Also, the theoretical results permit us to propose that the nonzwitterionic or molecular character of neutral species of the Cl and isopropyl derivatives might confer the lower acidity and solubility of these species with respect to the nitro derivatives.

Acknowledgment. We are indebted to UNAM through the PAPIIT-IN218408 and CONACyT 46124 and 82473 projects for partial financial support. J.M.I.-M. and D.R.-B. want to acknowledge CONACyT for their scholarships to follow postgraduate studies, and A.R.-H. is grateful to the same institution for support of a sabbatical leave at FESC-UNAM during 2009. A.G., M.T.R.-S., and A.R.-H. also thank the Laboratorio de Visualización y

Cómputo Paralelo at UAM—Iztapalapa for the access to its computer facilities.

References and Notes

- (1) Fields, L. E.; Burt, V. L.; Cutler, J. A.; Hughes, J.; Roccella, E. J.; Sorlie, P. *Hypertension* **2004**, *44*, 398.
- (2) Stout, D. M.; Mtier, W. L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R. D.; Brown, B. S. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 808.
- (3) Stout, D. M.; Mtier, W. L.; Barcelon-Yang, C.; Reynolds, R. D.; Brown, B. S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 295.
- (4) Velázquez, A. M.; Torres, L. A.; Díaz, G.; Ramírez, A.; Hernández, R.; Santillán, H.; Martínez, L.; Martínez, I.; Díaz-Barriga, S.; Abrego, V.; Balboa, M. A.; Camacho, B.; López-Castañares, R.; Dueñas-González, A.; Cabrera, G.; Angeles, E. *ARKIVOC* **2006**, *ii*, 150.
- (5) Montes, M. G. Síntesis de derivados Tiomorfolínicos LQM317, 318, 319, 320, 321 y 326 con actividad antihipertensiva. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2005.
- (6) Dwivedi, A. K.; Shucla, V. K.; Bhandari, K.; Setty, B. S.; Kamboj, V. P.; Khanna, N. M. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Including Med. Chem.* **1991**, *30B*, 281.
- (7) Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Irlas, A.; Barbosa, J. *J. Chromatogr. A* **2000**, *871*, 381.
- (8) Jiménez, E.; Marqués, I.; Barrón, D.; Beltrán, J. L.; Barbosa, J. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *464*, 37.
- (9) Weinberger, R. *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press, Inc.: New York, 1993.
- (10) Wescott, C. C. *pH Measurements*; Academia Press: New York, 1978.
- (11) Bates, R. G. *Determination of pH*, 2nd ed.; John Wiley and Sons: New York, 1973.
- (12) Rodríguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernández, A.; Moya-Hernández, R.; Gómez-Balderas, R.; Ramírez-Silva, M. T. *Talanta*, submitted for publication.
- (13) Gómez-Zaleta, B.; Ramírez-Silva, M. T.; Gutiérrez, A.; González-Vergara, E.; Güizado-Rodríguez, M.; Rojas-Hernández, A. *Spectrochim. Acta Part A* **2006**, *64*, 1002. (In this contribution, the equation of $pH_{corrected}$ is wrong. In the present paper, we have given the equation without error).
- (14) (a) Legget, D. J. *Computational Methods for Determination of Formation Constants*; Plenum Press: New York, 1985. (b) Legget, D. J.; McBryde, W. A. E. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1065.
- (15) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2004.
- (16) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098.
- (17) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (18) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.
- (19) (a) Cancès, M. T.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032. (b) Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151. (c) Mennucci, B.; Cancès, E.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506. (d) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E. *THEOCHEM* **1999**, *464*, 211.
- (20) Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 7434.
- (21) Liptak, M. D.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7314.
- (22) Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421.
- (23) Palascak, M. W.; Shields, G. C. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3692.
- (24) Murlowska, K.; Sadlej-Sosnowska, N. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5590.
- (25) Brown, T. N.; Mora-Diez, N. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9270.
- (26) (a) Rojas-Hernández, A.; Ramírez, M. T.; González, I. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 1099. (b) Moya-Hernández, R.; Rueda-Jackson, J. C.; Ramírez, M. T.; Vázquez, G. A.; Havel, J.; Rojas-Hernández, A. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 389.
- (27) Bard, A. J.; Faulkner, R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: New York, 1980.