

8
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"INTERACCION DE LOS IONES CALCIO(II) Y
PLOMO (II) CON EL DIPEPTIDO GLIGLU"

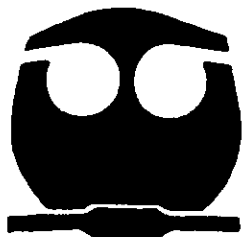
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

MARIA DE JESUS SANTA GUTIERREZ PONCE



MEXICO, D. F.,

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

25/05/98



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. BARBA BEHRENS NORAH YOLANDA

Vocal: Prof. GASQUE SILVA LAURA MARIA

Secretario: Prof. CASTILLO BLUM SILVIA ELENA

1er. Suplente Prof. SOSA TORRES MARTHA ELENA

2º. Suplente Prof. GARCIA ALEJANDRE JUVENTINO

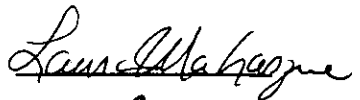
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Química Inorgánica

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química, UNAM

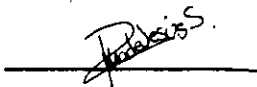
Asesor del Tema: Dra. Laura María Gasque Silva



Supervisor técnico: Dr. Rafael Moreno Esparza



Sustentante: María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce



DEDICATORIAS

A Dios: por haberme dado lo necesario
para terminar este trabajo.

A mi Madre: por la paciencia, comprensión
y ayuda de siempre.

A las grandes ausentes: mi Abuelita,
mi hermana Marina y mi amiga Noelia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Dra. Laura Gasque Silva, por la confianza y apoyo recibidos durante todos estos años.

Agradezco igualmente al Dr. Rafael Moreno, por su valiosa colaboración y consejos, para hacer posible gran parte del presente trabajo.

Manifiesto también, mi más sincero agradecimiento al Dr. Guillermo Mendoza y a su maravillosa familia, por la ayuda, confianza y apoyo incondicional, para poder elaborar esta tesis.

Asimismo agradezco a la Dra. Lena Ruiz y su equipo de colaboradores por permitirme ser parte de la familia.

Finalmente agradezco a todas las personas que me ayudaron a hacer realidad este sueño.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
PRÓLOGO	iii
INTRODUCCIÓN	v
CAPÍTULO I.- ANTECEDENTES	1
A) Los aminoácidos, los péptidos y las proteínas	
a) Definición	1
b) Los aminoácidos, los péptidos y las proteínas, como ligantes	4
B) El calcio y el plomo	
a) Semejanzas y diferencias	5
b) El calcio en los sistemas biológicos	7
c) El plomo en los sistemas biológicos	10
OBJETIVOS	12
CAPÍTULO II.- INTERACCIÓN DE LOS IONES Ca(II) Y Pb(II) CON LOS AMINOÁCIDOS L-AspH ₂ Y L-GluH ₂	13
A) Ca(L-Asp)	14
a) Trabajos previos	
• Constantes de formación publicadas para el complejo	15
• Estructuras cristalinas	16
b) Este trabajo	
• Caracterización del compuesto aislado	16
B) Ca(L-Glu)	20
a) Trabajos previos	
• Constantes de formación publicadas del sistema	21
• Estructura cristalina	22
b) Este trabajo	
• Caracterización del compuesto aislado	23
• Constantes de formación calculadas de los complejos Ca(L-Glu) y Ca(L-GluH) ⁺ ,	27

C) Pb(L-Asp)	29
a) Trabajos previos	
• Constantes de formación publicadas para el complejo	29
b) Este trabajo	
• Caracterización del compuesto aislado,	30
D) Pb(L-Glu)	32
a) Trabajos previos	
• Constantes de formación publicadas	33
b) Este trabajo	
• Caracterización del compuesto aislado,	33
• Constantes de formación calculadas Pb(L-Glu), Pb(L-GluH) ⁺ ,	36
CAPÍTULO III.- INTERACCIÓN DE LOS IONES Ca(II) Y Pb(II) CON EL DIPÉPTIDO GliGluH₂	38
- Las diferencias de los pKa's, entre el ácido glutámico y el dipéptido	39
A) Ca (II) + GliGluH₂	40
• Caracterización del compuesto aislado	40
• Constante de formación de los complejos Ca(GliGlu) y Ca(GliGluH) ⁺ .	46
• Valoración seguida por RMN ¹ H	47
B) Pb(II) + GliGluH₂	48
• Caracterización del compuesto aislado	48
• Constante de formación de los complejos Pb(GliGlu) y Pb(GliGluH) ⁺ .	51
• Valoración seguida por RMN ¹ H	52
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES	54
CAPÍTULO V.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÉNDICE I.- Parte experimental	59
APÉNDICE II.- Manual para el manejo y procesamiento de datos del titulador	65

ABREVIATURAS

L-GluH₂ = Ácido L-Glutámico

L-AspH₂ = Ácido L-Aspártico

GliGlu = GliGluH₂ = dipéptido formado por glicina unida por un enlace peptídico al ácido glutámico.

Ala= Alanina

Lys = Lisina

Gly = Gli = Glicina

Pro = Prolina

Gln = Glutamina

Leu = Leucina

Ser = Serina

Asn = Aspargina

Val = Valina

Phe = fenilalanina

Tyr = Tirosina

Thr = Triptofano

L-Asp = representa al ácido aspártico en su forma básica.

L-AspH = representa al ácido aspártico parcialmente desprotonado

R-NH₂ = amina primaria

M = metal

L = ligante

AE = Análisis elemental

IR = infrarrojo

RMN ¹H = resonancia magnética nuclear de protón

RMN ¹³C = resonancia magnética nuclear de carbono 13

[cm⁻¹] = centímetros a la menos uno

v.t. = vibración de tensión

as = asimétrico

δ = vibración de deformación en IR

μ = Fuerza iónica

MHz = Mega Herz

D₂O = Agua deuterada

δ = desplazamiento químico en RMN

$\Delta\delta$ = incremento en el desplazamiento químico

[ppm] = parte por millón en RMN

Δ = incremento

pD = - log [deuterio]

μL = micro litros, 10^{-6}L

pot. = potenciométrico

pol. = polarográfico

sol. = equilibrios en solución

K_a = constante de acidez

aq = en solución acuosa

PRÓLOGO

En el presente trabajo se hace un estudio de las interacciones de los iones Ca(II) y Pb(II) con los aminoácidos aspártico (L-AspH_2), glutámico (L-GluH_2) y el dipéptido GliGlu, como primer paso para poder entender la interacción de estos iones con la proteína calbindina.

Estos estudios se hacen mediante el aislamiento y caracterización de los complejos formados entre los cationes y los ligantes propuestos. También se determinaron las constantes de estabilidad en medio acuoso, para los complejos anteriores, mediante el método potenciométrico. El tratamiento de datos se realizó por medio del programa SUPERQUAD. Gracias a la información obtenida se logró evaluar la manera en que interactúan los cationes en estudio y los ligantes propuestos.

En el capítulo I se presentan los antecedentes. En primer término se da una definición de aminoácido, péptido y proteína. Posteriormente se hace una clasificación de estas especies químicas como ligantes. En la segunda parte de este capítulo se hace una breve revisión de las semejanzas y diferencias entre los metales calcio y plomo. Posteriormente se enuncian algunas actividades del ion Ca(II) en los sistemas biológicos, así como también, se muestra el factor común en la proteínas afines a calcio. Después se enumeran algunas de las actividades del Pb(II) en los sistemas biológicos. Finalmente se realiza una clasificación de los iones en ácidos y bases, duros y blandos.

En el capítulo II se hace un estudio de la interacción de los iones Ca(II) y Pb(II) con los aminoácidos L-AspH_2 y L-GluH_2 , el cual está integrado por datos, estructuras encontradas en la literatura y resultados derivados de la parte experimental de la presente tesis.

El capítulo III, se trata del estudio de la interacción de los iones Ca(II) y Pb(II) con el dipéptido GliGlu. En este caso los resultados fueron obtenidos de la parte experimental de este trabajo.

En el capítulo IV, se expresan las conclusiones derivadas de este estudio.

En la parte final, se proporcionan las referencias bibliográficas revisadas para la escritura de esta tesis y se anexan dos apéndices con la parte experimental y el procesamiento de datos.

INTRODUCCIÓN

La competencia entre los iones metálicos esenciales y los demás iones, se ha incrementado en nuestros días, debido básicamente al aumento de iones metálicos en el medio ambiente, emitidos como contaminantes a la biosfera. Parece bastante lógico que los organismos vivos, que están en constante y estrecho contacto con el entorno, terminen por absorber metales contaminantes; teniendo como consecuencia obstrucción en las actividades de los iones esenciales en los seres vivos.

Un ejemplo es el caso del ion $Pb(II)$, del que se ha probado su actividad tóxica en los organismos vivos, ya que provoca la inhibición de algunas enzimas involucradas en la síntesis de las porfirinas de los grupos hemo(1). La unión del plomo con el ARN de transferencia afecta la síntesis de proteínas(2). También se ha demostrado la afinidad de éste por metaloproteínas del ion $Ca(II)$.

Esta última observación es justamente la que motiva la presente investigación, tomando como base a la calbindina que es una proteína encargada de la absorción del ion calcio en el intestino de los bovinos. Esta es una proteína representativa, pues los sitios afines con el $Ca(II)$ son muy comunes en las proteínas de calcio. Se cuenta con su estructura cristalina(3) en la que se aprecian los dos sitios de unión con el ion calcio. Al comenzar el planteamiento del proyecto se hizo una revisión de los sitios de enlace metal-proteína, de la cual se derivan las siguientes observaciones: ambos sitios contienen aminoácidos con residuos carboxílicos y la secuencia de aminoácidos común es AspGlu.

Consecuentemente se propone como primer paso, estudiar las interacciones de los iones $Ca(II)$ y $Pb(II)$ con los aminoácidos L-AspH₂ y L-GluH₂, y en segundo lugar por cuestiones de accesibilidad económica, el estudio de la interacción de $Ca(II)$ y $Pb(II)$ con el dipéptido GluGlu.

Es evidente que el presente trabajo dista mucho de poder dilucidar adecuadamente la unión entre los iones $Ca(II)$ y $Pb(II)$ con la proteína propuesta,

pero es el primer paso de una serie de trabajos que la Dra. Laura Gasque, el M en C. Sigfrido Escalante y su grupo de colaboradores están realizando.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

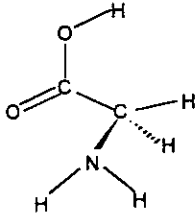
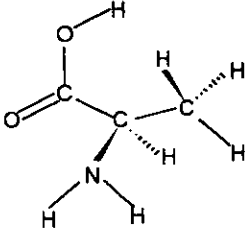
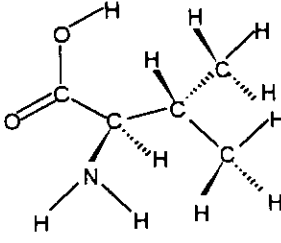
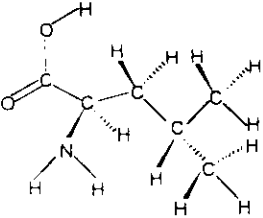
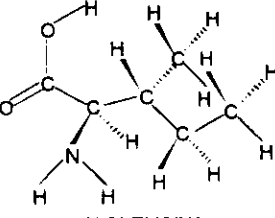
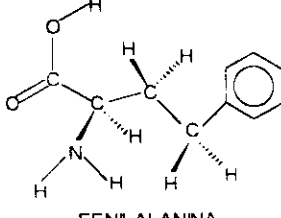
A) AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEINAS

a) Definición

Un **aminoácido** es, como su nombre lo indica, un compuesto que contiene a la vez un grupo amino y un grupo ácido. Desde el punto de vista biológico, los únicos aminoácidos importantes son los llamados α -aminoácidos de configuración L. Es decir, son aminoácidos en los que el grupo NH_2 está unido al carbono vecino al grupo carboxilo y además, de acuerdo con su actividad óptica, son levorrotatorios.

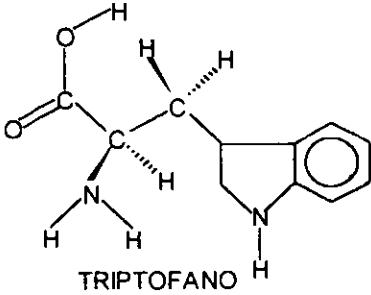
Aunque se conocen algunos centenares de aminoácidos naturales, la mayoría de ellos son no proteicos, es decir, no se encuentran como constituyentes de las proteínas. Sólo 19 aminoácidos se encuentran habitualmente en hidrolizados de proteínas. Estos aminoácidos se presentan en la Tabla 1.1, ordenados de acuerdo a las características coordinantes de sus residuos.(1)

Tabla 1.1 Los 19 aminoácidos proteicos

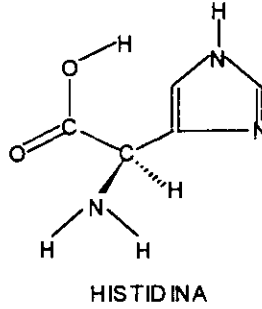
Tipo de residuo		
Hidrofóbico		
 <p>GLICINA</p>	 <p>ALANINA</p>	 <p>VALINA</p>
 <p>LEUCINA</p>	 <p>ISOLEUCINA</p>	 <p>FENILALANINA</p>

Tipo de residuo

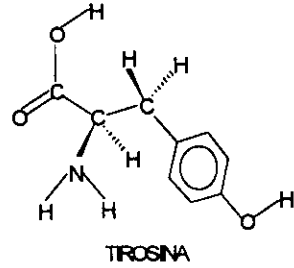
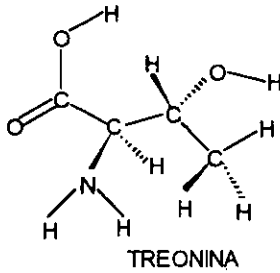
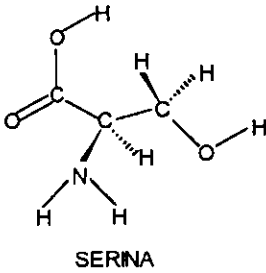
Inerte



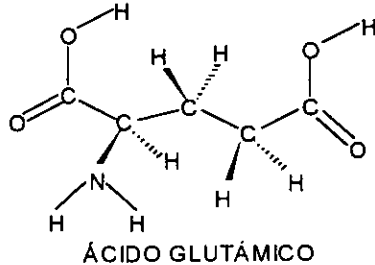
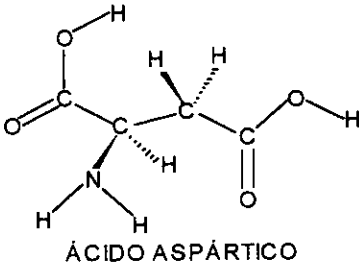
Imidazolinico



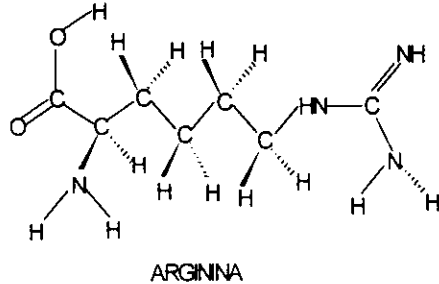
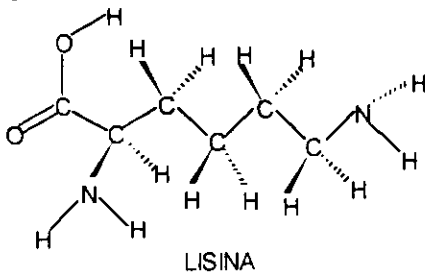
Hidroxílico

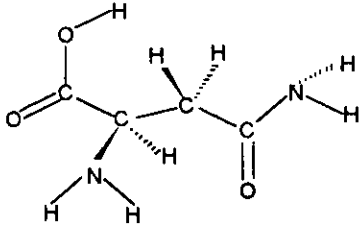
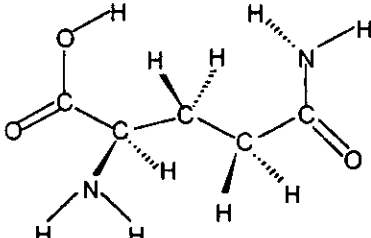
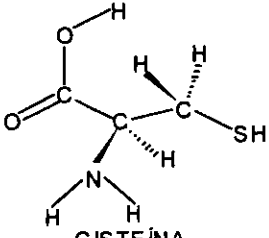
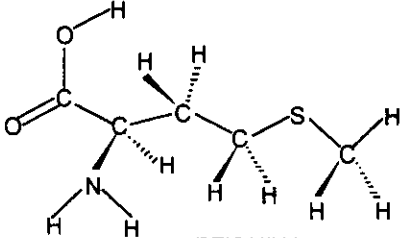


Carboxílico

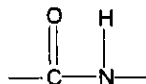


Amino



Tipo de residuo	
Amido	
 <p>ASPARAGINA</p>	 <p>GLUTAMINA</p>
Sulfurado	
 <p>CISTEÍNA</p>	 <p>METIONINA</p>

Se puede definir a un **péptido** como aquella entidad química, compuesto por aminoácidos unidos entre si por uniones peptídicas:



Las **proteínas** son macromoléculas de importancia biológica fundamental. Están constituidas por cadenas de aminoácidos enlazados por uniones peptídicas, y sus pesos moleculares son, usualmente, elevados, oscilando entre los 10^4 , 10^6 . Por tratamientos hidrolíticos adecuados las proteínas se pueden degradar a péptidos más pequeños y, finalmente, a los aminoácidos que los constituyen.(1)

Las proteínas que por hidrólisis sólo generan mezcla de aminoácidos, suelen llamarse **proteínas simples**, en cambio aquellas unidas a otros restos o grupos no proteicos se designan como proteínas conjugadas. La porción diferente a los aminoácidos que se halla en una proteína conjugada recibe, habitualmente, el nombre de grupo prostético. Estas proteínas conjugadas se clasifican basándose

en la naturaleza química de su grupo prostético. Así, las lipoproteínas contienen lípidos, las glucoproteínas, hidratos de carbono, las fosfoproteínas, grupos fosfato y las metaloproteínas contienen uno o más cationes metálicos unidos a la cadena proteica.(1)

b) Los aminoácidos, péptidos y proteínas, como ligantes

Los ligantes en química de coordinación, se definen como aquellos aniones o moléculas neutras que presentan al menos un átomo con un par de electrones no compartido, también conocidos como bases de Lewis. Así se puede decir que los aminoácidos, los péptidos y las proteínas son ligantes, debido a que tienen en su estructura átomos como N, S, y O que tienen pares de electrones libres, que pueden ceder a ácidos de Lewis, como los cationes metálicos presentes en los sistemas biológicos, formándose de esta manera compuestos de coordinación.

Una de las formas más usadas para la clasificación de los ligantes, es la que toma en consideración el número de átomos donadores presentes en el ligante, así se les denomina monodentados a los ligantes que contienen un sólo átomo donador de electrones, bidentado al que tiene dos, tridentado, a los de tres, etc. En general a los ligantes que contienen más de tres átomos donadores se les denomina polidentados. Según lo anterior, los aminoácidos libres pueden ser clasificados como ligantes bidentados, tridentados etc. según el aminoácido del que se trate. Por consiguiente los péptidos también pueden clasificarse como ligantes tri, tetra o polidentados dependiendo del péptido a clasificar. Finalmente las proteínas se pueden agrupar como ligantes polidentados.(4)

La interacción de iones metálicos con proteínas o algunos péptidos de bajo peso molecular, tiene lugar en sitios bien específicos de las cadenas protéicas. En principio tanto el grupo C=O como el N-H de las uniones peptídicas son sitios de coordinación propicios, pero en adición a ellos debemos considerar también otros grupos funcionales presentes en las cadenas laterales, tales como el OH alquílico de la serina o la treonina, el OH aromático de la tirosina, los restos carboxilato de los ácidos aspártico y glutámico, el grupo SH de la cisteína o los nitrógenos imidazólicos de la histidina.(1)

B) EL CALCIO Y EL PLOMO

a) Semejanzas y diferencias

Uno de los motivos que justifican la existencia del presente trabajo, es el hecho de que el plomo ya puede ser cuantificado en los mamíferos, como se aprecia en la Tabla 1.2 en donde se muestra la abundancia del calcio y de plomo.(4)

Tabla 1.2 Abundancia del calcio y de plomo

Abundancia de los elementos en [partes por millón]			
Elemento	Corteza terrestre	Océanos	Mamífero representativo
Ca	10^4	10^2	10^4
Pb	10	10^{-2}	0.5

Lo anterior se justifica debido a que el calcio y el plomo, forman parte de numerosos minerales como los que se enumeran en la Tabla 1.3(5)

Tabla 1.3 Principales minerales de calcio y del plomo

Minerales de Calcio	Minerales de Plomo
Caliza, Mármol, Dolomita, Anhidrita, Calcita, Aragonito (son formas de CaCO_3), Yeso(CaSO_4), Fluorita(CaF_2).	Galena (PbS), Cerusita, (PbCO_3), Anglesita, (PbSO_4)

Además los minerales y compuestos de ambos metales son ampliamente utilizados, por ejemplo el calcio se usa principalmente como aditivo de los metales fundidos para separar el oxígeno, los halógenos, el azufre y el fósforo; también como agente reductor o deshidratador en la química orgánica. El mármol sirve de elemento ornamental en la construcción, y para estatuaria. La cal se usa para preparar cementos y morteros, en la fabricación de polvos de gas; en la industria del curtido, y en agricultura para neutralizar suelos ácidos.

El plomo por su parte como uno de los metales más blandos y más pesados, se puede laminar y estirar fácilmente, pero pequeñas cantidades de antimonio, arsénico, cobre y metales alcalinotérreos aumentan su dureza. Su resistencia a la corrosión atmosférica y al ataque por los ácidos permite su uso en las

instalaciones de las fábricas de productos químicos, para tuberías y envolturas de cables. Otros usos importantes son para hacer placas de acumuladores, pigmentos de pinturas, reactivos químicos, municiones, soldadura, metal para tipos de imprenta y otras aleaciones.(5, 6)

En realidad la similitud entre estos metales reside en la posibilidad que tiene el calcio para tener números de coordinación altos y el valor inusual del radio iónico para cationes divalentes. En la Tabla 1.4 se hace la comparación de los radios iónicos de varios cationes, en los diferentes números de coordinación.(7)

Tabla 1.4 Radios iónicos de algunos cationes divalentes

Radios iónicos en picómetros, de cationes divalentes					
# de coordinación	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
6	114	86	81 ó 97	88	133
7	120		104	104	137
8	126	108	110		143
9	132				149
10	137				154
12	148				163

Comparación de los radios iónicos entre diferentes cationes divalentes (7)



De la tabla anterior se puede concluir que los iones calcio tienen radios iónicos de magnitudes más similares al ion plomo que los otros cationes.

Desde otro punto de vista, podemos también clasificar a los iones utilizando el concepto más general de ácidos y bases duros y blandos, que resulta muy útil para el manejo de las interacciones metal-ligante en la química de coordinación ordinaria. En este sentido, las especies biológicas H⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Co³⁺ y el Fe³⁺ son ácidos duros. Por lo tanto, y de acuerdo a la llamada regla de Pearson, estos ácidos tendrán preferencia a coordinarse a bases duras, tales como átomos de oxígeno (presentes en el agua, en grupos carboxilato, restos de fosfato o funciones alcohol) o de nitrógeno (grupos imidazol, uniones peptídicas, bases nucleicas).

Esto significa que los organismos vivos son, desde este punto de vista, sistemas duros. Por el contrario, muchos elementos tóxicos y contaminantes inorgánicos típicos, tales como el Tl^+ , Cd^{2+} o Hg^{2+} , son sistemas blandos y muestran preferencia por ligandos blandos (grupos tiolato, sulfuro, seleniuro).

En tanto que los ácidos intermedios como los cationes Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Pb^{2+} , pueden unirse a cualquiera de las bases mencionadas, duras o blandas. (1) La Tabla 1.5 agrupa a los diferentes cationes, ligandos o residuos de importancia biológica en ácidos, bases, duros y blandos (8)

Tabla 1.5 Clasificación ácidos y bases, duros y blandos

Metales (ÁCIDOS)	Ligandos (BASES)
Duros	
H^+ , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Ti^{3+} , Co^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} ,	H_2O , $(RO)_2PO_2^-$, NH_3 , PO_4^{3-} , $ROPO_3^{2-}$, OH^- , ROH , RNH_2 , R_2O , NO_3^- , $CH_3CO_2^-$, CO_3^{2-} , N_2H_4 , RO^- , Cl^-
Intermedios	
Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}	NO_2^- , Br^- , N_2 , N_3^- , SO_3^{2-} <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px;">   </div>
Blandos	
Cu^+ , Pt^{2+} , Pt^{4+} , Au^+ , Tl^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+}	R_2S , SCN^- , CN^- , $(RS)_2PO_2^-$, RS^- , H^- , RNC , R^- , RSH , R_3P , CO

Otra de las propiedades que enlaza a estos cationes, es que, según la clasificación de ácidos y bases duros y blandos, el plomo queda como un ácido intermedio, lo que lo convierte en un competidor, no sólo de bases blandas sino también de las bases duras a las que el ion calcio es afín. (8)

b) El calcio en sistemas biológicos:

El calcio es el quinto elemento más abundante (después del C, H, O, N) en el cuerpo humano. No obstante, la mayoría de sus funciones son estructurales, ya que el 95% del Ca^{2+} en el cuerpo reside en los huesos y en el esmalte de los

dientes en forma de hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Este metal está relacionado sólo a funciones involucradas en procesos característicos de formas de vida avanzadas como: transmisión nerviosa, contracción muscular, balance electrolítico, coagulación sanguínea; es también utilizado para mantener la integridad de la membrana celular y la adhesión celular. Regula actividades celulares tales como secreción de algunas hormonas (insulina, etc.), exocitosis, endocitosis, algunas actividades enzimáticas, quimiluminiscencia y fertilización.(9,10,11)

Muchas de estas actividades relacionadas con Ca^{2+} involucran interacciones con proteínas, las cuales el calcio puede estabilizar, activar y modular. Una de las maneras en que los iones calcio son regulados en el cuerpo, es mediante la acción de las proteínas afines a estos iones. La concentración de calcio dentro de las células vivas es de 10^{-4}M y fuera de ella es de 10^{-3}M . Existe un equilibrio dinámico entre el calcio estructural (huesos) y el de los fluidos corporales. Por lo tanto es esencial que la concentración de Ca^{2+} se mantenga en ciertos niveles, para el control de los procesos mencionados.(9)

Los iones calcio pueden tener altos números de coordinación (seis, siete u ocho), y usualmente están unido directamente a oxígenos o nitrógenos de aminoácidos, proteínas y enzimas.(9)

Las metaloproteínas de calcio son muy similares entre si, puesto que todas ellas presentan sitios de unión, al metal, ricos en residuos carboxílicos. En la Tabla 1.6 se presentan algunas proteínas de calcio, así como los ligantes que se unen al metal(12).

La ICBP, comúnmente llamada calbindina, fue seleccionada, para este proyecto, por ser una proteína representativa, es decir presenta dos sitios de unión al ion calcio con residuos ácidos. Además es una proteína sencilla, de aproximadamente 10K, fácil de aislar y de la que se conocen en detalle su secuencia de aminoácidos y se tienen varias determinaciones de su estructura tridimensional.(3) Al contar con toda la información antes mencionada de la

calbindina, se facilita el estudio de los dos sitios de unión con el ion calcio, de los que se presenta a continuación la secuencia de aminoácidos:

Sitio I Ala-Lys-**Glu-Gly-Asp**-Pro-Gln-Leu-Ser-Lys-Glu-Glu

Sitio II Asp-Lys-Asn-Gly-Asp-Gly-Glu-Val-Ser-Phe-Glu-Glu

Los aminoácidos subrayados son los que tienen residuos ácidos; y la secuencia en negritas permite ver la similitud entre ambos sitios.(3)

De esta secuencia común, se deriva la propuesta para trabajar con el tripéptido Asp-Gly-Glu, en busca de información que permita conocer cómo se lleva a cabo la interacción de las metaloproteínas de calcio con el ion plomo.

Por razones de accesibilidad económica, el presente trabajo se realizó con el dipéptido GliGlu y los aminoácidos carboxílicos. Pretendiendo con este estudio, comenzar en la modelación de la metaloproteína por medio de péptidos, con el fin, de valorar la competencia, entre estos iones metálicos, por las proteínas en cuestión y saber si estas son un canal viable para la introducción del ion plomo al organismo.

Es evidente que al terminar el presente trabajo no será posible concluir sobre el comportamiento de la proteína y los iones Ca(II) y Pb(II). Sin embargo se espera tener una base para continuar con el proyecto.

Tabla 1.6 Ligantes que enlazan al calcio en los sitios de unión de diferentes proteínas

Proteína	Ligantes
<i>Extracelular</i>	
Fosfolipasa A ₂	Tyr-28, Glu-30, Gly-32, Asp-49, 2H ₂ O
Nucleasa Estafilococal	Asp-19, Asp-21, Asp-40, Thr-41, Glu-43, 1H ₂ O
Tripsina	Glu-70, Ans-72, Glu-80, 2H ₂ O
Termolisina	Asp-138, Glu-177, Asp-185, Glu-187, Glu-190, 1H ₂ O
<i>Intracelular</i>	
Parvabumina	Asp-51, Asp-53, Ser-55, Phe-57, Glu-59, Glu62 Asp-90, Asp-92, Asp-94, Lys-96, Glu-101, 1H ₂ O
Calmodulina	Asp-20, Asp-22, Ans-24, Thr-26, Thr-28, Glu-31 Asp-56, Asp-58, Ans-60, Thr-62, Asp-64, Glu-67 Asp-93, Asp-95, Asn-97, Tyr-99, Ser-101, Glu-104 Ans-129, Asp-131, Asp-133, Glu-135, Asn-137, Glu-140

Proteína	Ligantes
Proteína intestinal	Ala-15, Glu-17, Asp-19, Gln-22, Ser-24, Glu-27 Asp-54, Asn-56, Asp-58, Glu-60, Ser-62, Glu-65
Troponina C	Asp-27, Asp-29, Gly-31, Asp-33, Ser-35, Glu-38 Asp-63, Asp-65, Ser-67, Thr-19, Asp-71, Glu-74 Asp-103, Asn-105, Asp-107, Tyr-109, Asp-111, Glu-114 Asp-139, Asn-141, Asp-143, Arg-145, Asp-147, Glu-150

En esta tabla se puede apreciar como la mayoría de los ligantes que se coordinan al Ca(II) son oxigenados

c) El plomo en los sistemas biológicos:

Los iones metálicos tóxicos de origen ambiental pueden unirse a proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos pequeños, en los organismos vivos, causando alteraciones o pérdida de la función biológica, además pueden perturbar el control homeostático de los metales esenciales cuando éstos son similares en términos de radio iónico y química de coordinación.(2)

El plomo se conoce desde hace más de 5000 años y sus efectos tóxicos ya fueron señalados por los griegos, los árabes y los romanos. Especialmente durante el Imperio Romano, deben haberse dado intoxicaciones continuadas, debido al uso intensivo de vasijas y muchos otros implementos con un gran contenido de plomo. También muchos pintores, entre ellos Goya, sufrieron intoxicaciones por el continuo contacto con pinturas a base de este metal. El aire de las grandes ciudades ha sido contaminado crecientemente por la combustión de gasolina, que contiene tetraetilplomo, como antidetonante. La creciente reducción en el uso de este aditivo en muchos países, ya ha mostrado efectos positivos a este respecto. La toxicidad aguda produce vómitos y falta de apetito así como malfunción renal y desórdenes nerviosos. Estos efectos se ven potenciados en el caso de pacientes que presentan deficiencias de calcio y de hierro.(1)

Aparte de este plomo ambiental, la mayor fuente de incorporación sigue siendo la dieta la que, afortunadamente, no permite una absorción muy intensa debido a la fácil formación de compuestos insolubles, tales como el fosfato, $Pb_3(PO_4)_2$, o el carbonato básico, $Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$. Parte del plomo no absorbido puede

finalmente ser acumulado en el hueso, el que de esta manera actúa seguramente como agente detoxificante.(1)

El ion Pb^{2+} , es conocido como inhibidor de algunas enzimas de Zn^{2+} como la ácido fructasa e interacciona con el ácido de transferencia del ARN afectando la síntesis de proteínas(2). El $Pb(II)$ tiene también tendencia a unirse a grupos $-SH$, aunque no en forma tan intensa como el mercurio. Por otro lado, interfiere prácticamente todas las etapas de la síntesis de las ferroporfirinas. En particular, afecta a la deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico, que controla una de las etapas claves en la formación del anillo porfirínico y la ferroquelatasa, que cataliza la incorporación del $Fe(II)$ a la porfirina.(1)

Una de las causas tóxicas del ion Pb^{2+} , es probablemente su carácter de ácido intermedio, (según Pearson), pues al no tener una preferencia por algún átomo donador en especial, este ion metálico puede acomodarse en los sitios de enlace de algunas biomoléculas y adaptar diferentes geometrías de coordinación, con su gran radio iónico como limitante.(2)

Un estudio realizado en 1996, por Battistuzzi y sus colaboradores(2), señala que el ion plomo puede coordinarse a pequeños péptidos por medio de cualquiera de los oxígenos de los carbonilos o por el nitrógeno de la amida desprotonada. El metal es coordinado inicialmente por algún grupo amino terminal, dándose posteriormente la unión con el grupo carboxílico formándose de esta manera un anillo de 5 miembros. Este enlace según lo observado se puede dar a pH ligeramente alcalino(2). De lo antes mencionado se puede inferir que no sólo los metabolitos con residuos $-SH$ pueden ser aceptores de plomo sino que también los que contiene oxígeno y nitrógeno.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Contribuir en la comprensión de la interacción de los cationes Ca(II) y Pb(II) con la proteína calbindina.

Objetivos Específicos:

- 1) Conocer la interacción de los iones Ca(II) y Pb(II) con los aminoácidos L-AspH_2 y L-GluH_2
- 2) Comprender la interacción de los iones Ca(II) y Pb(II) con el dipéptido GliGlu
- 3) Evaluar cuál de los ligantes propuestos es más afín a los iones Ca(II) y Pb(II) .

CAPÍTULO II

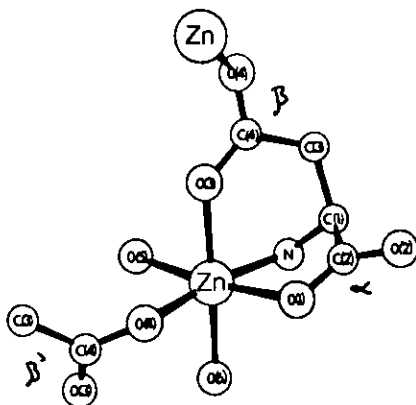
INTERACCIÓN DE LOS IONES Ca(II) Y Pb(II) CON LOS AMINOÁCIDOS

L-AspH₂ Y L-GluH₂

Los aminoácidos glutámico (L-GluH₂) y aspártico (L-AspH₂) (ver Tabla 1.1, aminoácidos carboxílicos), presentan tres sitios probables de enlace tanto para protón como para iones metálicos. Los grupos amino y carboxilo α son los que se coordinan fácilmente a los iones metálicos, debido a la formación de un anillo de 5 miembros en tanto la posibilidad de coordinación del carboxilo β es mayor para el ácido aspártico, por ejemplo: Zn(L-Asp)(H₂O)₂•H₂O(13) (ver Figura 2.1), y menor para el carboxilo γ y para el ácido glutámico, por la inestabilidad de los anillos que se forman en estos enlaces.

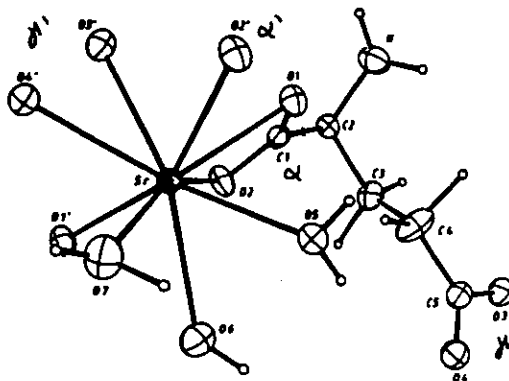
Para el ácido glutámico existen pocos casos informados en los que el grupo amino no esté involucrado, como con Sr en el complejo Sr(L-Glu)•3H₂O(14) en la Figura 2.2.

Figura 2.1 Estructura cristalina de Zn(L-Asp)(H₂O)₂•H₂O(13)



El complejo Zn(L-Asp)(H₂O)₂•H₂O(13), es un claro ejemplo de cómo los grupos amino y carboxilo α se coordinan al metal formando un anillo de 5 miembros, este compuesto también ejemplifica la coordinación del grupo carboxílico β formando un anillo de 6 miembros y participando como complemento en la esfera de coordinación de un ion metálico vecino.

Figura 2.2 Estructura cristalina del complejo Sr(L-Glu)•3H₂O(14)



En la estructura del complejo Sr(L-Glu)•3H₂O(14) se puede observar que el grupo amino no siempre participa en el enlace de coordinación, además es un ejemplo de la participación del grupo carboxilo y en la esfera de coordinación del ion metálico vecino.

Para completar la esfera de coordinación de los diferentes metales el carboxilo β o γ, dependiendo del aminoácido, participa formando puentes entre cada metal como se puede observar en las Figuras 2.1 y 2.2(13).

Ahora que ya se han mencionado las posibles formas de coordinación de estos aminoácidos a los iones metálicos y tomando en cuenta que el Ca(II) es un ácido duro y el Pb(II) un ácido intermedio, ambos afines a las bases duras como los grupos carboxílicos o los R-NH₂ de los aminoácidos(17); es de esperarse una interacción entre ellos; la pregunta obligada es ¿Qué ocurre con estos aminoácidos y los cationes motivo de este estudio?

Para responder a la pregunta anterior se presentan los diferentes complejos que forman estos aminoácidos con calcio y plomo. Este estudio está integrado tanto por datos encontrados en la literatura como por los obtenidos en la parte experimental de la presente tesis.

A) Ca(L-Asp)

a) Trabajos previos

En la Tabla 2.1 se muestran las constantes de estabilidad publicadas para dicho complejo

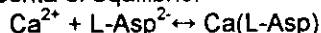
Tabla 2.1 Constantes de formación del complejo Ca(L-Asp).

Metal	Método	Condiciones	$\log K_{ML}^M$	Referencia
Ca ²⁺	pot.	25°, μ=0.1(KCl)	1.60	(20)
Ca ²⁺	pot.	25°, μ=0.7(KCl)	1.53	(21)

En la tabla anterior $\log K_{ML}^M$ es el logaritmo de la constante de formación del complejo Ca(L-Asp)

$$K_{ML}^M = K_{Ca(L-Asp)}^{Ca^{2+}} = \frac{[Ca(L-Asp)]}{[Ca^{2+}][L-Asp^{2-}]}$$

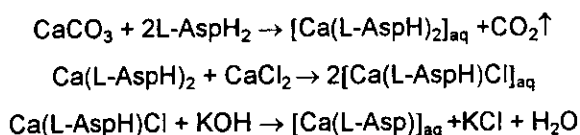
la constante anterior representa el equilibrio:



Las estructuras cristalinas que se encontraron en la literatura para este complejo son: Ca(L-Asp)•2H₂O(I) y Ca(L-Asp)•4H₂O(II), que se muestran en la Figura 2.3(16).

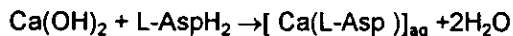
Como podemos observar ambos complejos presentan un número de coordinación siete para el ion calcio en un ambiente de una pseudo bipirámide pentagonal, con un aminoácido quelatado en dos posiciones ecuatoriales y un carboxilo β de una molécula vecina ocupando una posición apical, los sitios restantes están ocupados por moléculas de agua(16). Es importante señalar que el complejo de la segunda estructura, presenta al carboxilo β coordinado, formando un anillo de 6 miembros, y que la diferencia experimental para obtener la primera estructura y la segunda, radica en el tiempo de cristalización, siendo mucho mayor para la segunda estructura que para la primera. Lo anterior aunado a la presencia de diferente número de moléculas de agua, es una prueba de la complejidad de los equilibrios que se presentan en solución acuosa, para este sistema (16).

El complejo Ca(L-Asp)•2H₂O fue sintetizado por la siguiente ruta:



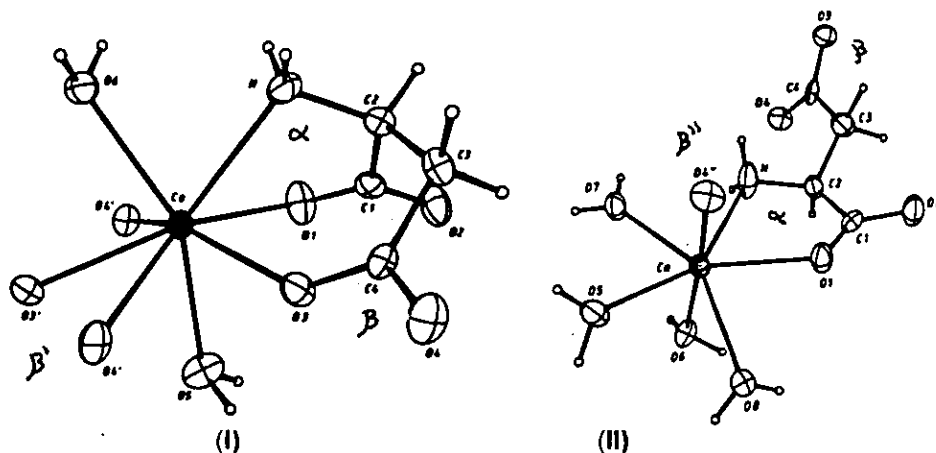
En el último paso, la mezcla de reacción se hace refluir por poco tiempo y se deja enfriar a temperatura ambiente, la cristalización se lleva varios meses.

El complejo $\text{Ca}(\text{L-Asp})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se obtuvo por la siguiente ruta de síntesis.



La mezcla de reacción se hace refluir por 3 horas y se deja cristalizar a temperatura ambiente, la cristalización se lleva varios días.

Figura 2.3 Estructuras cristalinas de $\text{Ca}(\text{L-Asp})\cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{I})$ y $\text{Ca}(\text{L-Asp})\cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{II})$ (16).



En la estructura (I) se puede observar la coordinación de los grupos NH_2 y $\text{COO}^- \alpha$, además de la intervención de un grupo $\text{COO}^- \beta$, de un aminoácido vecino, para complementar la esfera de coordinación del calcio.

La estructura (II) difiere de la (I) además del número de H_2O de coordinación por la unión del grupo $\text{COO}^- \beta$ del mismo aminoácido al metal, formándose un anillo de 6 miembros.

b) Este trabajo

En el presente trabajo de tesis, el compuesto que se logró aislar fue bajo la siguiente ruta de síntesis: $\text{CaCO}_3 + \text{L-AspH}_2$ en solución acuosa a $\text{pH} = 7$, el cual tardó en aislarse alrededor de 2 meses con la ayuda de un embudo, que servía de extractor, conectado a una bomba de vacío.

Se obtuvo un polvo blanco, al cual se le practicaron los siguientes análisis para su identificación: IR mediano, AE, RMN ^1H y RMN ^{13}C

En el análisis elemental se tiene:

Tabla 2.2 Análisis elemental del complejo Ca(L-AspH)₂

Ca(L-AspH) ₂						
Fórmula	%C	%H	%N	%C	%H	%N
	Teórico	Teórico	Teórico	Experimental	Experimental	Experimental
CaC ₈ H ₁₄ O ₈ N ₂	31.37	4.5	9.1	32.18	4.2	8.81

En los espectros de IR mediano las señales para los grupos funcionales del ácido aspártico, aspartato monosódico y el complejo de calcio que se aisló, fueron identificadas con ayuda de tablas especializadas (23), y se muestran en la Tabla 2.3

Tabla 2.3 Principales bandas en el IR mediano, del L-AspH₂, Na(L-AspH)•H₂O y Ca(L-AspH)₂.

Grupo funcional	Sal de Na ⁺	NH ₃ ⁺ , OH v.t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ v.t. [cm ⁻¹]	COO ⁻ v.t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ δ, [cm ⁻¹]	COO ⁻ v.t. [cm ⁻¹]
Tipo de banda	ancha e intensa	ancha e intensa	sobre tono	finas e intensas	finas, mediana	finas, mediana
L-AspH ₂	-	3008	2085	1692	1516	1422
Na(L-AspH)•H ₂ O	3376	3060	-	1648	1510	1414
Ca(L-AspH) ₂	3426	3018	2100	1600	1516	1420

Donde: v. t. =vibración de tensión, δ =vibración de deformación.

Como se aprecia en la tabla anterior, hay desplazamiento hacia menor energía de la señal del COO⁻ de 1692, en el ácido libre, a 1600 en el complejo de calcio, lo que sugiere que la unión del calcio con el aminoácido se lleva a cabo por alguno de los carboxilos. Por otro lado al equiparar los espectros del ácido aspártico, su sal monosódica y el complejo de calcio; se observa mayor similitud, en la forma del espectro del complejo de calcio con la sal monosódica, que con el ácido libre, debido a que en el complejo de calcio también aparece una banda alrededor de 3400, la cual es una banda característica para las sales de sodio de aminoácidos (23) (ver Figura 2.4), lo cual es congruente con la fórmula propuesta por análisis elemental, es decir se tiene la especie L-AspH⁻.

Figura 2.4 Espectros de Infrarrojo mediano de: L-AspH₂, Na(L-AspH)·H₂O y Ca(L-AspH)₂

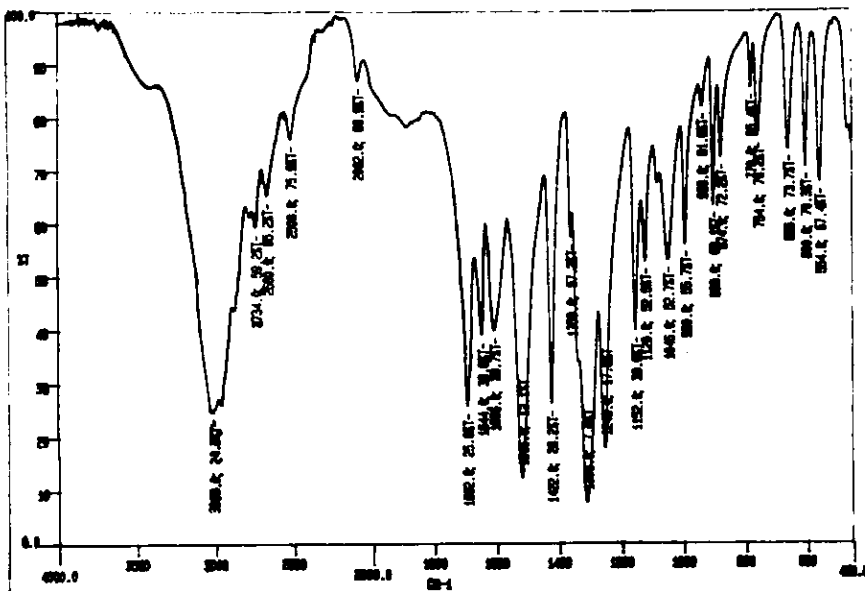


Figura 2.4a L-AspH₂

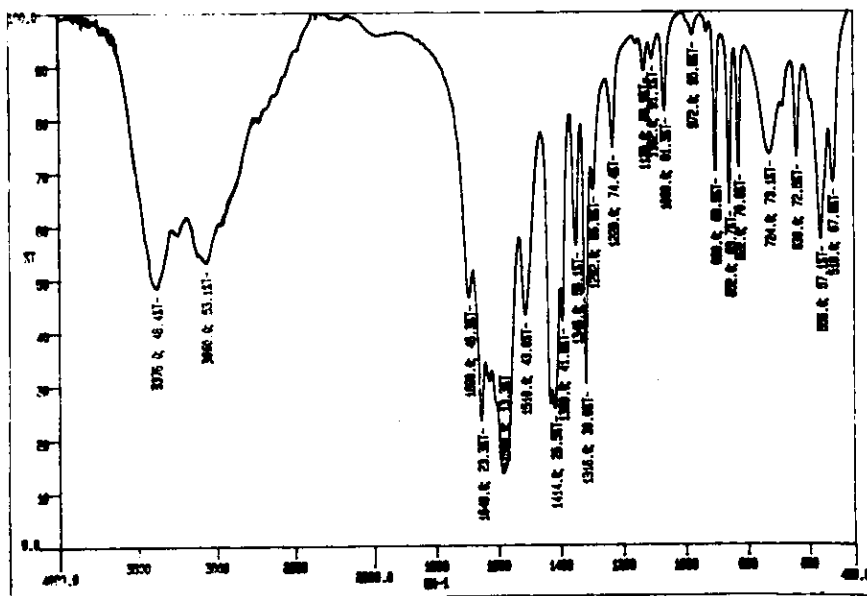


Figura 2.4b IR Na(L-AspH)·H₂O

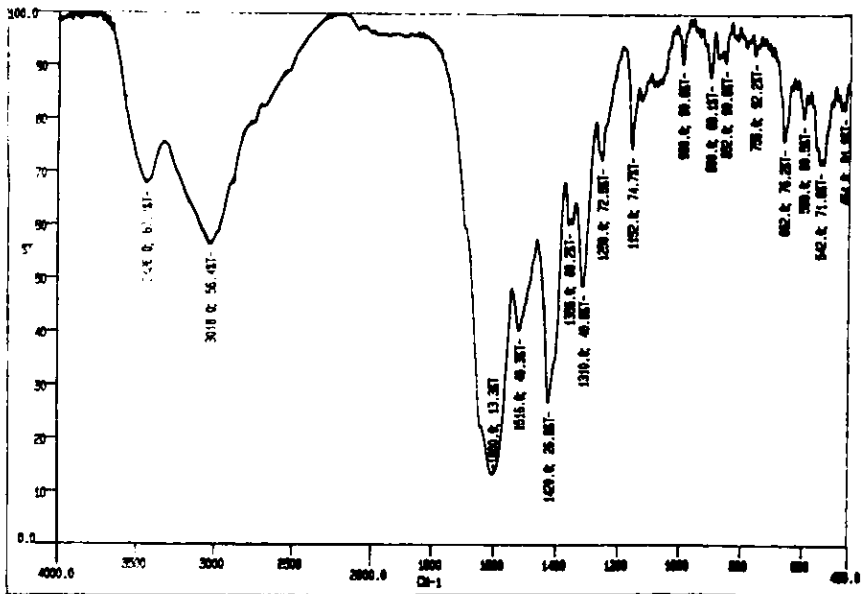


Figura 2.4c IR Ca(L-Asp)₂

Para la RMN ¹³C, se muestran los desplazamientos químicos de los 4 carbonos en la Tabla 2.4. Para poder interpretar con mayor facilidad los resultados de esta sección, en la Figura 2.5 se presenta la fórmula del ácido aspártico.

Figura 2.5 Asignación de los carbonos del ácido aspártico

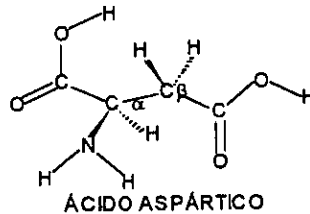
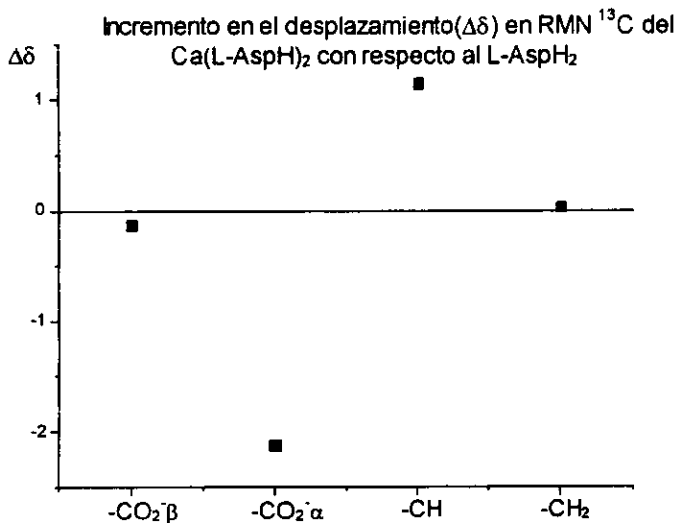


Tabla 2.4 Desplazamientos químicos presentes en RMN ¹³C, en estado sólido a 300MHz.

Compuesto	-CO ₂ ⁻ β, [ppm]	-CO ₂ ⁻ α, [ppm]	-CH, [ppm]	-CH ₂ , [ppm]
Na(L-AspH)•H ₂ O	174.24	174.24	48.901	34.852
L-AspH ₂	176.381	175.263	54.189	38.295
Ca(L-AspH) ₂	177.387	176.512	53.041	38.264

Las 2 señales esperadas para los COO⁻ en la sal monosódica del ácido aspártico, se vuelven una, lo que nos habla de ambientes químicos similares para los dos

carboxilos, en tanto que para el complejo de calcio, se logran ver dos señales para los carboxilos con un ligero desplazamiento con respecto al ácido libre. Esto se aprecia en la Gráfica 2.1 en donde se hace un $\Delta\delta$ tomando como referencia el ácido aspártico.



Gráfica 2.1

Debido a que en resonancia magnética nuclear el ambiente químico adyacente al núcleo atómico, influye en el desplazamiento de mismo (28), se puede proponer que el carboxilo α , está involucrado en el enlace con el ion calcio y además el hecho de que el CH también tenga un desplazamiento, confirma la aseveración anterior. En cambio el carboxilo β y el CH_2 tienen un desplazamiento pequeño, con respecto al que se presente en el $\text{CO}_2\alpha$ y el CH.

Para RMN ^1H tanto el $\text{Na}(\text{L-AspH})\cdot\text{H}_2\text{O}$, como el $\text{Ca}(\text{L-AspH})_2$ presentan un sistema ABX, es decir los protones del CH_2 se vuelven diferentes entre sí, lo que indica un ambiente químico distinto para cada uno de los protones. Este tipo de sistemas parece común para el ácido aspártico debido a que los complejos de Li y K también lo presentan(15), ver Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Complejos de L-AspH⁻ que presentan sistemas del tipo ABX en RMN ¹H, en D₂O.

Complejo	CH ₁ X [ppm]	CH ₂ A [ppm]	CH ₂ B [ppm]	J(AX) [Hz]	J(BX) [Hz]	J(AB) [Hz]
Li(L-AspH)•H ₂ O(15)	3.88	2.80	2.66	3.1	9.1	17.6
K(L-AspH)•2H ₂ O(15)	3.71	2.62	2.48	3.7	9.3	17.4
Na(L-AspH)•H ₂ O	3.70	2.636	2.4835	3.75	8.7	17.4
Ca(L-AspH) ₂	3.723	2.6645	2.5525	4.05	7.88	17.5

Conclusiones: Las estructuras cristalinas publicadas, presentan como probables la interacción de ambos carboxilos y el grupo amino con el ion calcio. Cabe señalar que en la síntesis de los complejos, el grupo amino estaba desprotonado, es decir el pH de síntesis fue mayor a 9.

Todas las pruebas efectuadas confirman la presencia de la especie L-AspH⁻ en el complejo de calcio aislado. El IR indica que la interacción del ion Ca(II) con el ácido aspártico se lleva a cabo por los carboxilos, lo que concuerda con el espectro de RMN ¹³C en donde la existencia del Δδ, en los desplazamientos del carboxilo α y el CH vecino, indica una interacción de los iones calcio con COO⁻ α. Lo anterior, se explica al saber que los iones Ca (II) son ácidos duros que interaccionan preferentemente con las bases duras como los oxígenos carboxílicos.

B) Ca(L-Glu)

a) Trabajos previos

Las constantes de estabilidad que se encontraron en la bibliografía se muestran en la Tabla 2.6 (13)

Tabla 2.6 Constantes de formación del complejo Ca(L-Glu)

Metal	Método	Condiciones	$\log K_{ML}^M$	$\log K_{MLH}^M$	Referencia
Ca ²⁺	sol	25°	2.06	11.12	(22)
Ca ²⁺	pot.	25°, μ=0.1 (KCl)	1.43		(26)
Ca ²⁺	pot.	25°, μ=0.7(KCl)	1.20		(21)

En la tabla anterior $\log K_{ML}^M$ representa el logaritmo de la constante de formación del complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu})$ y el $\log K_{MLH}^M$ es logaritmo de la constante de estabilidad del complejo $\text{Ca}(\text{L-GluH})^+$.

$$K_{ML}^M = K_{\text{Ca}(\text{L-Glu})}^{\text{Ca}^{2+}} = \frac{[\text{Ca}(\text{L-Glu})]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{L-Glu}^{2-}]}$$

La constante anterior represente el equilibrio: $\text{Ca}^{2+} + \text{L-Glu}^{2-} \leftrightarrow \text{Ca}(\text{L-Glu})$

$$K_{MLH}^M = K_{\text{Ca}(\text{L-GluH})^+}^{\text{Ca}^{2+}} = \frac{[\text{Ca}(\text{L-GluH})^+]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{L-Glu}^{2-}][\text{H}^+]}$$

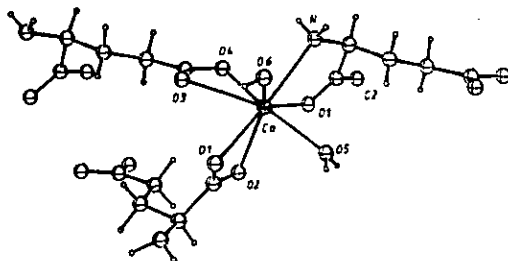
Esta constante se deriva del equilibrio: $\text{Ca}^{2+} + \text{L-Glu}^{2-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Ca}(\text{L-GluH})^+$

La estructura cristalina publicada del complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14), se muestra en la Figura 2.6, en donde el calcio está octa-coordinado, y el aminoácido está en la forma L-Glu^{2-} que funciona como un ligante donador por $\text{N}, \text{O}_\alpha$ y como uno O, O , cada ion calcio está coordinado a tres aminoácidos, de diferente manera, es decir uno de ellos se une al calcio por los grupos NH_2 y $\text{COO}^- \alpha$, otro por el carboxilo α y el tercero por el carboxilo γ . La esfera de coordinación se completa con dos moléculas de agua. La tercer molécula de agua no está coordinada al metal.

El complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ fue aislado al hacer reaccionar a $\text{pH} \approx 10$ con calentamiento a: $\text{Ca}(\text{L-GluH})_2 + \text{CaBr} \rightarrow [\text{Ca}(\text{L-Glu})]_{aq}$

en solución acuosa, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente para cristalizar

Figura 2.6 Estructura cristalina del complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14)



En la estructura cristalina del complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14), se observan tres posibles interacciones del ion calcio con el ácido glutámico.

b) Este trabajo

En el presente trabajo de tesis, se obtuvo un complejo en el que el aminoácido se encuentra en la forma $L\text{-GluH}^+$, a partir de la siguiente ruta de síntesis:



En este caso el tiempo de aislamiento fue alrededor de 4 meses, obteniéndose un polvo blanco, al cual se le practicaron las mismas pruebas que al complejo anterior con los siguientes resultados:

Tabla 2.7 Análisis elemental de $\text{Ca}(L\text{-GluH})_2$

$\text{Ca}(L\text{-GluH})_2$						
Fórmula	%C Teórico	%H Teórico	%N Teórico	%C Experimental	%H Experimental	%N Experimental
$\text{CaC}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{N}_2$	35.9	5.3	8.38	35.96	5.49	8.32

Para los espectros de IR mediano, nuevamente se asignan las señales para los grupos funcionales del ácido glutámico, glutamato monosódico y el complejo aislado de calcio, las cuales se muestran en la Tabla 2.8

Tabla 2.8 Principales bandas en el IR mediano, de $L\text{-GluH}_2$, $\text{Na}(L\text{-GluH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Ca}(L\text{-GluH})_2$

Grupo funcional	Sal de sodio	NH_3^+ , OH, v. t. [cm^{-1}]	NH_3^+ , v. t. [cm^{-1}]	COO^- , v. t. [cm^{-1}]	NH_3^+ , δ , [cm^{-1}]	COO^- , v. t. [cm^{-1}]
Tipo de banda	ancha e intensa	ancha e intensa	sobre tono	finas e intensas	finas	finas
$L\text{-GluH}_2$	-	3056	2080	1642	1518	1350
$\text{Na}(L\text{-GluH})\cdot\text{H}_2\text{O}$	3408	3114	2082	1600	1546	1398
$\text{Ca}(L\text{-GluH})_2$	3422	3046	2100	1566	1518	1410

Donde: v. t = vibración de tensión, δ = vibración de deformación,

En este caso la banda de COO^- de 1642 en el aminoácido libre, se desplaza a 1566 en el complejo de calcio, este desplazamiento es una prueba de que la interacción del ion calcio se da por los carboxilos del aminoácidos.

Por otra parte al hacer la comparación de la forma de los espectros del ácido libre, su sal monosódica, y el complejo obtenido de calcio, ver Figura 2.7. Se puede observar que el espectro del complejo de calcio presenta mayor similitud con el del glutamato monosódico, ya que ambos presentan una banda ancha al rededor de 3400, la cual se asigna a las sales de sodio de los aminoácidos, esto

es consistente con la fórmula propuesta para el complejo; es decir se encuentra presente la especie L-GluH⁻

Figura 2.7 Espectros de Infrarrojo mediano de: L-GluH₂, Na(L-GluH)•H₂O y Ca(L-GluH)₂

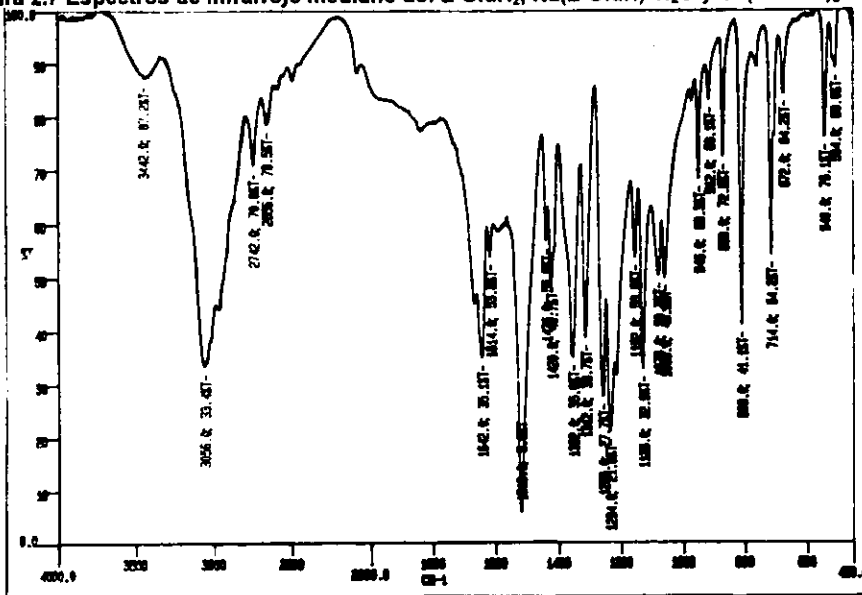


Figura 2.7a IR de L-GluH₂

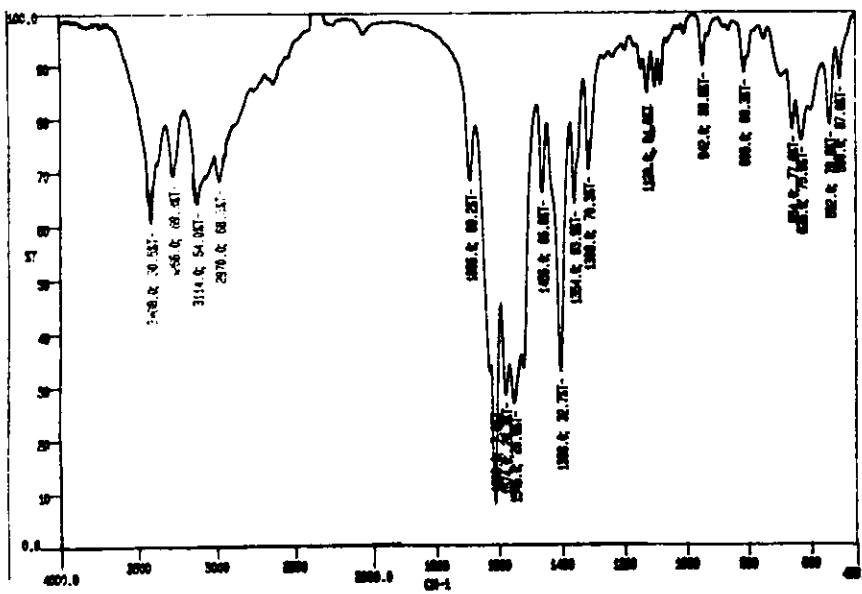


Figura 2.7b IR del Na(L-GluH)•H₂O

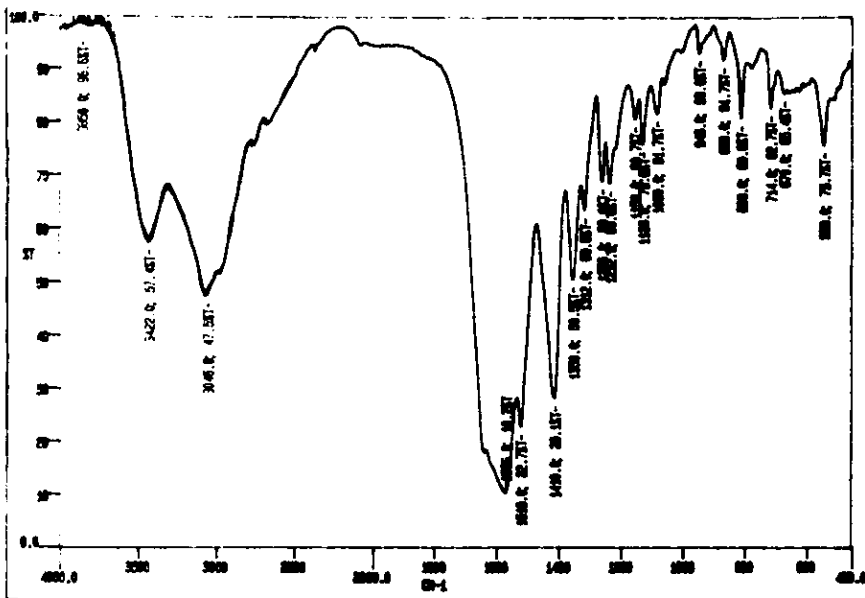


Figura 2.7c IR de $\text{Ca}(\text{L-Glu})_2$

Los resultados de la RMN ^{13}C en estado sólido, presentan detalles interesantes debido a que se esperaban sólo 5 señales correspondientes a cada carbono del ácido glutámico, pero no fue así, como se puede ver en la Tabla 2.9, para el glutamato monosódico se tienen 7 señales y para el complejo de calcio 8. La explicación para las señales de la sal monosódica del ácido glutámico se tiene al saber que en la estructura cristalina, publicada para dicha sal(18), se observan dos diferentes conformaciones que hacen diferente a un COO^- y a un CH_2 . De manera análoga, aunque en este caso no se cuenta con una estructura cristalina que lo avale, se propone que las señales presentes en el espectro del complejo de calcio, se deban a la presencia de una o más conformaciones del L-GluH^+ . Lo anterior se puede considerar como válido al observar la Figura 2.5 de la estructura cristalina del complejo $\text{Ca}(\text{L-Glu})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14), en la cual se pueden ver tres formas distintas de coordinación del aminoácido al metal lo que significa al menos tres diferentes conformaciones que implicarían un mayor número de carbonos con

ambiente químico diferente, por consiguiente más señales en el espectro de resonancia.

Tabla 2.9 Desplazamientos químicos presentes en RMN ^{13}C , en estado sólido a 300MHz

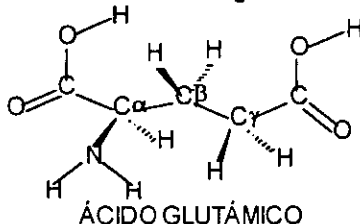
Compuesto	$-\text{CO}_2^- \gamma$, [ppm]	$-\text{CO}_2^- \alpha$, [ppm]	$\text{CH } \alpha$, [ppm]	$\text{CH}_2 \gamma$, [ppm]	$\text{CH}_2 \beta$, [ppm]
L-GluH ₂	182.3	175.6	55.7	34.5	28.1
Na(L-GluH)•H ₂ O	184.0, 183.7, 180.1		55.9	46.5, 42.3, 30.7	
Ca(L-GluH) ₂	182.3,	178.9, 180.4	55.9	40.8, 39.5, 30.4,	28.3

Debido que las señales de los carbonos en la sal de sodio y en el complejo de calcio, presentan desplazamiento, con respecto al ácido glutámico, en la tabla anterior, se hace sólo la clasificación de las señales de acuerdo con el valor del desplazamiento químico. Es decir, por el valor del δ se puede saber que los carboxilos aparecen a bajo campo entre 180 y 205 ppm; y los CH₂ a campo alto de 0 a 100 ppm.

El complejo de calcio presenta dos señales, desplazadas del carboxilo α , lo que indica la interacción del ion calcio con este grupo y la presencia de al menos dos conformaciones. Por otro lado el CH₂ γ , presenta tres diferentes señales lo que también puede deberse a la presencia de al menos tres diferentes conformaciones del aminoácido en el complejo.

Para poder interpretar adecuadamente la tabla 2.9 y los demás resultados que involucran al L-GluH₂, en la Figura 2.8 se muestra la asignación de los carbonos del ácido.

Figura 2.8 Asignación de los carbonos en el ácido glutámico



En los espectros de RMN ^1H se puede observar mayor similitud, en cuanto a desplazamiento químico se refiere, del complejo de calcio con la sal monosódica,

que con el ácido glutámico, estos datos se encuentran en la Tabla 2.10. Lo que sigue siendo consistente con la fórmula propuesta en el A.E.

Tabla 2.10 Desplazamientos químicos en RMN ¹H, solución D₂O, 300MHz.

compuesto	CH, [ppm]	CH ₂ γ, [ppm]	CH ₂ β, [ppm]
L-GluH ₂	3.594	2.338	1.944
Na(L-GluH)•H ₂ O	3.529	2.153	1.869
Ca(L-GluH) ₂	3.533	2.179	1.877

En este trabajo, también se determinaron las constante de formación en medio acuoso de los complejos Ca(L-Glu) y Ca(L-GluH)⁺, usando el método potenciométrico. El tratamiento de datos se hizo con el programa SUPERQUAD. Para tener datos confiables se calcularon los pKa's del ácido glutámico bajo las mismas condiciones experimentales en las que se obtuvieron las constantes de formación de los complejos, los resultados se muestran en las Tablas 2.11 y 2.12

Tabla 2.11 pKa's del ácido glutámico

#	Condiciones	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pHi	pHf
Promedio	25°, μ=0.1(KNO ₃)	2.193	4.164	9.625	2.18	9.5
Publicado (20)	-	2.18	4.2	9.59		

donde: μ= fuerza iónica, pHi = pH inicial, pHf = pH final.

Tabla 2.12 Constantes de formación de los complejos Ca(L-Glu) y Ca(L-GluH)⁺

#	Condiciones	log K _{ML} ^M	log K _{MLH} ^M	pHi	pHf
Promedio	25°, μ=0.1(KNO ₃)	1.9283	11.15155	1.97	9.55
Publicado (22)		2.06	11.12		

Análogamente a lo definido en la Tabla 2.6, en la tabla anterior log K_{ML}^M es el logaritmo de la constante de formación del complejo Ca(L-Glu) y el log K_{MLH}^M el logaritmo de la constante de formación del complejo Ca(L-GluH)⁺.

Conclusiones:

En la estructura cristalina publicada del complejo de calcio, deja como antecedente que el calcio y el L-GluH_2 pueden interaccionar por los dos carboxilos, el grupo amino y no necesariamente del mismo aminoácido, puesto que, como se aprecia en la estructura cristalina, los grupos carboxilos vecinos pueden intervenir para complementar la esfera de coordinación del metal. Por otro lado es importante señalar que en la síntesis del complejo se tiene al grupo amino desprotonado, es decir como R-NH_2 y no como R-NH_3^+ .

Para el complejo Ca(L-GluH)_2 , obtenido en este trabajo, al interpretar su espectro de IR, se sabe que los carboxilos del ácido, intervienen en la interacción con el ion calcio. Además la similitud con el espectro de IR de la sal monosódica del ácido glutámico, confirma la presencia del L-GluH^- , pero no se tienen pruebas contundentes para decidir cuál de los carboxilos es el que participa en la interacción con el metal.

Por otro lado los resultados en RMN^{13}C , indican la presencia de al menos tres conformaciones del L-GluH^- en el complejo. También se aprecia el desplazamiento de las señales del carboxilo α , lo que se puede interpretar como una prueba de la interacción de este grupo con el ion calcio.

Finalmente se cumplió la regla de Pearson, puesto que un ácido duro, como el calcio, reaccionó con una base dura como son los grupos carboxilo.

Con respecto a las constantes de estabilidad calculadas para el ácido glutámico y el ion calcio, se consideran de mayor confiabilidad las constantes obtenida en este trabajo comparada con las reportadas(13) debido a que fue empleado uno de los métodos más confiables y reproducibles (potenciométrico), y a que los datos fueron procesados con un programa comúnmente usado para el cálculo de constantes como es el SUPERQUAD(19). Es decir se usó una técnica más confiable que las empleadas en 1950, 1953 y 1966 (21, 22, 26)

Por otro lado si tomamos la constante $K_{Ca(L-GluH)^+}^{Ca^{2+}} = \frac{[Ca(L-GluH)^+]}{[Ca^{2+}][L-Glu^{2-}][H^+]}$ y la

multiplicamos por $\frac{[Ca(L-GluH)^+]}{[Ca(L-GluH)^+]}$

nos queda $\frac{[Ca(L-GluH)^+]}{[H^+][Ca(L-Glu)]} \times \frac{[Ca(L-Glu)]}{[Ca^{2+}][L-Glu^{2-}]}$ que es equivalente a

$K_{Ca(L-Glu)}^{Ca^{2+}} \times K_a$ del grupo amino en el complejo, esto es, si se hace la resta numérica de los valores del log $K_{Ca(L-GluH)^+}^{Ca^{2+}}$ menos el log $K_{Ca(L-Glu)}^{Ca^{2+}}$ tendremos el valor del pKa del grupo amino en el complejo el cual nos da valiosa información.

$\log K_{Ca(L-GluH)^+}^{Ca^{2+}} - \log K_{Ca(L-Glu)}^{Ca^{2+}} = 11.12 - 2.06 = 9.06$, este valor es ligeramente más pequeño que el pKa del aminoácido libre el cual es de 9.59. El hecho de que se conserve el valor del pKa indica que la presencia del Ca(II) en el sistema no interfiere con el grupo amino. En otras palabras el grupo amino no interacciona de manera significativa con el Ca(II).

C) Pb(L-Asp)

a) Trabajos previos

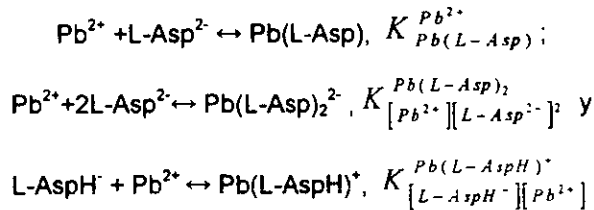
Las constantes de estabilidad publicadas para este complejo se muestran en la Tabla 2.13(13).

Tabla 2.13 Constantes de formación del los complejos Pb(L-Asp), Pb(L-Asp)₂²⁺, Pb(L-AspH)⁺

Metal	Método	Condiciones	$\log K_{ML}^M$	$\log K_{[ML]L}^{ML_2}$	$\log K_{[LH][M]}^{MLH}$	referencia
Pb ²⁺	pol	25°, μ=0.3, (NaClO ₄)	6.00	-	-	(25)
Pb ²⁺	pot	25°, μ=3.0, (NaClO ₄)	6.67	9.4	5.61	(27)

En la tabla anterior los logaritmos de las constantes se refieren a los equilibrios:

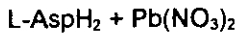
En la tabla anterior los logaritmos de las constantes se refieren a los equilibrios:



Para este complejo no se encontró publicada estructura cristalina.

b) Este Trabajo

En este trabajo se sintetizó un complejo usando los siguientes reactivos



después de varios meses se logró aislar un sólido blanco transparente, poco soluble en H₂O, al cual se le practicaron los análisis necesarios para su caracterización, obteniendo los siguientes resultados:

Por análisis elemental se tiene:

Tabla 2.14 Análisis elemental de Pb₂(L-AspH)(L-Asp)NO₃

Pb ₂ (L-AspH)(L-Asp)NO ₃						
Fórmula	%C	%H	%N	%C	%H	%N
	Teórico	Teórico	Teórico	Experimental	Experimental	Experimental
Pb ₂ C ₈ H ₁₁ O ₁₁ N ₃	12.99	1.5	5.68	13.19	1.58	5.98

En IR mediano, las bandas características de aminoácido(23), fueron identificadas y se muestran en la Tabla 2.15

Tabla 2.15 Principales bandas en IR, de L-AspH₂, Na(L-AspH)•H₂O y Pb(L-AspH)(L-Asp)NO₃

Grupo funcional	Sal de sodio	NH ₃ ⁺ •OH v.t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ v.t. [cm ⁻¹]	COO ⁻ v.t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ δ, [cm ⁻¹]	COO ⁻ v.t. [cm ⁻¹]	NO ₃ ⁻ [cm ⁻¹]
Tipo de banda	ancha	ancha	sobre tono	fin a e intensa	fin a	fin a	ancha e intensa
L-AspH ₂	-	3008	2085	1692	1516	1422	
Na(L-AspH)•H ₂ O	3376	3060	-	1648	1510	1414	
Pb ₂ (L-AspH)(L-Asp)NO ₃	3440	3136	-	1620	1552*		1384

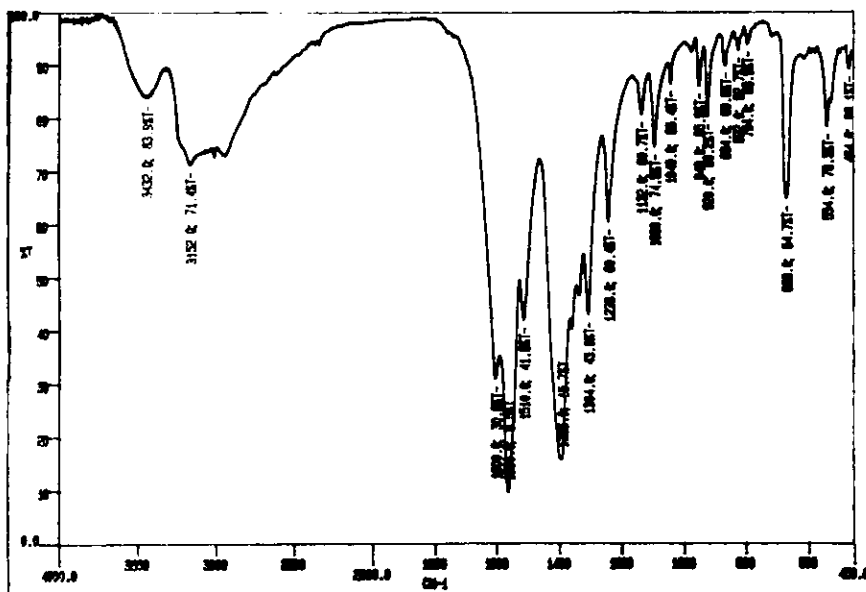
Donde: v. t =vibración de tensión, as = asimétrico, δ =vibración de deformación. * hombro de la banda 1620

De la tabla anterior se puede decir que hubo un desplazamiento hacia menor energía de la señal del carboxilo de 1692, en el L-AspH₂, a 1620 en el complejo de plomo, lo que sugiere que la unión del plomo con el aminoácido se lleva a cabo por alguno de los grupos carboxilo. Por otro lado también se aprecia mayor similitud entre los espectros del complejo de plomo y el aspartato monosódico, lo que es congruente con lo propuesto por el análisis elemental, es decir se encuentra la especie L-AspH⁻.

Además está presente un ion nitrato, que de acuerdo con el valor de la longitud de onda, se encuentra fuera de la esfera de coordinación del plomo.

En la Figura 2.9 se muestra el espectro del complejo Pb₂(L-AspH)(L-Asp)NO₃

Figura 2.9 IR mediano de Pb₂(L-AspH)(L-Asp)NO₃



El espectro de RMN ¹³C del complejo de plomo se comparó con el del ácido aspártico, la sal monosódica de éste y el complejo aislado de plomo, observándose en primer lugar la presencia mayor número de señales, las cuales se pueden explicar por la existencia de al menos dos conformaciones para el L-AspH⁻ en el complejo de plomo y en segundo lugar un desplazamiento de las

señales de este mismo hacia bajo campo. Lo anterior nos permite suponer que en la interacción del Pb(II) con L-Asp²⁻ y L-AspH⁻, los grupos carboxilos participan, ver Tabla 2.16.

Tabla 2.16 Desplazamientos químicos en RMN ¹³C, 300MHz, en estado sólido.

Compuesto	-CO ₂ ⁻ β, [ppm]	-CO ₂ ⁻ α, [ppm]	-CH, [ppm]	-CH ₂ , [ppm]
Na(L-AspH)•H ₂ O	174.24	174.24	48.901	34.852
L-AspH ₂	176.381	175.263	54.189	38.295
Pb ₂ (L-AspH)	176.512	181.665	55.083	42.055
(L-Asp)NO ₃		180.401		40.403

El espectro de RMN ¹H del complejo tiene poca resolución debido a que es casi insoluble en H₂O, pero la integración permite asignar los desplazamientos químicos, como se muestra en la Tabla 2.17. En este caso sólo se compara con el ácido aspártico debido a que el complejo no presenta un sistema ABX, como el aspartato monosódico.

Tabla 2.17 Desplazamientos químicos en RMN ¹H, 300MHz, en solución D₂O.

Compuesto	CH, [ppm]	CH ₂ , [ppm]
L-AspH ₂	3.824	2.759
Pb ₂ (L-AspH)(L-Asp)NO ₃	3.828	2.594

Conclusiones:

De acuerdo con los resultados de IR se concluye la interacción de los L-AspH⁻ y L-Asp²⁻ con el plomo es por medio de los carboxilos, esto se confirmó por los resultados de RMN ¹³C, en los que se ve un desplazamiento en las señales del carboxilo α, lo que sugiere que la interacción con el ion metálico se lleva a cabo por este carboxilo. Lo que se esperaba puesto el plomo en su calidad de ácido intermedio es capaz de unirse a bases duras como los grupos carboxilo.

D) Pb(L-Glu)

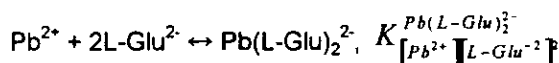
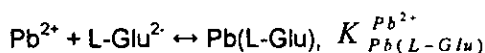
a) Trabajos previos

Las constantes de formación publicadas para este complejo se enlistan en la Tabla 2.18

Tabla 2.18 Constantes de formación de los complejos Pb(Glu), Pb(Glu)₂²⁻

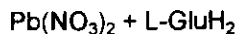
Metal	Método	Condiciones	$\log K_{ML}^{ML}$	$\log K_{[ML]L}^{ML_2}$	Referencia
Pb ²⁺	pot.	25°, $\mu=0.3$, (NaClO ₄)	4.70		(24)
Pb ²⁺	pot	25°, $\mu=0.3$, (NaClO ₄)	-	7.55	(27)

La tabla anterior representa a los equilibrios:



b) Este trabajo

En este trabajo se sintetizó un complejo a partir de:



Al igual que los anteriores se llevó varios meses para poder aislar un polvo blanco transparente, al cual se le hicieron los siguientes análisis para su caracterización.

En el análisis elemental se esperaba la fórmula propuesta en la Tabla 2.19, pero los porcentajes de error son muy elevados, por lo que se intentaron diferentes estequiometrías sin éxito alguno. Por lo antes mencionado se concluye que el complejo tiene una estequiometría compleja, difícil de determinar, o está impuro o hay una mezcla. Sin embargo, como se verá más adelante, el complejo existe pues en los espectros obtenidos se aprecian los cambios entre este y el L-GluH₂.

Tabla 2.19 Análisis Elemental del complejo aislado

Pb(L-GluH)NO ₃						
Fórmula	%C	%H	%N	%C	%H	%N
	Teórico	Teórico	Teórico	Experimental	Experimental	Experimental
PbC ₅ H ₉ O ₇ N ₂	14.42	2.18	6.73	12.88	1.13	7.18

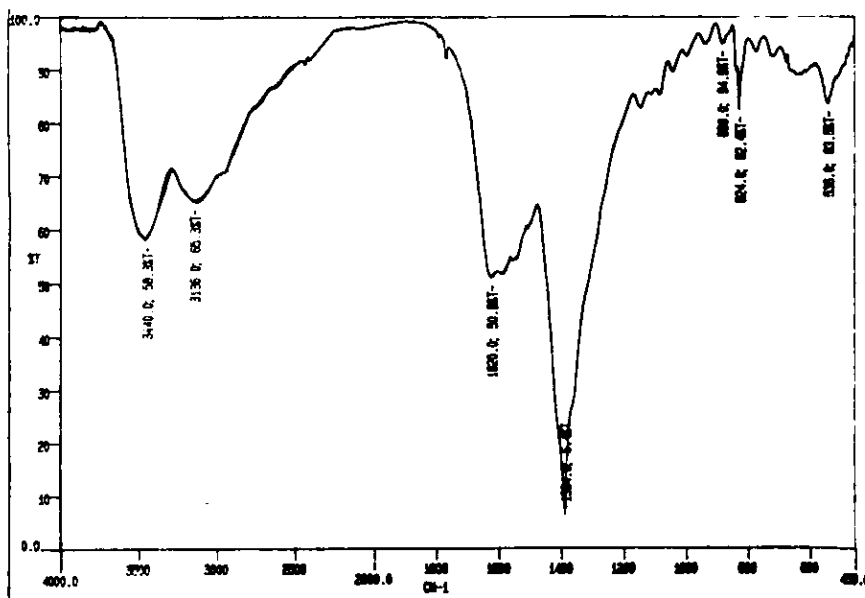
En IR mediano, se identificaron las bandas características de los grupos funcionales de aminoácidos las cuales se muestran en la Tabla 2.20.

Tabla 2.20 Bandas en el IR de: L-GluH₂, Na(L-GluH)•H₂O y el complejo con Pb(II).

Grupo funcional	Sal de sodio	NH ₃ ⁺ , OH, v. t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , v. t. [cm ⁻¹]	COO ⁻ , v. t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ δ, [cm ⁻¹]	COO ⁻ , v. t. [cm ⁻¹]	NO ₃ ⁻ , [cm ⁻¹]
Tipo de banda	ancha	ancha	sobre tono	fina e intensa	fina	fina	ancha e intensa
L-GluH ₂	-	3056	2080	1642	1518	1350	
Na(L-GluH)•H ₂ O	3408	3114	2082	1600	1546	1398	
Complejo de Pb(II)	3432	3152	-	1620	1580		1386

Del espectro del complejo de plomo (ver Figura 2.10), se logra ver el desplazamiento de la banda de COO⁻ de 1642, del ácido libre, a 1620, en el complejo de plomo, lo que se puede interpretar como una interacción del ion plomo con este grupo. También se aprecia la presencia de NO₃⁻ en 1386 y por el valor de la longitud de onda se puede decir que está fuera de la esfera de coordinación.

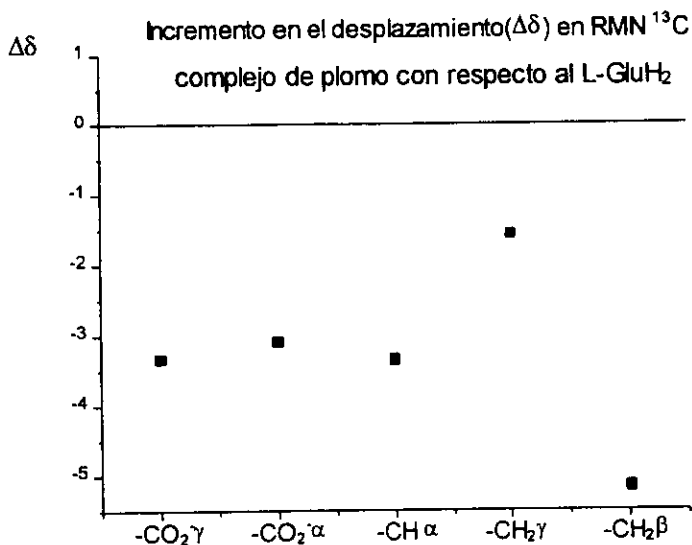
Figura 2.10 IR mediano del complejo del L-GluH₂ con Pb(II)



El espectro de RMN ^{13}C del complejo de plomo muestra las 5 señales esperadas para los carbonos, y al compararlas con las señales del ácido glutámico, se ve un cambio en el desplazamiento químico de los carboxilos del complejo de plomo con respecto a los del ácido libre. ($\Delta\delta$), para apreciar mejor estos cambios se muestra la Gráfica 2.2

Tabla 2.21 Desplazamientos químicos presentes en la RMN ^{13}C , 300MHz, en estado sólido.

Compuesto	$-\text{CO}_2^- \gamma$, [ppm]	$-\text{CO}_2^- \alpha$, [ppm]	$\text{CH} \alpha$, [ppm]	$\text{CH}_2 \gamma$, [ppm]	$\text{CH}_2 \beta$, [ppm]
L-GluH ₂	182.3	175.6	55.7	34.5	28.1
Na(L-GluH)•H ₂ O	184.023, 183.759	180.145	55.992	46.556 42.273	30.725
Complejo de Pb(II)	178.966	172.524	52.364	32.942	22.939



Gráfica 2.2

De la gráfica anterior se puede inferir que ambos carboxilos interaccionan con el ion plomo debido a que todos los carbonos presentes sufrieron un cambio en el desplazamiento químico.

En RMN ^1H no se observan cambios significativos, como se puede observar en la Tabla 2.22.

Tabla 2.22 Desplazamientos químicos en RMN ¹H, 300MHz, en solución D₂O

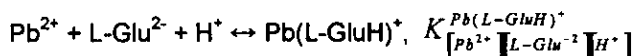
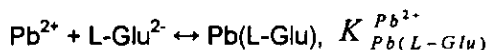
compuesto	CH _α , [ppm]	CH ₂ γ, [ppm]	CH ₂ β, [ppm]
L-GluH ₂	3.594	2.338	1.944
Na(L-GluH)•H ₂ O	3.529	2.153	1.869
Complejo de Pb(II)	3.584	2.161	1.908

Para este complejo también se determinó la constante de estabilidad y se muestran los resultados en la Tabla 2.23.

Tabla 2.23 Constantes de formación, de los complejos Pb(L-Glu) y Pb(L-GluH)⁺

#	Condiciones	log K _{ML} ^M	log K _{[M][L][H]} ^{MLH}	pHi	pHf
Promedio	25°, μ=0.1(KNO ₃)	5.2669	11.95777	2.4	6.6
Reportado(24)	25°, μ=0.3(NaCl ₄)	4.70	-		

En la tabla anterior se pueden ver los valores de las constantes de formación para los equilibrios:



Análogamente a lo que se hizo con las constantes de calcio, se hace la resta de los logaritmos de las constantes, para obtener el valor del pKa del grupo amino en el complejo.

$\log K_{Pb(L-GluH)^+}^{Pb^{2+}} - \log K_{Pb(L-Glu)}^{Pb^{2+}} = 11.95777 - 5.2669 = 6.69087$, en este caso el valor es menor (pKa₃=9.59), lo que indica que el grupo amino se vuelve menos básico con la presencia del plomo, lo que implica la intervención de dicho grupo en la interacción con el metal.

Conclusiones:

En base a los resultados en IR se puede decir que en el enlace, en el complejo de plomo, participan los grupos carboxilo, aunque no es posible conocer más detalles.

En cuanto a RMN ^{13}C se refiere, los resultados confirman la interacción del ion plomo con ambos grupos carboxílicos. Lo antes mencionado sólo confirma la capacidad que tiene el plomo como ácido intermedio, para unirse a bases duras.

Por otro lado, de acuerdo a los valores de las constantes de formación de cada complejo se observa que el ion plomo es más afín al ácido glutámico que el ion calcio. Además de que gracias al pKa del amino en el complejo se sabe que este grupo interviene en la interacción con el ion plomo.

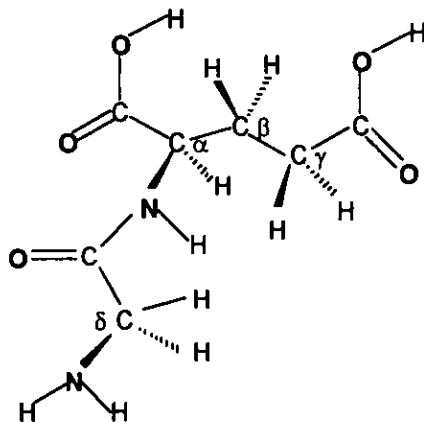
La variación entre el valor reportado de la constante de formación del complejo Pb(L-Glu) y el valor obtenido, no se toma en consideración debido a que se confía plenamente en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que como se había mencionado antes el método potenciométrico proporciona datos confiables y reproducibles.

CAPÍTULO III

INTERACCIÓN DE LOS IONES Ca(II) Y Pb(II) CON EL DIPÉPTIDO GliGlu

El dipéptido GliGluH₂ que se muestra en la Figura 3.1 es un ligante, que cuenta con el N y O del enlace peptídico, un grupo NH₂, y dos residuos ácidos, como posibles sitios de coordinación. Por el tipo de átomos que presenta para unirse se puede clasificar como una base dura, lo que implica una gran afinidad por un ácido duro como el Ca(II) y en menor medida por un ácido intermedio como el Pb(II).

Figura 3.1 Estructura del dipéptido GliGluH₂



Los átomos en negritas son los que potencialmente pueden intervenir en un enlace de coordinación.

Para este dipéptido se encontraron publicados en la literatura los valores de los pKa's y un estudio de constantes de formación para complejos con cobre(II), (29).

Al comparar los valores de los pKa's del ácido glutámico y del dipéptido, ver Tabla 3.1, se observan cambios en los tres pKa's. Los dos primeros pKa's tienen un incremento, en el valor numérico, lo que implica una acidez menor, y el tercer pKa se vuelve menor, lo que significa una mayor fuerza ácida.

Para explicar esta variación en los pKa's se presenta la Figura 3.2; en donde se muestran las especies químicas presentes en los diferentes equilibrios ácido-base del ácido glutámico. En el primer equilibrio la formación del zwitterión favorece la desprotonación del carboxilo α; esto no se encuentra en el dipéptido ya que, el que

antes era el amino α se encuentra ahora formando un enlace peptídico, y el grupo amino libre del GliGluH₂ se localiza a mayor distancia y aunque finalmente se forma el zwitterión la acidez del antes carboxilo α , disminuye.

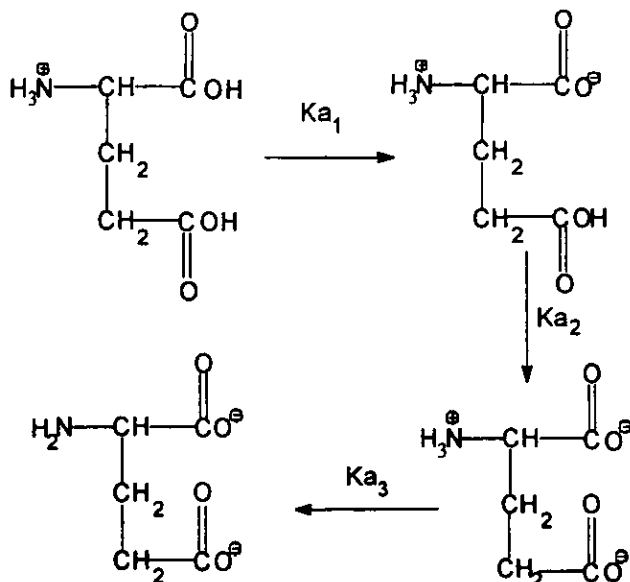
En lo que se refiere al carboxilo γ , también se ve una disminución de la fuerza ácida en el dipéptido, pero menor que el anterior, esto se explica debido a que la carga positiva del zwitterión ahora esta más alejada, que en el ácido glutámico.

Finalmente la disminución en la basicidad del grupo amino se explica por la vecindad de éste a un enlace peptídico.

Tabla 3.1 Variaciones en los pKa's de GliGlu con respecto al L-GluH₂

Compuesto	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
L-GluH ₂ (20)	2.18	4.2	9.59
GliGlu (29)	2.86	4.36	8.27
Δ	0.68	0.16	-1.32

Figura 3.2 Equilibrios ácido-base del ácido glutámico



Como se vio en la comparación anterior el ácido glutámico, sirve como una buena referencia para poder saber los cambios que ocurren al tener el dipéptido, es por ello que se usan al L-GluH₂ y los complejos aislados de calcio y plomo respectivamente para interpretar los resultados obtenidos en la síntesis de los complejos de Ca(II) y Pb(II) con GliGlu, que se presentan a continuación:

A) Ca(II) + GliGluH₂

En el presente trabajo se obtuvo un complejo a partir de la siguiente ruta de síntesis:

CaCO₃+ GliGluH₂ y gotas de HCl (0.1N) para solubilizar el carbonato.

A la mezcla de reacción se le adicionó alcohol metílico para precipitar el complejo, obteniéndose un polvo blanco, al cual se le practicaron pruebas para su caracterización con los siguientes resultados:

Análisis elemental

Tabla 3.2 Análisis elemental para Ca(GliGluH)Cl•MeOH

Ca(GliGluH)Cl•MeOH						
Fórmula	%C Teórico	%H Teórico	%N Teórico	%C Experimental	%H Experimental	%N Experimental
CaC ₈ H ₁₅ N ₂ O ₆ Cl	32.65	4.7	9.523	32.43	4.41	9.53

En los espectros de IR mediano se asignan las señales para los grupos funcionales del dipéptido y el complejo aislado de calcio, las cuales se muestran en la Tabla 3.3

Tabla 3.3 Principales bandas en el IR mediano, del L-GluH₂, Ca(L-GluH)₂, GliGluH₂ y Ca(GliGluH)Cl•MeOH

Grupo funcional	N-H, [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , OH v. t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , v. t. [cm ⁻¹]	HN-C=O, [cm ⁻¹]	COO ⁻ , v.t. [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , δ, [cm ⁻¹]	COO ⁻ , v.t. [cm ⁻¹]
Tipo de banda	fina e intensa	ancha e intensa	sobre tono	fina e intensa	fina e intensa	fina	fina
L-GluH ₂	-	3056	2080	-	1642	1518	1350
Ca(L-GluH) ₂		3046	2100	-	1566	1518	1410
GliGluH ₂	3334	3070	-	1734	1680	1552	1404
Ca(GliGluH)Cl•MeOH	3410	3269 hombro	-	1674	1562	-	1408

Donde: v. t.=vibración de tensión, as = asimétrico, δ =vibración de deformación.

Como se observa en la tabla anterior la señal del COO^- se une con la de NH_3^+ , lo que puede interpretarse como una interacción de los carboxilos con los iones Ca(II) , ya que al unirse el carboxilo al ion la banda se desplaza a menor energía.

Existen otras variaciones en cuanto a la forma del espectro, por ejemplo en el espectro del dipéptido se ve una banda fina en 3334, la cual se puede asignar a vibraciones del enlace N-H, esta banda en el complejo de calcio se encuentra oculta por una banda ancha del enlace O-H del metanol. Esta banda confirma la presencia del MeOH en el complejo que concuerda con lo propuesto en el análisis elemental $\text{Ca(GliGluH)Cl}\cdot\text{MeOH}$.

En general el espectro del complejo de calcio presenta bandas más anchas y por ello menos señales, lo que habla finalmente de la presencia del ion Ca(II) . Para poder apreciar estos cambios se presenta la Figura 3.3 en donde se muestran el espectro del dipéptido y el del complejo de calcio.

Figura 3.3 Espectro de Infrarrojo mediano del $\text{Ca(GliGluH)Cl}\cdot\text{MeOH}$

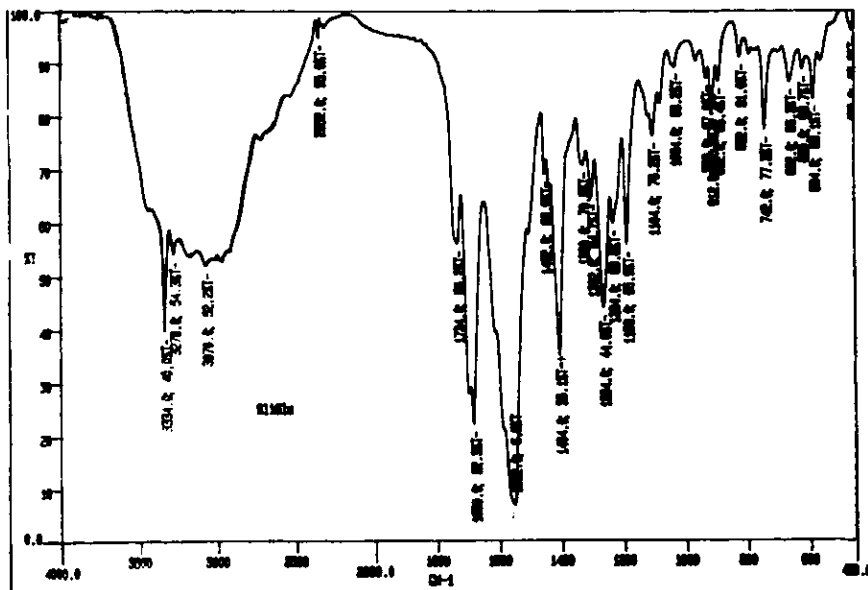


Figura 3.3a Espectro de IR mediano del dipéptido GliGluH_2

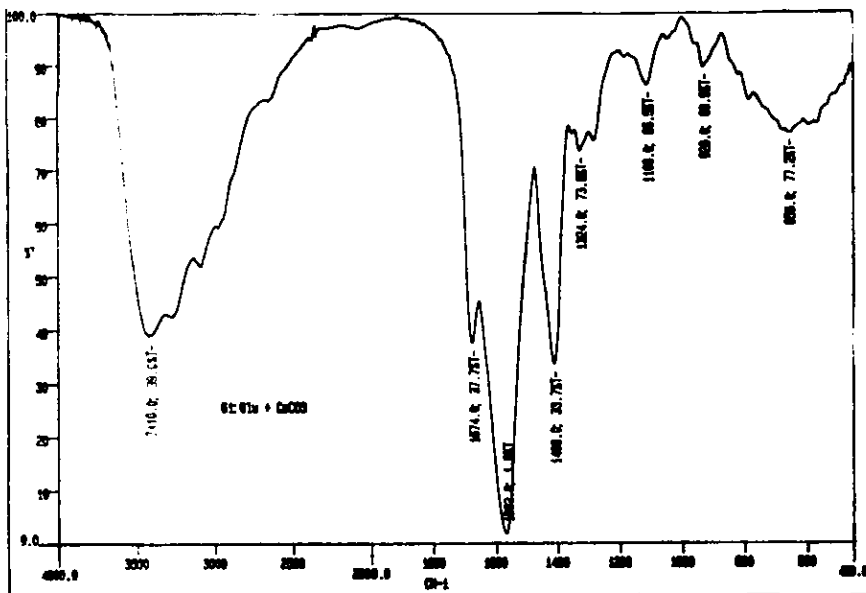


Figura 3.3b Espectro de IR mediano del $\text{Ca}(\text{GliGluH})\text{Cl}\cdot\text{MeOH}$

En los espectros de RMN ^{13}C , se observan 12 señales para el dipéptido, que son más de las esperadas, ya que por simple inspección se tienen sólo 7 carbonos diferentes, sin embargo, si consideramos el posible equilibrio ceto-enol presente en el enlace peptídico, se tendría una señal diferente para el carbono δ del enlace peptídico, el $\text{CH}_2\delta$, el $\text{CH}\alpha$ y el $\text{COO}^-\alpha$. Para comprobar lo antes mencionado, se empleo el programa ACD/Labs que permite simular espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C dando los desplazamientos químicos del compuesto dibujado, los resultados se muestran en la Figura 3. 4.

Otra alternativa sería calcular, con un programa de cómputo adecuado, los confómeros más estables del dipéptido y una vez obtenidos calcular, con otro programa especializado, el espectro de resonancia, lo que seguramente nos daría una mejor aproximación al espectro experimental. Esto queda fuera del alcance de este trabajo.

Figura 3.3 Espectros simulados y experimental de RMN ^{13}C del GluGluH₂

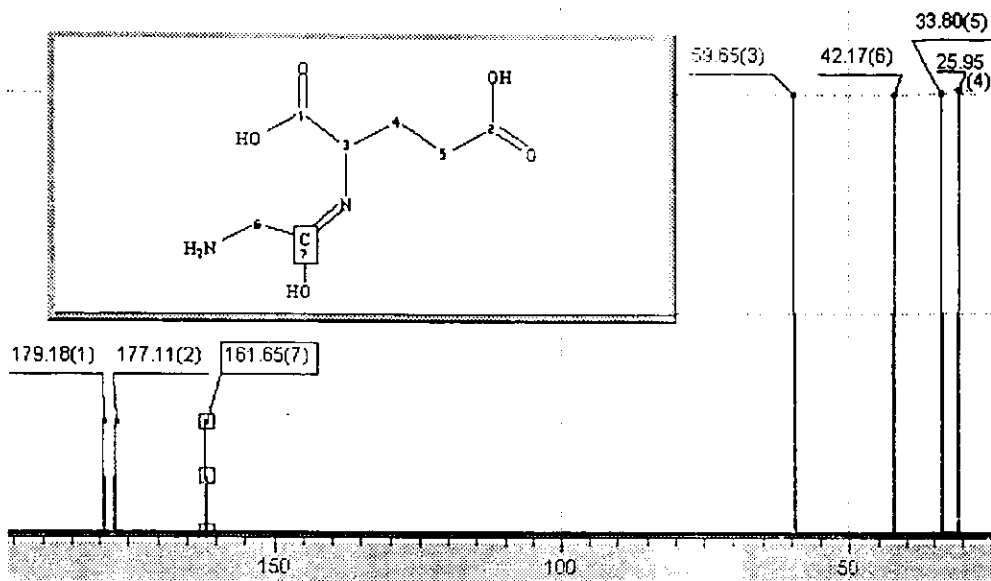


Figura 3.4a Simulación del espectro de RMN ^{13}C del dipéptido GluGluH₂ en su forma enólica

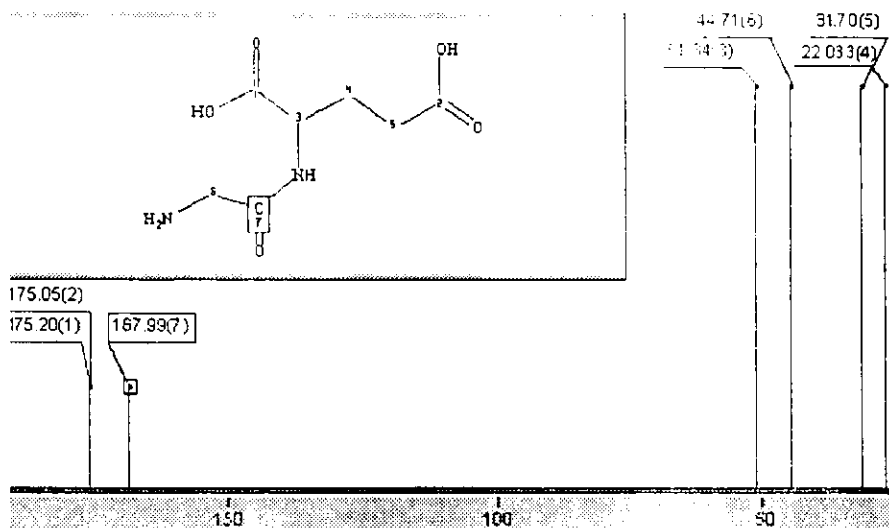


Figura 3.4b Simulación del espectro de RMN ^{13}C del dipéptido GluGluH₂ en su forma cetónica

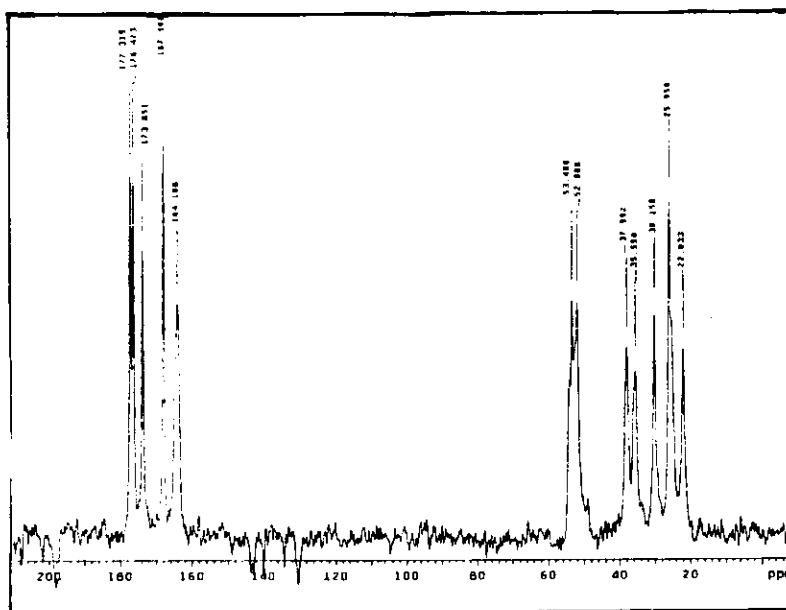


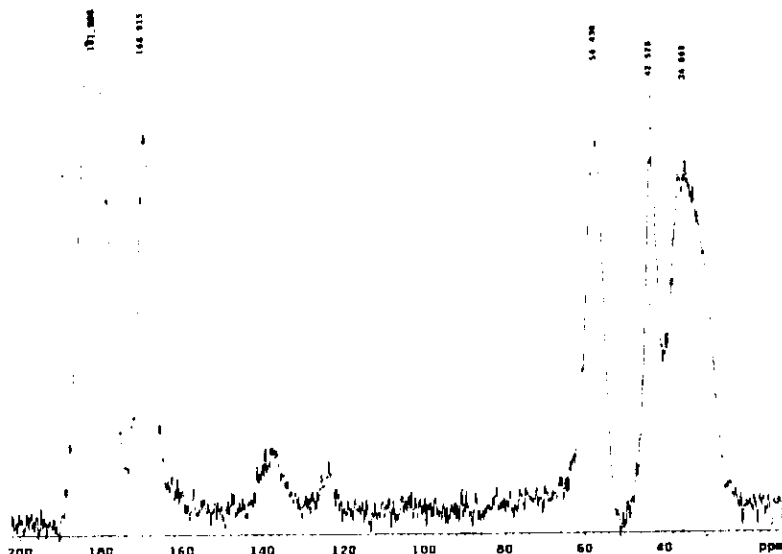
Figura 3.4c Espectro experimental de RMN ^{13}C del dipéptido GliGluH₂, en estado sólido

Para el complejo obtenido de calcio, se observan 6 señales en lugar de las 7 esperadas, debido a la presencia de sólo una señal para los carboxilos, esto indica que tienen ambientes químicos similares, ver Figura 3.5. Las señales y sus asignaciones se muestran en la Tabla 3.4

Tabla 3.4 Desplazamientos químicos en RMN ^{13}C , 300MHz, en estado sólido.

Compuesto	$-\text{CO}_2^- \gamma$ [ppm]	$-\text{CO}_2^- \alpha$ [ppm]	$-\text{C}=\text{O}$, [ppm]	$\text{CH}\alpha$, [ppm]	$\text{CH}_2\gamma$, [ppm]	$\text{CH}_2\beta$, [ppm]	$\text{CH}_2\delta$, [ppm]
L-GluH ₂	182.3	175.6	-	55.7	34.5	28.1	-
GliGluH ₂	176.4, 173.8	177.3, 173.8	167.96 164.10	53.4 52.0	35.59 30.15	25.95 22.03	37.99
Ca(GliGluH) Cl•MeOH	181.0		168.91	56.43	34.06,		42.52
Ca(L-GluH) ₂	182.3 180.4	178.9	-	55.99	40.81 39.45	30.43 28.29	-

Figura 3.5 Espectro de RMN ¹³C del complejo Ca(GliGluH)Cl•MeOH



En el espectro de RMN ¹H del complejo de calcio aislado se puede observar la presencia de CH₃ del metanol, lo que confirma la fórmula propuesta por análisis elemental. También se logra ver un desplazamiento a campo alto del CH₂ δ y del CH₂ γ. Esto confirma que existe una interacción entre el dipéptido y el Ca(II).

Tabla 3.5 Desplazamientos químicos presentes en RMN ¹H, 300MHz, en solución D₂O.

Compuesto	CH ₂ δ, [ppm]	CHα, [ppm]	CH ₂ γ [ppm]	CH ₂ β [ppm]	CH ₃ [ppm]
GliGluH ₂	3.64	4.06	2.22	1.84	-
Ca(L-GluH)	-	3.533	2.179	1.877	-
Ca(GliGluH) Cl•MeOH	3.64	3.98	2.06	1.8	3.14

En este trabajo, también se determinaron las constante de formación en medio acuoso de los complejos Ca(GliGlu) y Ca(GliGluH)⁺, usando el método potenciométrico. El tratamiento de datos se hizo con el programa SUPERQUAD. Para obtener los datos de las constantes mencionadas en el párrafo anterior se determinaron los valores de los pKa's del dipéptido, a diferentes concentraciones,

manteniendo la fuerza iónica, y temperatura constantes; los resultados se muestran en la Tabla 3.6

Tabla 3.6 pKa's del dipéptido GliGluH₂

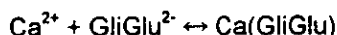
	Condiciones	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
Promedio	25°, μ=0.1 (KNO ₃)	3.0634	4.5293	8.3477
Publicado (29)	25°, μ=0.2 (KCl)	2.86	4.36	8.27

Las constantes de formación de los complejos se calcularon también a distintas concentraciones obteniéndose los resultados contenidos en la Tabla 3.7

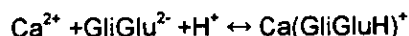
Tabla 3.7 Comparación de constantes de formación calculadas de los complejos Ca(GliGlu), Ca(GliGluH)⁺ contra las constantes publicadas para los complejos Ca(L-Glu) y Ca(GluH)⁺

	Condiciones	log K _{ML} ^M	log K _{MLH} ^M
Promedio	25°, μ=0.1(KNO ₃)	2.8572	11.2828
L-GluH ₂ + Ca ²⁺ (22)	25°, μ=0.1(KNO ₃)	1.92	11.15

Donde $\log K_{ML}^M = \log K_{Ca(GliGlu)}^{Ca^{2+}}$, que representan al siguiente equilibrio:



Y $\log K_{MLH}^M = \log K_{Ca(GliGluH)^+}^{Ca^{2+}}$, el cual representa el logaritmo de la constante del equilibrio:



Nuevamente se realiza la resta de los logaritmos de las constantes para conocer el valor del pKa del grupo amino en el complejo.

$\log K_{Ca(GliGluH)^+}^{Ca^{2+}} - \log K_{Ca(GliGlu)}^{Ca^{2+}} = 11.2828 - 2.8572 = 8.4256$, este valor es ligeramente mayor al reportado que es de 8.27 pero no significativamente como para poder inferir algo de ello.

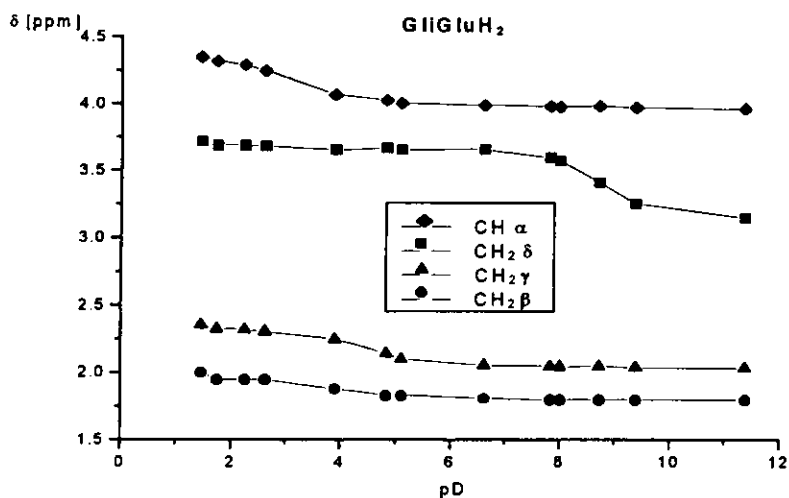
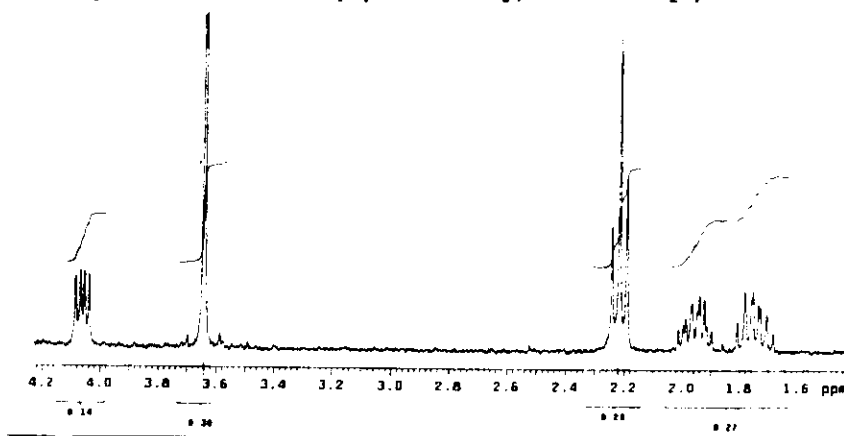
El valor de la constante de formación del complejo de calcio y el dipéptido es ligeramente mayor que la del complejo con el ácido glutámico.

Para complementar este estudio y en busca de mayor información sobre la interacción del ion Ca(II) con el dipéptido, se hicieron las curvas de valoración, con sosa deuterada, por RMN ^1H (300MHz) del péptido y el péptido + Ca(II) .

En la Figura 3.6 se muestra uno de los espectros obtenidos en este experimento.

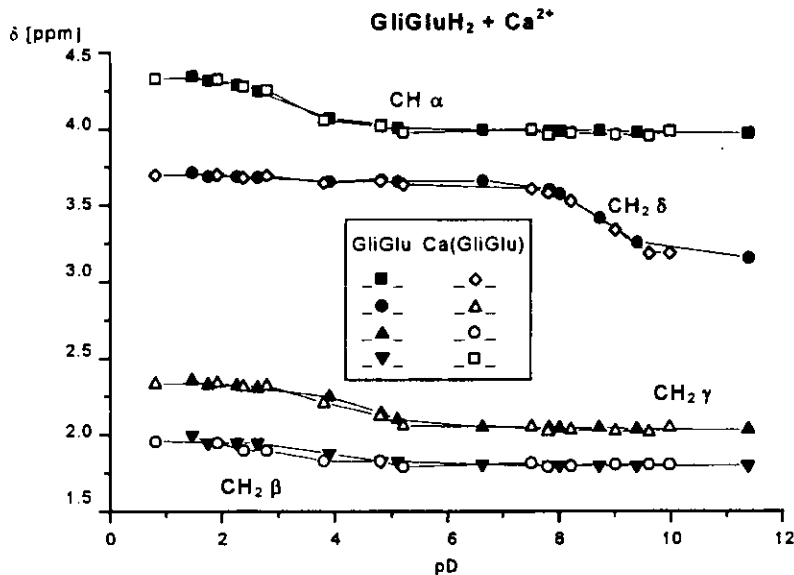
Los datos recabados en cada espectro se muestran en las Gráficas 3.1 y 3.2.

Figura 3.6 Espectro de RMN ^1H del dipéptido GliGluH_2 , en solución D_2O , 300MHz.



Gráfica 3.1

En la gráfica 3.1 se pueden distinguir los cambios en el desplazamiento químico debido a los cambios de pD, que coinciden con los valores de los pKa 's del GliGluH_2 .



Gráfica 3.2

En la gráfica 3.2 se pueden observar pequeños cambios en los desplazamientos químicos (δ) del CH₂ γ y lo que implica que la interacción del catión se lleva a cabo por el carboxilo γ .

El hecho que los desplazamientos químicos del CH y el CH₂ δ no varíen, es un indicativo de que los cambios observados no son debidos a errores experimentales o instrumentales.

Conclusión

La interacción del dipéptido con el Ca(II) es mayor que con el ácido glutámico, y se lleva a cabo, según lo observado, por medio de los oxígenos de los carboxilos. Lo que concuerda con la regla de Pearson, ácidos duros como los iones Ca(II), con bases duras, como los carboxilos.

De acuerdo con el valor del pKa del grupo amino en el complejo, no hay interacción del grupo amino con el ion calcio.

B) Pb(II) + GliGluH₂

En este trabajo se sintetizó un complejo a partir de: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{GliGluH}_2$

El complejo se aisló al precipitarlo añadiendo metanol a la mezcla de reacción, se obtuvo un precipitado blanco al cual se le practicaron los siguientes análisis para su caracterización:

Análisis elemental

Tabla 3.8 Análisis elemental del Pb(GliGluH)NO₃

Pb(GliGluH)NO ₃						
Fórmula	%C Teórico	%H Teórico	%N Teórico	%C Experimental	%H Experimental	%N Experimental
PbC ₁₀ H ₁₈ O ₈ N ₂	17.79	2.33	8.89	19.01	2.64	8.71

En el espectro de IR mediano, se identificaron las bandas características de los grupos funcionales del dipéptido las cuales se muestran en la Tabla 3. 9. Las señales importantes que se presentan en el dipéptido con plomo son: la banda de COO⁻ que se desplaza de 1680 en el dipéptido solo, a 1660 en el complejo con plomo, otra de las señales importantes es la del NO₃⁻ en 1388, lo que concuerda con el análisis elemental.

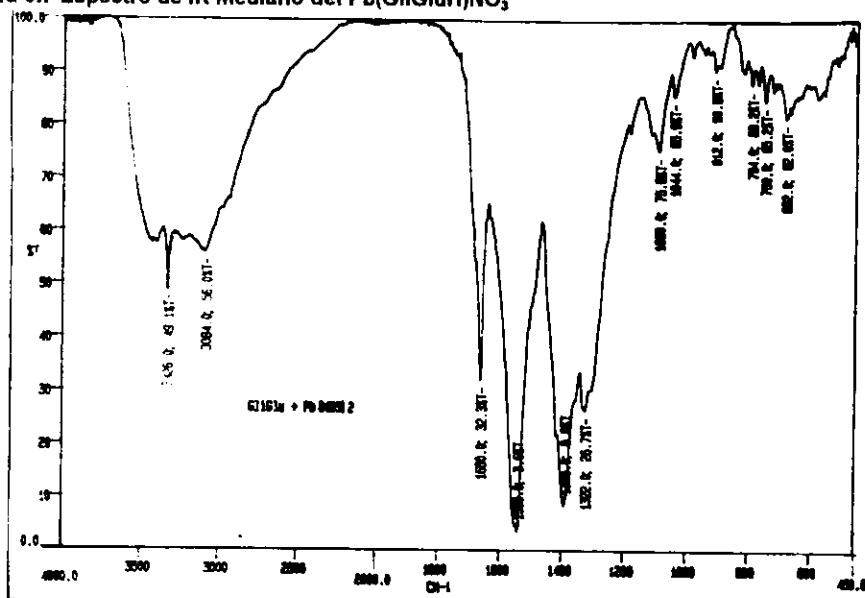
Tabla 3.9 Principales bandas en el IR mediano, del L-GluH₂, GliGluH₂, Pb(GliGluH)NO₃ y el complejo de L-GluH₂ con Pb(II)

Grupo funcional	N-H, [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , OH, v.t. [cm ⁻¹]	HN-C=O, [cm ⁻¹]	COO ⁻ , v.t, [cm ⁻¹]	NH ₃ ⁺ , δ, [cm ⁻¹]	COO ⁻ , [cm ⁻¹]	NO ₃ ⁻ , [cm ⁻¹]
Tipo de banda	fina e intensa	ancha e intensa	fina e intensa	fina e intensa	fina	fina	intensa
L-GluH ₂	-	3056	-	1642	1518	1350	-
Complejo de Pb(II) con L-GluH ₂	-	3152	-	1620	1580	-	1386
GliGluH ₂	3334	3070	1734	1680	1552	1404	-
Pb(GliGluH)NO ₃	3326	3136	-	1660	1538	-	1388

Donde: v. t =vibración de tensión, as = asimétrico, δ =vibración de deformación.

Al igual que con el complejo de Ca el complejo de plomo presenta variaciones en su espectro de IR con respecto al dipéptido libre, y estas son: ensanchamiento de las bandas y disminución de señales. El espectro de Pb(GliGluH)NO₃ se muestra en la Figura 3.7.

Figura 3.7 Espectro de IR mediano del Pb(GliGluH)NO₃



En el espectro de RMN ¹³C del complejo de plomo se ve un desplazamiento de los carboxilos hacia bajo campo; por lo que se puede inferir la interacción de éstos con el metal.

Tabla 3.10 Señales en la RMN ¹³C , 300MHz en estado sólido.

Compuesto	-CO ₂ ⁻ γ [ppm]	-CO ₂ ⁻ α [ppm]	NH-C=O, [ppm]	CHα, [ppm]	CH ₂ γ, [ppm]	CH ₂ β, [ppm]	CH ₂ δ, [ppm]
L-GluH ₂	182.3	175.6	-	55.7	34.5	28.1	-
GliGluH ₂	176.4, 173.8	177.3, 173.8	167.96 164.10	53.4 52.0	35.59 30.15	25.95 22.03	37.99
Pb(GliGluH)NO ₃	184.4, 183.4		167.36	56.13	36.88	31.83	42.81
Complejo de L-GluH ₂ con Pb(II)	178	172	-	52.36	32.94	22.9	

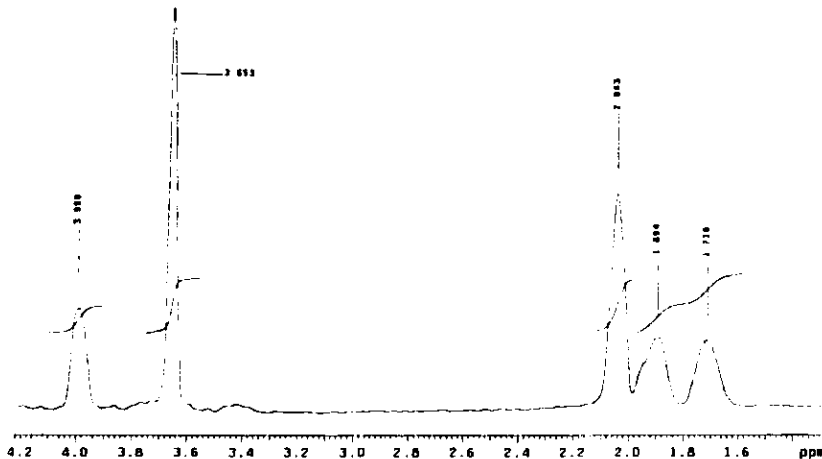
En el espectro de RMN ¹H no se observan cambios significativos, como se aprecia en la Tabla 3.11, pero el espectro pierde resolución comparado con el de GliGluH₂,

Figura 3.8, ya que presenta bandas anchas lo que puede deberse a la mala resolución del equipo.

Tabla 3.11 Desplazamientos químicos presentes en la RMN ^1H , 300MHz, en solución D_2O .

compuesto	$\text{CH}_2\delta$, [ppm]	CH, [ppm]	$\text{CH}_2\gamma$, [ppm]	$\text{CH}_2\beta$, [ppm]
L-GluH ₂	-	3.594	2.338	1.944
Pb(L-GluH)NO ₃	-	3.584	2.161	1.908
GliGluH ₂	4.06	3.64	2.22	1.84
Complejo de L-GluH ₂ con Pb(II)	3.99	3.65	2.043	1.80

Figura 3.8 Espectro de RMN ^1H del complejo Pb(GliGluH)NO₃



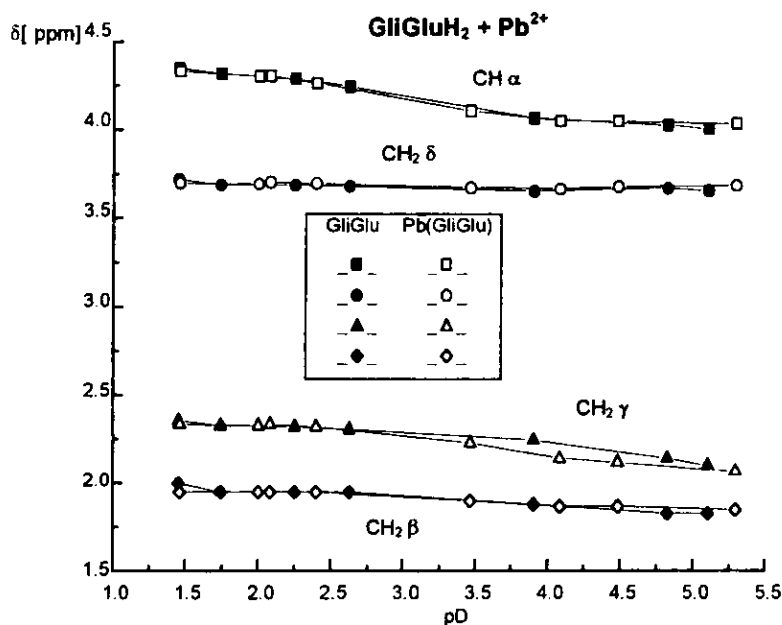
Para este complejo también se realizó el cálculo de la constante de estabilidad, para Pb(GliGlu) y Pb(GliGluH)⁺, se muestran los resultados en la Tabla 3.12

Tabla 3.12 Comparación de las constantes de estabilidad de los complejos Pb(GliGlu) y Pb(GliGluH)⁺, con las constantes calculadas en este trabajo de Pb(L-Glu) y Pb(L-GluH)⁺

	Condiciones	$\log K_{ML}^M$	$\log K_{MH}^M$
promedio	25°, $\mu=0.1(\text{KNO}_3)$	4.4486	10.9537
L-GluH ₂ + Pb ²⁺	25°, $\mu=0.1(\text{KNO}_3)$	5.2669	11.9577

Al restar el valor de la constante de formación del complejo Pb(GliGlu) al de la constante de formación del complejo Pb(GliGluH)⁺, se tiene un pKa para el amino

en el complejo que es de 6.5, es decir que la basicidad del grupo amino disminuye por la presencia del metal, lo que indica interacción del Pb(II) con este grupo. Análogamente a lo realizado para el ion Ca(II), se efectuó la curva de valoración, con sosa deuterada, del sistema GliGluH₂ + Pb(II), por RMN ¹H. Con los resultados del experimento se hizo la Gráfica 3.3.



Gráfica 3.3

En el caso de GliGluH₂ + Pb(II), se ve un mayor cambio en el desplazamiento químico en el CH₂ γ , esto es, se detecta claramente que la interacción se lleva a cabo por el carboxilo γ , en la gráfica 3.3 se puede apreciar que tampoco el CH α y el CH₂ δ tienen variaciones en el desplazamiento químico en presencia del plomo.

Conclusiones:

La evidencia recabada permite suponer que el dipéptido GliGluH₂ se une al Pb(II), por los grupos carboxilo y amino. Esto se puede explicar tomando en consideración que el plomo es un ácido intermedio y por ello puede reaccionar tanto con bases duras, como con bases blandas.

En cuanto a la constante de formación, el complejo del ácido glutámico con plomo presenta una constante mayor que la del complejo con el dipéptido.

Ahora bien comparando los valores de las constantes de formación de los complejos $\text{Ca}(\text{GliGluH})^+$ y $\text{Pb}(\text{GliGluH})^+$, la constante del complejo de plomo es mayor, lo que indica una mayor afinidad entre el GliGluH_2 y el $\text{Pb}(\text{II})$.

Al realizar una valoración ácido base por RMN ^1H del dipéptido y los cationes $\text{Ca}(\text{II})$ y $\text{Pb}(\text{II})$, se confirma que las interacciones principales se llevan a cabo por los grupos carboxilo y en especial por el γ . Además el cambio es mucho más evidente en el $\text{CH}_2 \gamma$, con el ion $\text{Pb}(\text{II})$ que con el $\text{Ca}(\text{II})$, esto se puede interpretar como una interacción mayor del $\text{Pb}(\text{II})$ con el GliGluH_2 , que con $\text{Ca}(\text{II})$.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo, se cumplió con el objetivo general, de contribuir en el estudio de la interacción de los iones Ca(II) y Pb(II) , con la metaloproteína calbindina, ya que se desarrolló la técnica para la determinación de las constantes de estabilidad en solución y quedan como antecedentes, para trabajos posteriores, los datos obtenidos de las pruebas espectroscópicas de los complejos aislados.

En cuanto los objetivos específicos, también se pueden dar por alcanzados, según lo que se propone a continuación:

a) Interacción del ion Ca(II) con L-AspH_2 :

1. De las estructuras cristalinas publicadas para el sistema ácido aspártico ion Ca(II) , se puede inferir que la interacción se da por cualquiera de los grupos propuestos (NH_2 , $-\text{COO}^-\alpha$, $-\text{COO}^-\beta$), siempre y cuando el grupo amino esté desprotonado.
2. En cuanto al complejo obtenido, en la presente tesis, todas las pruebas efectuadas confirman la presencia de la especie L-AspH^- . Por IR y RMN ^{13}C se comprueba que la interacción del ion Ca(II) con el ácido aspártico se lleva a cabo por el carboxilo α .

b) Interacción del ion Ca(II) con L-GluH_2 :

1. La estructura cristalina publicada para el complejo $\text{Ca(L-Glu)} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, permite observar que la interacción del ácido glutámico con el ion calcio se puede llevar a cabo por los grupos: NH_2 , $-\text{COO}^-\alpha$, $-\text{COO}^-\gamma$, con la condición de que el grupo amino se encuentre como NH_2 y no como NH_3^+ .
2. Para el complejo Ca(L-GluH)_2 , su similitud en el espectro de IR con la sal monosódica del ácido glutámico, confirma la presencia del L-GluH^- . Por

otro lado de los resultados obtenidos en RMN ^{13}C se sabe que el carboxilo α participa en la interacción con el ion calcio.

3. El grupo amino del ácido glutámico no interacciona con el ion Ca(II) según el valor del pKa del grupo amino en el complejo.

c) Interacción del ion Pb(II) con L-AspH_2 :

1. Las pruebas efectuadas indican que en $\text{Pb}_2(\text{L-AspH})(\text{L-Asp})\text{NO}_3$, L-AspH^+ y L-Asp^{2-} interaccionan con el plomo por medio del carboxilo α .

d) Interacción del ion Pb(II) con L-GluH_2

1. De los resultados de IR y RMN ^{13}C , se sabe que la interacción del ion plomo con el L-GluH_2 se realiza por medio de los grupos carboxilo.
2. Según el valor de pKa del grupo amino en el complejo, se sabe que el plomo interacciona con este.

e) Interacción del ion Ca(II) con el dipéptido GliGluH_2 :

1. La interacción del dipéptido con el Ca(II) , se lleva a cabo, según lo que las pruebas justifican, por medio de los oxígenos de los carboxilos.
2. De acuerdo con el valor del pKa del grupo amino en el complejo $\text{Ca}(\text{GliGluH})^+$, no hay interacción del grupo amino con el ion calcio.

f) Interacción del ion Pb(II) con el dipéptido GliGluH_2

1. La evidencia obtenida, permite suponer que el dipéptido GliGluH_2 se une al Pb(II) , por los grupos carboxilo y amino.

g) Constantes de estabilidad.

1. La interacción del dipéptido con el Ca(II) es mayor que con el ácido glutámico
2. En cuanto a la constante de formación, el complejo del ácido glutámico con plomo presenta una constante mayor que la del complejo con el dipéptido. Lo que se puede explicar por la formación de anillos más estables con el L-GluH_2 .
3. Comparando los valores de las constantes de formación de los complejos $\text{Ca}(\text{GliGluH})^+$ y $\text{Pb}(\text{GliGluH})^+$, la constante del complejo de plomo es mayor, lo que indica una mayor afinidad entre el GliGluH_2 y el Pb(II) .

h) Otros

1. Generalizando, los complejos aislados de calcio no interactúan con los grupos amino, lo que explica que dichos complejos sean menos estables que los de plomo.
2. En los complejos aislados de plomo, el grupo amino interviene en la interacción, lo que sugiere que uno de los carboxilos permanece protonado, el cual según lo visto en los resultados, puede ser el carboxilo β .
3. El ion calcio como ácido duro, es capaz de interactuar con los grupos carboxilo y con el grupo amino sólo cuando se encuentra en su forma neutra.
4. El ion plomo en su calidad de ácido intermedio puede interactuar con bases duras como los carboxilos y con el grupo amino sin importar que este se encuentre protonado.

V REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUCCIÓN Y CAPÍTULO I

- 1) E.J. Baran, " Química Bioinorgánica", 1ª Edición, Ed. por Mc Graw Hill, España, 1994.
- 2) G. Battistuzzi, M. Borasi, L. Menabue, y L. Saladini, Inorg. Chem., 35, (1996), 4239-4247.
- 3) D.M.E. Szebenyi, S.K. Obendorf y K. Moffat, Nature, Vol. 204, 26 November 1981.
- 4) B. Harrod, " Química Inorgánica", Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, USA. 1992.
- 5) A. Babor, y J. Ibarz, " Química General Moderna"; 1ª Edición, Ed.; EDESA; México, 1989
- 6) Kirk-Othmer, " Enciclopedia de Tecnología Química", 1ª Edición en español, Ed. UTEHA, México, 1962, Tomos 3, 10 y 12.
- 7) J.E. Huheey, " Química Inorgánica", 2ª Edición en español, Ed. Harla, México 1981.
- 8) R.G. Pearson, J. Chem. Ed, 45, (1968), 581, 563
- 9) M. Kendrick, M. T. May, M.J. Plishko, y K.D. Robinson, " Metals in Biological Systems", Ed Ellis Horwood, 1992.
- 10) E. Ochiai, J. Chem. Ed, 68, (1991), 10, 12.
- 11) H. Sigel en " Metal Ions in Biological Systems". Vol XVII. Ed. por H. Sigel. Marcell Dekker Inc. New York
- 12) J.J.R. Fraústo da Silva, y R.J.P. William, " The Biological Chemistry of the Elements"; Ed. por Clarendon Press. Oxford 1991.

CAPÍTULO II

- 13) H. Sigel en " Metal Ions in Biological Systems". Vol IX. Ed. por H. Sigel. Marcell Dekker Inc. New York.
- 14) H. Schmidbaur, y I. Bach, D.L. Wilkinson, G Müller, Chem. Ber. **122** (1989) 1433-1438.

- 15) H. Schmidbaur, y I. Bach, D.L. Wilkinson, G. Müller, Chem. Ber. **122** (1989) 1427-1431.
- 16) H. Schmidbaur, y I. Bach, D.L. Wilkinson, G. Müller, Chem. Ber. **122** (1989) 1439-1444.
- 17) S.J. Lippard y J. M. Berg, "Principles of Bioinorganic Chemistry", Ed. University Science Books, 1994.
- 18) C. Sano, N. Nagashima, T. Kawakita, and Y. Iitaka, Analytical Sciences., February (1989), Vol. 5, 121-122
- 19) A. Sabatini, y A. Vacca, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1985) 1195-1200.
- 20) E. Martell, y R. Smith, "Critical Stability Constants" 1 Plenum Press. New York, 1982.
- 21) M. Hardel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 346, 224, (1966).
- 22) C. W. Davies and G. M. Waind, J. Chem. Soc., 301, (1950)
- 23) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, y W. Simon, "Tablas para la elucidación de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos". 2ª Edición, Ed. Alhambra, España, 1985.
- 24) M. Kodoma, Bull. Chem. Soc. Jap., 47, 1547, (1974)
- 25) M. Kodoma y S. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jap., 44, 697, (1971)
- 26) R.F. Lumb y A.E. Martell, J. Phys. Chem., 2, 69, (1953).
- 27) E. Martell, y R. Smith, "Critical Stability Constants" 5 Plenum Press. New York, 1989
- 28) Douglas A. Skoog, "Análisis Instrumental", 2ª Edición, Ed. Nueva editorial Interamericana, 1986.

Capítulo III

- 29) A. Gergely y E. Farkas, J. Chem. Soc. Dalton, (1982), 381-386

APÉNDICE I

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación se presenta la parte experimental, de la presente tesis, la cual se divide en: 1. síntesis de complejos, 2. determinación de las constantes de estabilidad y 3. valoraciones medidas por RMN ^1H

1.- Síntesis de complejos:

1.1 $\text{Ca}(\text{L-AspH})_2$

En un vaso de precipitado de 25 mL se colocaron 0.3993g de L-AspH_2 se le añadieron 10 mL de H_2O^* y se agregaron poco a poco y con agitación 0.1512g de CaCO_3 sólido, al final se tuvo una mezcla homogénea a la que se le tomó el pH, con un electrodo previamente calibrado, el cual fue de 7.0, después se colocó un embudo boca abajo, conectado al vacío, para extraer el disolvente. Luego de casi dos meses se obtuvo un polvo blanco.

1.2 $\text{Ca}(\text{L-GluH})_2$

Se procedió de igual forma a poner 0.44139g del L-GluH_2 en 10 mL de H_2O^* y añadir lentamente y con agitación 0.4968g de CaCO_3 , hasta tener una mezcla homogénea, a la cual se le midió el pH y este fue de 7.0, al igual que el anterior se colocó un embudo en la boca del vaso para que sirviera de extractor del disolvente. Después de cuatro meses se obtuvo un polvo blanco.

1.3 $\text{Pb}_2(\text{L-AspH})(\text{L-Asp})\text{NO}_3$

Fue sintetizado a partir de 0.3993g de L-AspH_2 en 10 mL de $\text{H}_2\text{O}^* + 0.99363\text{g}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, la mezcla de reacción presentó un pH final de 4.0

1.4 Complejo de $\text{Pb}(\text{II})$ con L-GluH_2

Para el complejo con ácido glutámico se procedió de la misma manera, es decir, a 0.44139g de aminoácido disuelto en agua se le añadió 0.99363g de la sal de plomo sin disolver, se midió el pH de la mezcla el cual fue 4.49. Se dejó en un

* Toda el agua que se ocupó fue bidestilada, desionizada y recientemente hervida, para evitar interferencias de iones indeseables o microorganismos.

dispositivo similar al usado con los otros complejos y después de varios meses, casi seis, se logró obtener un polvo blanco hidrocópico.

1.5 Pb(GliGluH)NO₃

Para los complejos con el dipéptido se procedió a disolver en la mínima cantidad de agua a 0.1021g del dipéptido y a 0.08280g de la sal de plomo, teniendo un volumen total aproximado de 1 mL, a la mezcla de reacción se le agregó 4 mL metanol para precipitar el complejo, el precipitado se filtró al vacío y se dejó secando aproximadamente 3 horas. Posteriormente se guardó en un frasco dentro del refrigerador para evitar a los microorganismos.

1.6 Ca(GliGluH)Cl•MeOH

El complejo de calcio con el dipéptido fue más difícil de obtener debido a que el carbonato de calcio es bastante insoluble lo que obligó a intentar varias rutas hasta llegar a la siguiente: en un baño de acetona-hielo-sal se coloca un matraz que contenga 0.0500g de carbonato de calcio en aproximadamente 1 mL de H₂O se agita hasta que esté casi totalmente disuelto, a lo que permanece sin disolver, se le añaden 5 gotas de HCl, 0.1N, y se agita hasta tener el carbonato totalmente disuelto, una vez disuelto el carbonato se añaden 0.1021g del dipéptido sin disolver y se agita hasta tener una mezcla transparente y homogénea. Se añaden 10 mL de metanol frío y aparece un precipitado blanco, el cual se filtra con vacío, este complejo es muy sensible y no se debe dejar mucho tiempo en el vacío sino del polvo blanco se forma un compuesto aceitoso transparente.

2. Cálculo de las constantes de estabilidad

Para calcular las constantes de estabilidad se requieren hacer varias soluciones las cuales se enuncian a continuación:

2.1 soluciones reguladoras

Se prepararon tres soluciones reguladoras que son:

Solución pH = 4.0

Se pesaron 2.5528g de Biftalato de potasio y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de H₂O, una vez disuelto el biftalato se colocó en un matraz volumétrico de 250 mL, en donde se llevó al volumen total con agua destilada.

La de pH = 6.86

Se pesaron 0.8505g de KH_2PO_4 y 1.6754g de Na_2HPO_4 , posteriormente se disolvieron en agua destilada y se colocaron en un matraz volumétrico de 250 mL, en donde se aforó con H_2O .

Solución pH = 9.18

Para esta solución se pesaron 0.70355g de Borato, el cual se disolvió en H_2O y se puso en un matraz aforado de 250 mL en donde se complementó el volumen total con agua.

2.2 Solución de KNO_3 , 0.1M

Para mantener la fuerza iónica constante se requiere de una solución de KNO_3 , 0.1M, la cual se preparó de la siguiente forma:

Se pesaron 10.111g de KNO_3 los que fueron disueltos en agua para posteriormente, ponerlos en un matraz volumétrico de 1L y llevar el volumen con agua al aforo.

2.3 Solución patrón de Biftalato de potasio

En este caso fue necesario pesar 2.0423g y disolverlos en solución 0.1M de KNO_3 , para posteriormente ponerlo en un matraz volumétrico de 500 mL y llevar la solución al aforo con KNO_3 0.1M.

2.4 Solución de ácido clorhídrico

Como parte de la estandarización es necesario preparar soluciones con 5mL de HCl 0.1M y agregar KNO_3 0.1M para tener un volumen final de 50 mL.

2.5 Soluciones para el cálculo de pka's

Para fines prácticos sólo pongo las soluciones preparadas para el dipéptido GliGlu a $2 \times 10^{-3}\text{M}$

A 0.4084g del péptido se le agrega KNO_3 0.1M para disolver, y se colocan en un matraz volumétrico de 100 mL donde se llevan al aforo con KNO_3 0.1M.

Posteriormente se toman 5mL de la solución de GliGlu se colocan en un matraz de 50 mL y se añadieron 4.mL de HCl 0.1M como exceso de ácido y se llevó al aforo con solución de KNO_3 0.1M.

2.6 Soluciones para el cálculo de las constantes

Para realizar las valoraciones con los metales fue necesario preparar soluciones patrón de los mismos, a partir de soluciones estándar que comercializa Merck. En ampollas una ampolla contiene un gramo del metal deseado y se puede disolver a un volumen determinado, en este caso se llevaron a 100 mL. Teniendo como concentración final para Ca^{2+} 0.248M con aproximadamente 1M de ácido extra. Para el Pb^{2+} 0.04826M.

Para las valoraciones con calcio, se toman 5 mL de la solución de GliGlu en un matraz volumétrico de 50 mL, después se agregan 0.4032 mL de solución patrón de Ca^{2+} y se lleva al aforo con solución 0.1M de KNO_3 .

Finalmente para las valoraciones con plomo se tomaron 5 mL de la solución del péptido y se agregaron 4 mL de HCl 0.1M y 2.1 mL de la solución patrón de plomo, posteriormente se añadió el volumen necesario de KNO_3 , para tener un volumen total de 50 mL.

En total se hicieron 36 experimentos, 9 con ácido glutámico, 27 con el dipéptido, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 # de experiencias realizadas para la determinación de constantes y pKa's

	Pka's	constantes con Pb^{2+}	constantes con Ca^{2+}
L-GluH ₂ 10 ⁻² [M]	3	3	3
GliGlu 2X10 ⁻³ [M]	3	3	3
GliGlu 10 ⁻³ [M]	3	3	3
GliGlu 5X10 ⁻⁴ [M]		3	3

3. Valoraciones medidas por RMN ¹H

3.1 Valoración del dipéptido GliGlu

Como primer paso, se preparó la solución del dipéptido con 40mg de GliGlu en un matraz volumétrico de 20 mL, llevando al aforo con agua deuterada. Después se etiquetaron dieciocho tubos, y se añadió 1 mL de la solución en cada uno. Posteriormente se agregó al primer tubo ácido clorhídrico deuterado y a los demás sosa deuterada, como se indica en la Tabla 2

Los primeros tubos de hicieron por duplicado para posteriormente agregar los metales.

En el caso de plomo sólo se ocuparon las soluciones a pD menores de 6 debido a que a pD mayores a 6.5 comienza a ponerse turbia la solución. Es por esta razón que tienen más valores las determinaciones del péptido y el péptido con calcio.

Tabla 2

# de tubo	μL de NaOD	μL de DCl	pD
1	10(concentrado)	30	1.45
2			1.74
3			2.25
4			2.62
5	-	-	3.9
6	20(diluida)		4.82
7	35		5.21
8	50		6.62
9	55		7.82
10	60		8.
11	80		8.71
12	96		9.38
13	106		11.37

Las soluciones de los metales se prepararon de la siguiente manera:

A 0.16219g de PbNO_3 se le añadió D_2O hasta el aforo de un matraz volumétrico de 1 mL. Quedando una solución 0.4897M de PbNO_3

Para calcio se pesaron 0.5435g de CaCl_2 que también se pusieron en un matraz aforado de 1 mL para posteriormente llevar al aforo con D_2O . Esta solución tiene una concentración de 0.4897M

Finalmente se añadieron 20 μL de cada metal a diferente tubo, para medir su pD final y sacar el espectro de RMN ^1H de cada uno.

Por último los reactivos y equipo empleados:

Los reactivos utilizados fueron comprados a Aldrich, Sigma y Merck, reactivos grado analítico.

El equipo empleado en las valoraciones potenciométricas fue: Un Titulador Metrohm modelo Titrino 710 DMS, con electrodo de vidrio combinado Metrohm AG CH-9101 HERISAU, un baño termostato Forma Scientific, Inc. Modelo 2095 S/N 20380-1867.

En la determinación de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se empleo un espectrofotómetro Varian Unity Plus. Además en para RMN ^{13}C , la técnica empleada fue CPMAS en estado sólido.

APÉNDICE II

MANUAL PARA EL MANEJO Y PROCESAMIENTO DE DATOS DEL TITULADOR

Uno de los principales obstáculos para la determinación de las constantes de estabilidad, es el aprender a manejar el equipo de titulación y el procesamiento de datos. Es por esta razón que se escribió el presente apéndice, que pretende ser una herramienta auxiliar para los nuevos usuarios del titulador.

Un esquema simplificado del equipo empleado para las titulaciones se muestra en la Figura 1, en el que se aprecian las partes en las que está integrado que son: una computadora (A), un titulador automático (B), un agitador magnético (C), un baño termostato (D), un electrodo (E) y un tanque de nitrógeno(F).

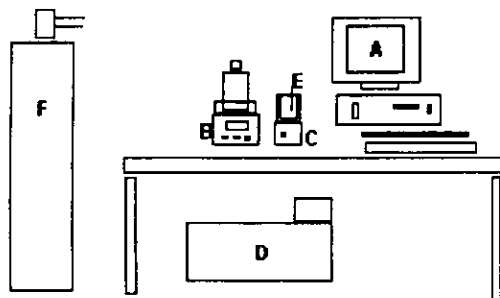


Figura 1

Cada parte del equipo debe estar conectada entre sí, y es necesario asegurarse de que las conexiones estén en buen estado y bien hechas, para evitar problemas en los experimentos. La computadora y el potenciómetro deben estar directamente conectados al titulador. El baño está conectado a una celda en donde se realizan los experimentos, en esta celda se colocan el electrodo, el magneto, el tubo que suministra el N_2 y cuando se requiera, el dosificador de la sustancia titulante.

Para comenzar se requiere hacer las soluciones del apéndice 1, inciso 2, después se procede a hacer los siguientes experimentos:

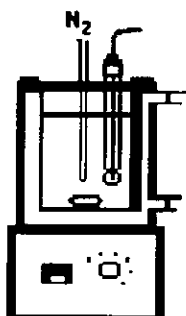
1) CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO

Para hacer una correcta calibración del electrodo, hay que realizar el siguiente procedimiento:

Primero conectar el baño termostato y en segundo lugar limpiar la celda, después colocar 50 mL aproximadamente de la solución reguladora pH=4, taparla y dejarla con agitación, bajo el burbujeo de N_2 , por 10 minutos.

Mientras tanto, se destapa el electrodo, se lava, y si no se ha usado, recientemente, hay que ponerlo en un tubo con solución de HCl 0.1N, durante un minuto, y después cambiarlo a otro tubo que contenga NaOH 0.1N, por otro minuto y cambiarlo alternativamente de NaOH a HCl.

Finalmente se lava el electrodo y se coloca en la celda, como se muestra en la Figura 2.



Celda de trabajo

Figura 2

Al mismo tiempo conectar la computadora, ir al programa 702 y en **User Method** llamar al método en **Recall** "cal01", para saber que las conexiones están bien hechas, en la pantalla del equipo debe aparecer el nombre del método (cal01) y el último dato determinado, como se muestra en la Figura 3.

CAL	cal01
pH(as) 6.91 slope 0.993	

Figura 3

Posteriormente ir a **EDIT**, Info, Live plot, aquí se da el nombre del archivo a generar, ejemplo:

File name C:\702\DATA\cal01.001

y en el renglón inferior se pone el archivo anterior, ejemplo:

Determ.dat C:\702\DATA\cal01.000

Es decir el nombre del archivo, es el nombre del método y la extensión indica el # de veces que se ha hecho el experimento.

Cabe aclarar que cuando se hacen varias determinaciones del mismo programa en la misma sesión no es necesario seguir poniendo estos datos pues se hace automáticamente.

Una vez transcurridos los 10 minutos se checa que la temperatura de la celda esté a 25°C y se oprime start plot en la computadora, entonces, aparece un mensaje en el titulador que pregunta si la temperatura es de 25°C, se da un start, después pide la primera solución reguladora, pH=4, se da otro start, comienza la calibración y en la pantalla de la computadora se aprecian los ejes coordenados y una pequeña recta o un punto.

Es importante tomar el primer número que aparezca en la pantalla del titulador, al iniciar la calibración, este número debe anotarse por ejemplo:

pH=4, 177mV

Cuando el titulador termina con el primer pH, manda un mensaje pidiendo la segunda solución reguladora, pH = 6.87. Entonces se descarta la solución anterior, se lava la celda y se coloca la nueva solución de pH=6.87, la que se deja estabilizando con agitación y burbujeo de N₂, por diez minutos y se repite el mismo procedimiento que con la solución pH=4.

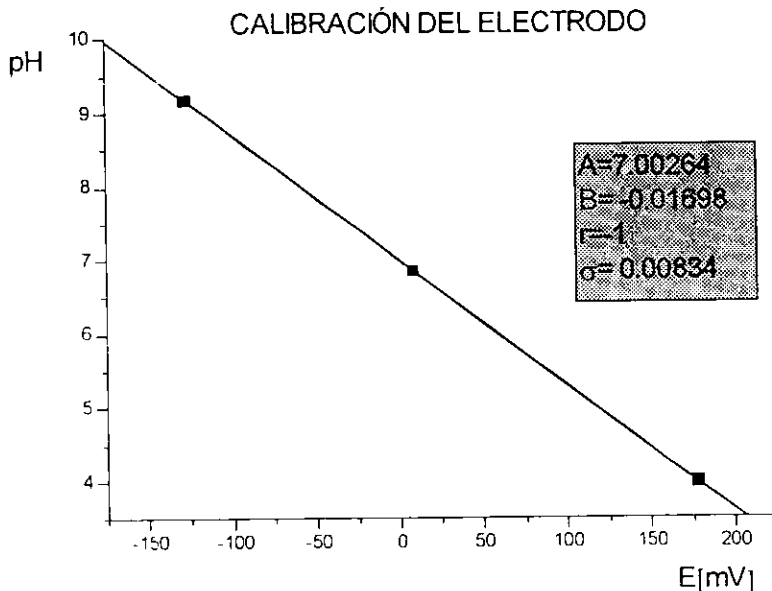
Al concluir la calibración debe tenerse una tabla como la siguiente:

pH=4	177mV
pH=6.86	8mV
pH=9.18	-128mV

Tabla 1

y los datos finales pH=7 y m=0.999.

Estos datos nos sirven para corroborar si la respuesta del electrodo es correcta y si el equipo la esta procesando adecuadamente. Para ello se realiza una gráfica como la siguiente:



Gráfica 1

Al tener los resultados de la regresión lineal, como los que se encuentran en la gráfica, podemos concluir que el electrodo y el equipo están en perfectas condiciones. Por tanto se puede continuar con el trabajo.

2) NORMALIZACIÓN DE LA NaOH

Una vez calibrado el electrodo, se cambia de método al "BIF" que sirve para hacer la valoración de soluciones patrón de biftalato de potasio a fuerza iónica constante. Esto se hace de la siguiente manera:

Se miden 50 mL de la solución de biftalato de potasio 0.02M a fuerza iónica 0.1 y se colocan en la celda del titulador, con agitación y burbujeo de N_2 se tapa y se deja por diez minutos para que llegue a $25^\circ C$, en tanto se coloca el electrodo, y el dosificador de NaOH, previamente lavados, como se muestra en la Figura 4.

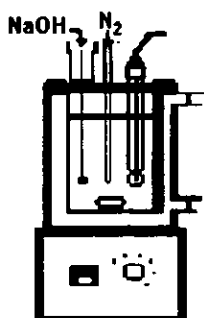


Figura 4

En lo que pasan los diez minutos, se procede a cambiar el nombre de los archivos que se van a generar, por ejemplo.

File name C:\702\DATA\BIF.001

como se hizo con los archivos de calibración.

Una vez transcurridos los 10 minutos, se pone start plot, se verifica que todo esté en orden; en la pantalla de la computadora aparece un mensaje de ready, entonces se oprime start.

Es importante señalar que cualquier interrupción en la titulación, como el protector de pantalla, o el cambio a alguna otra función impiden que los datos sean almacenados. La pérdida de energía eléctrica aunque sea por segundos arruinan el experimento.

Cuando se concluye la titulación debe esperarse hasta que aparezca el mensaje de **transfer finish**, pues salirse antes provoca la pérdida irreparable de los datos.

Ahora bien, una vez terminados al menos 3 de estos experimentos, se procede a titular el HCl preparado para la normalización, es decir 5 mL de HCl 0.1N aforados a 50 mL con KNO_3 . En este caso el método se llama HC.

Al finalizar la valoración por triplicado, podemos comenzar con el procesamiento de datos que se realiza de la siguiente manera:

Lo primero es tener los datos en archivos útiles para ser leídos por el SUPERQUAD, y por algún graficador, en este caso por ORIGIN. Para lograr este objetivo, se hace un pequeño programa que lee los datos del archivo generado

por el titular y los transforma en los archivos deseados, para ello el Dr. Rafael

Moreno Esparza hizo el siguiente programa:

'Este programa transforma los archivos de TITRINO a archivos de SUPERQUAD.

'PARA MARY

OPTION BASE 0

CLS

DIM vol\$(400), pH\$(400), vol(400), pH(400), lect\$(400)

INPUT "Nombre del archivo de entrada: "; namei1\$

INPUT "Nombre del archivo de salida : "; nameo1\$

namei\$ = "mjpg" + namei1\$

nameo\$ = "MJ" + nameo1\$

nameu\$ = "MJ" + nameo1\$ + ".dat"

OPEN "I", #2, namei\$

OPEN "O", #3, nameu\$

OPEN "O", #1, nameo\$

i = 0

DO UNTIL EOF(2)

i = i + 1

INPUT #2, lect\$(i)

LOOP

CLOSE #2

titulo\$ = LEFT\$(lect\$(2), 48)

numero\$ = MID\$(lect\$(7), 8, 5)

n = VAL(numero\$)

PRINT n

n = n + 8

PRINT #1, TAB(0); titulo\$

PRINT #1, TAB(0); USING "#### #### #### ####"; 99; 4; 2; 3

PRINT #1, TAB(0); "AMINOAC:DO"

PRINT #1, TAB(0); " CA"

PRINT #1, TAB(0); " PROTON"

PRINT #1, TAB(0); 25!

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### #### #### #### ####"; 0.0; 1; 0; 1; 1

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### #### #### #### ####"; 0.0; 1; 0; 2; 1

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### #### #### #### ####"; 0.0; 1; 1; 1; 1

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### #### #### #### ####"; 0.0; 1; 1; 0; 1

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### #### #### #### ####"; -13.7688; 0; 0; -1; 0

PRINT #1, TAB(0); ""

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### ## ##### #### #### ####"; 0; 1; .0000; 0!; 0; 0

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### ## ##### #### #### ####"; 0; 2; .0000; 0!; 0; 0

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### ## ##### #### #### ####"; 0; 3; .0000; -.000000; 0; 0

PRINT #1, TAB(0); ""

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### # #####"; 0; 50!; .002

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### # ##### #### # #####"; 1; 0; 2; -00.0; .002; 0; .00000

PRINT #1, TAB(0); ""

FOR m = 9 TO n

vol\$(m) = MID\$(lect\$(m), 1, 10)

pH\$(m) = MID\$(lect\$(m), 11, 24)

vol(m) = VAL(vol\$(m)); pH(m) = VAL(pH\$(m))

PRINT #1, TAB(0); USING "### ##### ## #####"; vol(m); pH(m)

NEXT m

PRINT #1, TAB(0); ""

PRINT #1, TAB(0); ""

```

PRINT #1, TAB(0); ""
PRINT #1, TAB(0); ""
PRINT #1, TAB(0); ""
PRINT #1, TAB(0); ""
CLOSE #1
PRINT #3, TAB(0); " vol(l)  pH(l)  "
FOR m = 9 TO n
  vol$(m) = MID$(lect$(m), 1, 10)
  pH$(m) = MID$(lect$(m), 11, 24)
  vol(m) = VAL(vol$(m)); pH(m) = VAL(pH$(m))
  PRINT #3, TAB(0); USING " ##.##### ##.#####"; vol(m); pH(m)
NEXT m
PRINT #3, TAB(0); ""
CLOSE #3
END

```

□

Este programa no admite archivos de más de 400 datos, lo ideal es 380, para no tener complicaciones al correr SUPER.

La lógica es la siguiente: al archivo que se obtiene de la titulación se le corta toda la información que viene al inicio del archivo (el método) y se deja en el renglón #1 al 'PCmp, luego a este archivo, se le cambia el nombre, por ejemplo:

BIF.001→MJG05.001

Donde la clave de lectura es personal, es decir, como todos los archivos van a ser MJG*. los primeros números indican el método y los segundos el archivo específico. Así cada vez que se vea un MJG05 se relacionará a los experimentos de biftalato de potasio.

Una vez generado el MJG05.001 se cambia a un subdirectorio en donde están los archivos de SUPERQUAD, un procesador de texto y el programa "M".

C:\super\mjgp\

Aquí al poner "M", aparece el siguiente mensaje:

Nombre del archivo de entrada:?

En este ejemplo sería, 05.001, pues el programa ya reconoce la primera parte del nombre (MJG). Se presiona enter y aparece el siguiente mensaje:

Nombre del archivo de salida:?

Que para el ejemplo sería 05001. Con esto se generan dos archivos con los siguientes nombres:

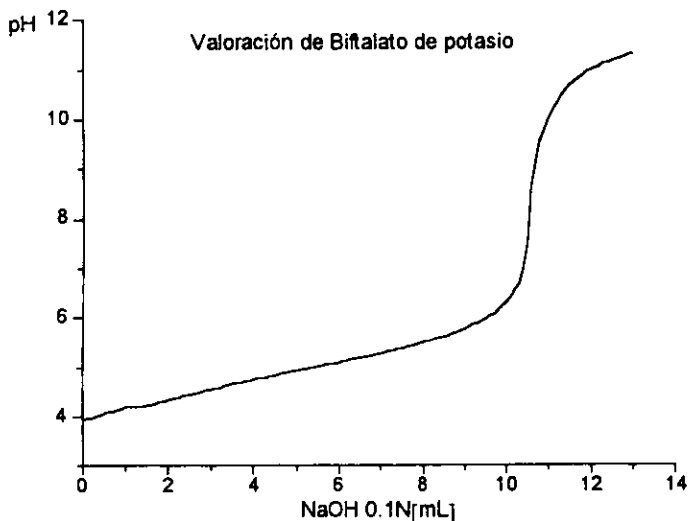
MJ05001 y MJ05001.dat

El primero sirve para procesar datos en SUPERQUAD y el segundo para hacer la gráfica correspondiente, en ORIGIN.

En este caso el segundo archivo es el que se ocupa para obtener los datos que se necesitan, así lo primero es pasar el archivo MJ05001.dat al subdirectorio de ORIGIN

C:\ORIGIN\MJ\

Una vez ahí se hace una nueva gráfica, que se importa en código ASCII, como la que se muestra a continuación:



Gráfica 2

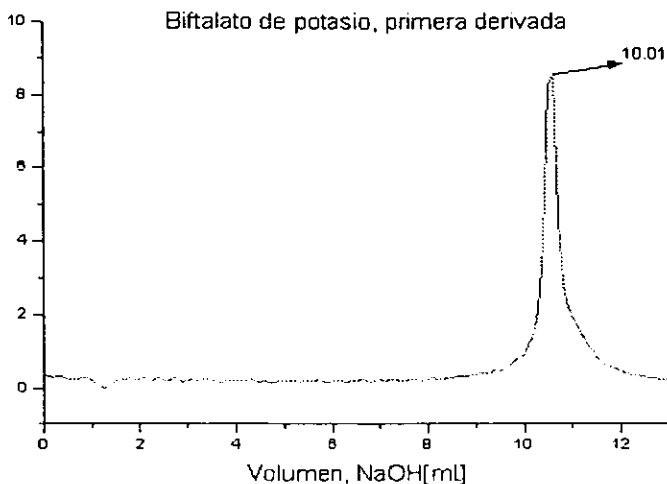
Posteriormente se determina la primera derivada de la curva anterior, para conocer el volumen en el punto de equivalencia. Este volumen junto con la concentración de la solución de biftalato de potasio permite conocer la concentración de la sosa empleada, mediante el siguiente cálculo:

Si la concentración de biftalato es de 0.0200685M

$$(0.05L) \left(\frac{0.0200685 \text{ mol}}{1L} \right) = 0.0100342 \text{ mol de biftalato}$$

Como reacciona uno a uno con la NaOH

$$[NaOH] = \frac{0.0100342 \text{ mol}}{0.0101202 \text{ L}} = 0.0991503 \text{ M}$$



Gráfica 3

Esto se hace con los tres archivos generados y finalmente se toma el valor promedio de la concentración de la NaOH.

El siguiente paso es trabajar con los archivos generados en la titulación de HCl, análogamente a lo que se realizó con los datos de Biftalato se generan archivos del tipo:

HCl.000 → MJG04.000 y

MJG04.000 \xrightarrow{M} Mj04000 y Mj04000.dat

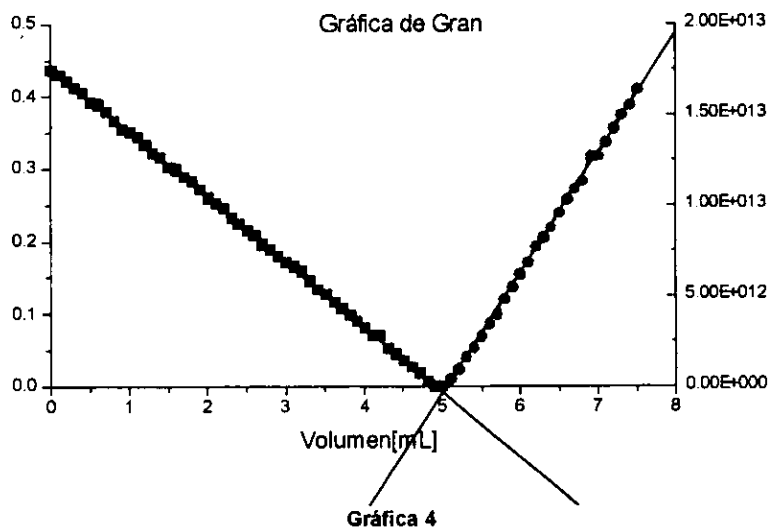
Con el archivo MJ04000.dat se genera, en ORIGIN una tabla de datos importada en código ASCII, como la siguiente:

vol.1.(X) vol(l)	pH.1.(Y) pH(l)	A[Y]	Set Column Values
0	2.028	0.4687	For row number (l) from 1 to 50
0.1	2.036	0.4611	col(A)=[50+col(vol.1.)]*10 ^{-(col(pH.1.))}
0.2	2.044	0.4536	
0.3	2.055	0.4431	
0.4	2.064	0.4349	
0.5	2.072	0.4278	
0.6	2.086	0.415	

Figura 5

Después se añaden dos columnas y en la primera se procesan los datos con la siguiente función: $\phi = (V + v) \times 10^{-pH}$, $(50 + \text{col}(\text{vol.l.})) \times 10^{-(\text{col}(\text{pH.l.}))}$, que es la ecuación para hacer la gráfica de Gran, que sirve para conocer el % de CO_3^{2-} , presentes en la NaOH

En la segunda columna se coloca la función $\phi = (V + v) \times 10^{pH}$, $(50 + \text{col}(\text{vol.l.})) \times 10^{(\text{col}(\text{pH.l.}))}$ y se construye la gráfica:



Con ayuda de los datos obtenidos en la regresiones lineales de cada recta se obtiene el volumen en la equivalencia, y se calcula el % de CO_3^{2-} en la NaOH. Como se muestra en el siguiente ejemplo.

$$A_1 = 0.44095; A_2 = -3.3659E13$$

$$B_1 = -0.8965; B_2 = 6.655E12$$

$$R_1 = -0.99984; R_2 = 0.99944$$

Si $Y=A+BX$, entonces cuando $Y=0$, $X_1=4.9181$ y $X_2=5.05755$, estos valores se alimentan a la siguiente ecuación:

$$\frac{X_2 - X_1}{X_2} * 100 = \%CO_3^{2-}$$

$$\frac{5.05755 - 4.9181}{5.05755} * 100 = 1.3786\%CO_3^{2-}$$

Para poder usar la NaOH se debe tener un valor de $\%CO_3^{2-}$ menor al 2%, de no ser así, en el momento de hacer las determinaciones, se tiene que declarar el CO_3^{2-} como una especie presente, esto interfiere en los experimento y es por ello que sólo se usó NaOH con $\%CO_3^{2-}$ menor al 2%.

Con el valor del volumen a la equivalencia de NaOH se puede calcular la concentración del HCl haciendo los siguientes cálculos:

$$4.998568mLNaOH\left(\frac{0.0992699mol}{1000mL}\right) = 4.962073 * 10^{-4} mol de NaOH = mol de HCl$$

El volumen agregado de HCl fue de 5.016mL por lo tanto su concentración es:

$$[HCl] = \frac{4.962073 * 10^{-4} mol}{5.016 * 10^{-3} L} = 0.0989249M$$

Así se hace con los dos restantes y se hace un promedio tanto de $\%CO_3^{2-}$, como de la concentración de HCl.

Por último se toma el archivo MJ04000 el cual sirve para procesar datos en SUPERQUAD, y se le hacen las siguientes modificaciones, para poder calcular la K_w .

Como se ve en a la Tabla 2, cada número y espacio tiene su razón de ser dentro del archivo

date 97-08-06	time 08:58	9	día y hora en que se realizó el experimento		
99	4	2	3	iteraciones, modo de proceso, especies presente, método	
AMINOACIDO			especie 1 L		
CA			especie 2 M		
PROTON			especie 3 H		
25			temperatura		
0.00000	1	0	1	beta 1 de acidez de la especie 1, el último ¹	
0.00000	1	0	2	beta2 de acidez de la especie 1,	
0.00000	1	1	1	log de la constante de formación del complejo MLH	
0.00000	1	1	0	log de la constante de formación del complejo ML,	
-13.76880	0	0	-1	0	log de la K_w , el signo - indica que es un OH ⁻
			espacio		

¹ Los unos en esta columna indican los valores deben ser refinados y los ceros que no.

0 1 0.000000 0.00000 0 0	L # mmoles totales
0 2 0.000000 0.00000 0 0	M # mmoles
0 3 0.000000 0.00000 0 0	H# mmol total : la concentración de NaOH se pone -0.0999M
	Espacio
0 50.00000 0.0020000	50 es el volumen total y el 0.002 el error en la mediciones de Vol
1 0 2 0.000000 0.0020000 0 0.000000	el 1 y el 0 quedan igual el 2 representa la especie a la que es sensible el electrodo, y el 0.002 es el error del electrodo.
	espacio
0.00000 2.05900	columnas de datos volumen y pH

Tabla 2

Al archivo anterior se le hacen las modificaciones para tener presente sólo H⁺, para calcular el logK_w, como se ve en la Tabla 3:

date 97-08-06 time 08:58 9	este renglón queda igual
99 4 1 3	aquí el # de especies es 1
PROTON	especie
25.00000	temperatura
-13.76880 -1 1	logK _w , -1 representa a un OH y el 1 que se refine el valor
	espacio
1 1 0.496207 -0.09927 0 0	el uno inicial significa que se quiere la tabla de distribución de especies. El primer # es mmol de H ⁺ y el "2" la concentración de [NaOH]
	espacio
0 50.00000 0.0300000	volumen total, el error en la medición del volumen
1 0 1 0.00000 0.0030000 0 0.000000	el 1 significa la especie a la que responde el electrodo, el 0.003 es el error en las mediciones del electrodo
	espacio
0.00000 2.05900	columnas de los valores volumen, pH

Tabla 3

Una vez listos los cambios, se procesan los datos en el SUPERQUAD, haciendo lo siguiente:

C:\SUPER\MJGP\ super91 <mj04000> mj04000.o ,

se presiona Enter y se espera a que se realicen los cálculos, si todo esta bien aparece C:\, sino super manda mensajes, que por lo regular son errores al teclear los datos o por exceso de datos.

Ahora se llama al archivo generado por super que es el MJ04000.o, el cual tiene la estructura que se muestra a continuación:

SUPERQUAD 1991

date 97-08-06 time 08:58 9

MAXIT IPRIN MODE TOL ACCM RELAC
99 4 3 .10E-03 .10E-74 .298023E-07

REACTANT 1- PROTON

THE TEMPERATURE OF SOLUTION(S) IS 25.00 DEGREES CENTIGRADE

FORMATION LOG REFINEMENT STOICHIOMETRIC
 CONSTANTS BETAS KEYS COEFFICIENTS

A .1703E-13 -13.7688 1 -1

1 FORMATION CONSTANTS TO BE REFINED

ITERATION 1 SIGMA= 49.08056 SUM OF SQUARES = 1.8067E+05

PARAMETER	OLD VALUE	REL SHIFT	NEW VALUE	REL ERROR
BETA A	.1703E-13	.0058	1.7129E-14	.0665

ITERATION 2 SIGMA= 49.07806 SUM OF SQUARES = 1.8065E+05

PARAMETER	OLD VALUE	REL SHIFT	NEW VALUE	REL ERROR
BETA A	1.7129E-14	.0000	1.7129E-14	.0665

date 97-08-06 time 08:58 9

2 ITERATIONS

REFINEMENT TERMINATED SUCCESSFULLY

CHI-SQUARED = 184.84

CHI SQUARED SHOULD BE LESS THAN 12.60 AT THE 95 PERCENT CONFIDENCE LEVEL

SIGMA = 49.0781

VALUE REL STD DEV LOG BETA STD DEVIATION

BETA A REFINED 1.71288E-14 .0665 -13.76627 .02988 -1

REFINEMENT CONTINUES WITH WEIGHTS OBTAINED FROM THE CALCULATED TITRATION CURVES

ITERATION 1 SIGMA= 8.13913 SUM OF SQUARES = 4.9684E+03

PARAMETER	OLD VALUE	REL SHIFT	NEW VALUE	REL ERROR
BETA A	1.7129E-14	-.1011	1.5396E-14	.0350

ITERATION 2 SIGMA= 7.67358 SUM OF SQUARES = 4.4163E+03

PARAMETER	OLD VALUE	REL SHIFT	NEW VALUE	REL ERROR
BETA A	1.5396E-14	.0055	1.5481E-14	.0330

ITERATION 3 SIGMA= 7.67216 SUM OF SQUARES = 4.4147E+03

PARAMETER	OLD VALUE	REL SHIFT	NEW VALUE	REL ERROR
BETA A	1.5481E-14	.0000	1.5481E-14	.0330

date 97-08-06 time 08:58 9

3 ITERATIONS

REFINEMENT TERMINATED SUCCESSFULLY

CHI-SQUARED = 81.89

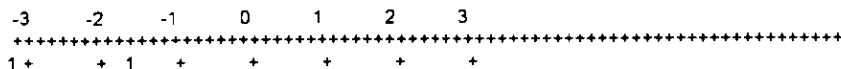
CHI SQUARED SHOULD BE LESS THAN 12.60 AT THE 95 PERCENT CONFIDENCE LEVEL

SIGMA = 7.6722

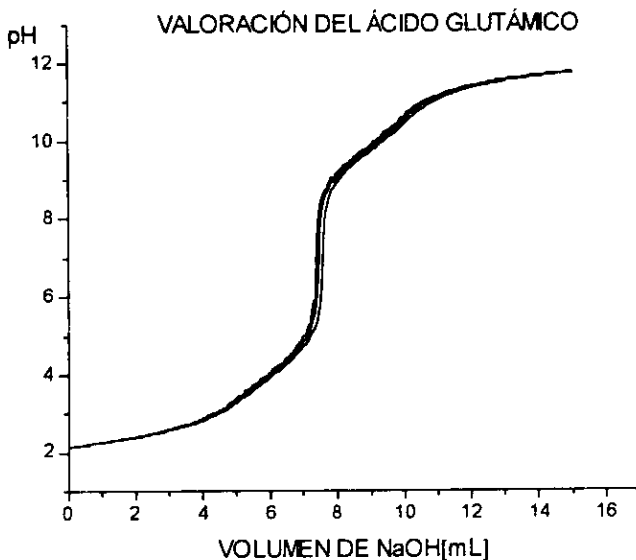
VALUE REL STD DEV LOG BETA STD DEVIATION

BETA A REFINED 1.54810E-14 .0330 -13.81020 .01456 -1

RESIDUALS PLOTS - UNITS OF SD 7.6722



Con los archivos para origin se construye una gráfica, para comprobar la reproducibilidad de los experimentos.



Gráfica 5

Después con el archivo para SUPER se hace el siguiente tratamiento de datos:

date 96-09-20	time 04.22	5	igual
99 4 2 3			igual
GLU			1ª especie = L
PROTON			2ª especie = H
25.00000			temperatura
9.59000	1 1 1		β_1 , el 1 1 representa la especie LH, y el último 1, es para que se refine el valor.
13.79000	1 2 1		β_2 , el 1 2 es la especie LH ₂ , y el 1 significa que refina el valor
15.97000	1 3 1		β_3 , el 1 3 representa a LH ₃ , y el 1 significa que se refina el valor
-13.74000	0 -1 0		K_w , el 0 es que no está presente esa especie y el -1 es lo contrario de la especie 2, es decir OH ⁻ , el 0 final indica que no se quiere refinar el valor
			espacio
1 1 0.250887	0.00000 0 0		el 1 inicial, significa que se quiere la tabla de variación de especies, el 1 siguiente es el # de especie, y 0.25 las mmol de L
1 2 0.987499	-0.10359 1 0		igual que el anterior pero para la especie 2, el -0.103 es la concentración M de la NaOH.
			Espacio
0 50 00000	0 0300000		50, es el volumen inicial, 0.03 el error en las mediciones de volumen
1 0 2 0.00000	0 00300000 0 0.000000		El 2 es la especie a la que es sensible el electrodo, 0.003 el error en las determinaciones de pH
			Espacio
0 00000	2.14000 1		0 00 es el volumen inicial, 2.14 el pH inicial, el 1 significa que no se tome en cuenta este dato.

0.05000	2.14400	
0.10000	2.14900	1
0.15000	2.15300	
etc.		
8.40000	9.33200	
8.45000	9.36600	1
8.50000	9.40800	

Tabla 4

Una vez que se hacen los cambios anteriores, se procesan los datos en el SUPERQUAD dando la siguiente instrucción:

C:\SUPER\MJGP\ super91<mj40000>mj40000.o ,

Y se obtiene un archivo como el siguiente:

```

SUPERQUAD 1991
date 96-09-20   time 04:22   5

MAXIT IPRIN MODE TOL ACCM RELAC
99  4  3  .10E-03  .10E-74  .298023E-07

REACTANT 1-  GLU
REACTANT 2-  PROTON

THE TEMPERATURE OF SOLUTION(S) IS 25 00 DEGREES CENTIGRADE

FORMATION LOG REFINEMENT STOICHIOMETRIC
CONSTANTS BETAS KEYS COEFFICIENTS

A  3.8905E 9   9.5900   1   1  1
B  6.1660E 13 13.7900   1   1  2
C  9.3325E 15 15.9700   1   1  3
D  .1820E-13 -13.7400   0   0 -1

ETC
date 96-09-20   time 04:22   5
6 ITERATIONS
REFINEMENT TERMINATED SUCCESSFULLY
CHI-SQUARED = 17.04
CHI SQUARED SHOULD BE LESS THAN 12.60 AT THE 95 PERCENT CONFIDENCE LEVEL
SIGMA = 1.0582

VALUE REL STD DEV LOG BETA STD DEVIATION
BETA A REFINED  4.19112E 9   .0279   9.62233   .01231   1  1
BETA B REFINED  6.41667E 13  .0384   13.80731   .01701   1  2
BETA C REFINED  1.09802E 16  .0569   16.04061   .02543   1  3
BETA D CONSTANT 1.8197E-13          -13.74000   0 -1

CURVE INITIAL VALUE FINAL VALUE STD DEV
TOT MMOLES PROTON 1  1.03714  1.03611  .00039

CORRELATION MATRIX - PARAMETERS ORDERED AS ABOVE

  1  2  3
2  88
3  65  67
4  .56  .67  .56

```

RESIDUALS PLOTS - UNITS OF SD 1.0582	TO TOTAL CONCENTRATION OF GLU						TO TOTAL CONCENTRATION OF PROTON																		
	0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100													
-3	-2	-1	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1+	+	+2	+	+	+	+	1+		B	C		+	1+		B		* C		+						
3+	+	+2	+	+	+	+	3+		B	C		+	9+		B		* C		+						
5+	+	+2	+	+	+	+	5+		B	C		+	11+		B		* C		+						
7+	+	+2	+	+	+	+	7+		B	C		+	13+		B		* C		+						
9+	+	+2	+	+	+	+	9+		B	C		+	15+		*		C		+						
11+	+	+2	+	+	+	+	11+		C			+	17+		*	B	C		+						
13+	+	+2	+	+	+	+	13+		C	B		+	19+		*	B	C		+						
15+	+	+2	+	+	+	+	15+		C	B		+	21+		*		B	C		+					
17+	+	+2	+	+	+	+	17+A		C	B		+	23+		*		C		+						
19+	+	+2	+	+	+	+	19+A		C	B		+	25+		*		C	B		+					
21+	+	+2	+	+	+	+	21+A		C	B		+	27+		*		C	B		+					
23+	+	+2	+	+	+	+	23+A		C	B		+	29+		*		C	B		+					
25+	+	+2	+	+	+	+	25+A		C	B		+	31+		*		C	B		+					
27+	+	+2	+	+	+	+	27+A		C	B		+	33+		*		C	B		+					
29+	+	+2	+	+	+	+	29+A		C	B		+	35+A		*		C	B		+					
31+	+	+2	+	+	+	+	31+A		C	B		+	37+A		*		C	B		+					
33+	+	+2	+	+	+	+	33+A		C	B		+	39+A		*		C	B		+					
35+	+	+2	+	+	+	+	35+A		C	B		+	41+A		*		C	B		+					
37+	+	+2	+	+	+	+	37+A		C	B		+	43+A		*		C	B		+					
39+	+	+2	+	+	+	+	39+A		C	B		+	45+A		*		C	B		+					
41+	+	+2	+	+	+	+	41+A		C	B		+	47+A		*		C	B		+					
43+	+	+2	+	+	+	+	43+A		C	B		+	49+A		*		C	B		+					
45+	+	+2	+	+	+	+	45+A		C	B		+	51+		*		C	B		+					
47+	+	+2	+	+	+	+	47+A		C	B		+	53+		*		C	B		+					
49+	+	+2	+	+	+	+	49+		C	B		+	55+*		C	A		B		+					
51+	+	+2	+	+	+	+	51+		C	A		+	57+*		C	A		B		+					
53+	+	+2	+	+	+	+	53+CA			B		+	59+*		C			B		+					
55+	+	+2	+	+	+	+	55+CA			B		+	61+*		A			B		+					
57+	+	+2	+	+	+	+	57+CA			B		+	63+*		A			B		+					
59+	+	+2	+	+	+	+	59+CA			B		+	65+*		A			B		+					
63+	+	+2	+	+	+	+	63+CA			B		+	69+		A			B		+					
65+	+	+2	+	+	+	+	65+		AB			+	71+		A			B		+					
67+	+	+2	+	+	+	+	67+		BA			+	73+		B			A		+					
69+	+	+2	+	+	+	+	69+		B	A		+	75+		B			A		+					
71+	+	+2	+	+	+	+	71+		B	A		+	77+		B			A		+					
73+	+	+2	+	+	+	+	73+		B	A		+	79+		B			A		+					
75+	+	+2	+	+	+	+	75+		B	A		+	81+					A		+					
77+	+2	+	+	+	+	+	77+		B	A		+	83+					A		+					
79	2	+	+	+	+	+	79+B			A		+	85+					A		+					
81+	+	+	+	+	+2	+	81+*			A		+	87+					A		+					
83+	+	+	+2	+	+	+	83+*			A		+	89+					A		+					
85+	+	+2	+	+	+	+	85+*			A		+	91+					A		+					
87+	+	+2	+	+	+	+	87+*			A		+	Stop - Program terminated.												
89+	+	+2	+	+	+	+	89+*			A		+													
91+	+	+2	+	+	+	+	91+*			A		+													

Tabla 5

4) DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD

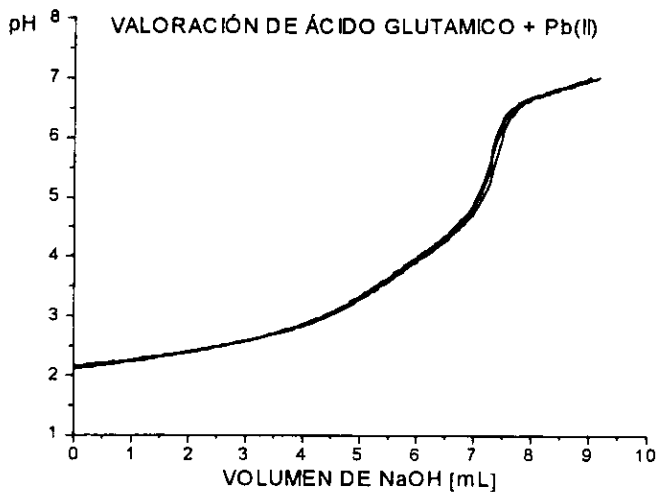
Para la determinación de constantes de estabilidad se procede igual que con los pKa's, con la única diferencia de que se agrega el metal, el la Tabla siguiente se

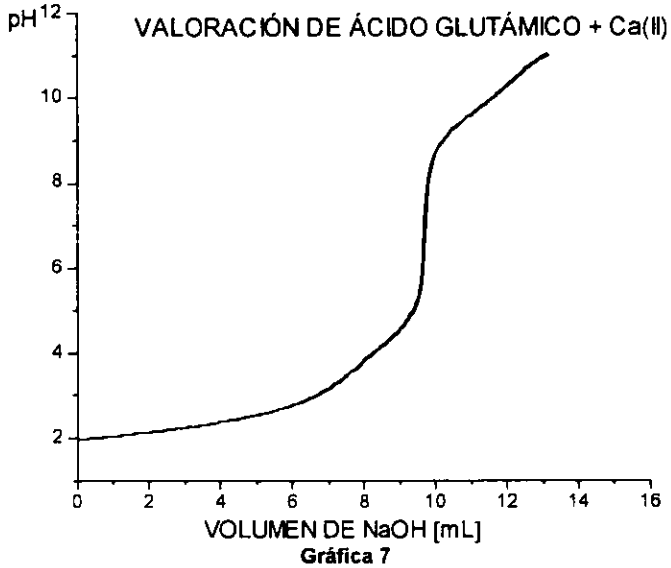
ejemplifica la manera en que se deben procesar los datos, producto de las valoraciones.

date 96-10-10 time 02:58 4	date 96-10-03 time 04:29 18
99 4 3 3	99 4 3 2
GLU	Glu
CA	Pb
PROTON	PROTON
25.00000	25.00000
9.62586 1 0 1 0	9.62092 1 0 1 0
13.79110 1 0 2 0	13.78313 1 0 2 0
15.98427 1 0 3 0	15.97000 1 0 3 0
1.43000 1 1 0 1	4.66000 1 1 0 1
11.12000 1 1 1 1	-13.74000 0 0 -1 0
-13.76880 0 0 -1 0	
	0 1 0.250295 0.00000 0 0
	0 2 0.241300 0.00000 0 0
	0 3 0.987670 -0.10358 1 0
	0 50.00000 0.0040000
0 50.00000 0.0030000	1 0 3 0.00000 0.0300000 0 0.000000
1 0 3 0.00000 0.0300000 0 0.000000	
	0.00000 2.15700 1
0.10000 1.95600 1	0.05000 2.16100
0.15000 1.96000	etc
etc.	7.55000 6.35300
10.95000 9.51900	

Tabla 7

Con el fin de comprobar la reproducibilidad de las valoraciones se construyen las siguientes gráficas(6, 7)





Finalmente se procesan los datos de SUPERQUAD, y se obtiene un archivo como el que se muestra a continuación:

SUPERQUAD 1991

date 96-10-11 time 01.31 5

MAXIT IPRIN MODE TOL ACCM RELAC
 99 4 3 .10E-03 .10E-74 298023E-07

REACTANT 1- GLU
 REACTANT 2- CA
 REACTANT 3- PROTON

THE TEMPERATURE OF SOLUTION(S) IS 25.00 DEGREES CFNTIGRADE

FORMATION LOG REFINEMENT STOICHIOMETRIC
 CONSTANTS BETAS KEYS COEFFICIENTS

A	3.8905E 9	9.5900	1	1	0	1
B	6.1660E 13	13.7900	1	1	0	2
C	9.3325E 15	15.9700	1	1	0	3
D	1.1482E 2	2.0600	1	1	1	0
E	1.4791E 1	1.1700	1	1	1	1
F	.1703E-13	-13.7688	0	0	0	-1

5 FORMATION CONSTANTS TO BE REFINED

3 SPECIAL PARAMETERS TO BE REFINED

CURVE VALUE

TOT MMOLES PROTON 1 1.2504E+00
 TOT MMOLES PROTON 2 1.2504E+00
 TOT MMOLES PROTON 3 1.2504E+00

date 96-10-11 time 01:31 5

3 ITERATIONS

REFINEMENT TERMINATED SUCCESSFULLY

CHI-SQUARED = 79.02

CHI SQUARED SHOULD BE LESS THAN 12.60 AT THE 95 PERCENT CONFIDENCE LEVEL

SIGMA = 1.0196

VALUE REL STD DEV LOG BETA STD DEVIATION

BETA A REFINED 2.14606E 9 .0484 9.33164 02155 1 0 1
 BETA B REFINED 4.93873E 13 .0183 13.69362 .00802 1 0 2
 BETA C REFINED 8.00101E 15 .0302 15.90314 .01334 1 0 3
 BETA E REFINED 4.67996E 11 .0904 11.67024 .04115 1 1 1
 BETA F CONSTANT .17029E-13 -13.76880 0 0 -1

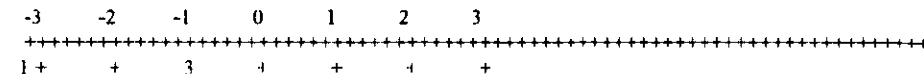
CURVE INITIAL VALUE FINAL VALUE STD DEV

TOT MMOLES PROTON 1 1.25252 1.25281 .00029
 TOT MMOLES PROTON 2 1.25522 1.25528 .00030
 TOT MMOLES PROTON 3 1.25396 1.25408 .00030

CORRELATION MATRIX - PARAMETERS ORDERED AS ABOVE

1 2 3 4 5 6
 2 .15
 3 -.15 .56
 4 -.94 .13 .34
 5 .04 .46 .34 .10
 6 .05 .47 .35 .09 .23
 7 .04 .47 .35 .09 .23 .23

RESIDUALS PLOTS - UNITS OF SD 1.0196

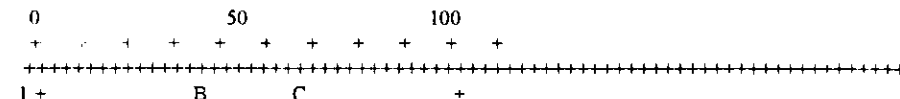


Etc.

date 96-10-11 time 01:31 5

CURVE 1

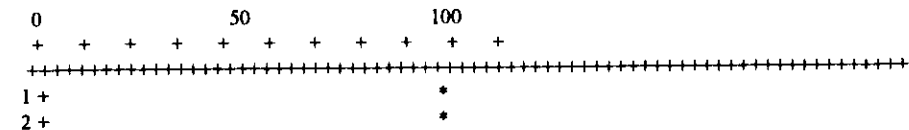
PERCENT FORMATION RELATIVE TO TOTAL CONCENTRATION OF GLU



Etc.

date 96-10-11 time 01:31 5

CURVE 1
 PERCENT FORMATION RELATIVE TO TOTAL CONCENTRATION OF CA



Etc.

Después de realizar el procesamiento de datos anterior y los resultados se encuentran dentro de las expectativas, se hace el promedio de los datos obtenidos y se da por concluido el trabajo.