

00582

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

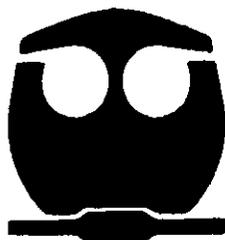
Sustitución nucleofílica en ésteres de ácidos
carboxílicos y fosfatos con participación de
iones metálicos

295513

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
(QUÍMICA INORGÁNICA)
P R E S E N T A

CLAUDIA PAOLA GÓMEZ TAGLE CHÁVEZ



MEXICO, D.F.

2001



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	Dra. Rosalinda Contreras Theurel
PRIMER VOCAL	Dra. Lena Ruiz Azuara
SEGUNDO VOCAL	Dra. Silvia Castillo Blum
TERCER VOCAL	Dr. Rafael Esparza Moreno
SECRETARIO	Dr. David Díaz
PRIMER SUPLENTE	Dr. Hugo Tláhuextl Romero
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. Laura Gasque Silva

ASESOR

Dr. Anatoli K. Iatsimirski

SUSTENTANTE

M.en C. Claudia Paola Gómez Tagle Chávez

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 213 de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

Agradecimientos

A DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM) y DGEP (Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM), que en conjunto concedieron una beca para la realización de mis estudios de doctorado (1997-2000), y por el apoyo financiero para la realización de este trabajo mediante los proyectos DGAPA-PAPIIT IN106495, DGAPA-PAPIIT IN214998, y DGEP-PAEP Doctoral 207339.

A CONACyT que financió el proyecto 25183-E

Al Dr. Anatoli Iatsimirski, quien dirigió íntegro este proyecto de tesis

Al Dr. Karen Manoutcharen, Alberto Cano, Hugo Santamaría y los integrantes del laboratorio de inmunología por proporcionar el plásmido pcDNA-3, el equipo necesario y el entrenamiento para realizar los experimentos con ADN, además de las agradables horas de trabajo. En especial a Tzipe Govezenski por la digitalización de las fotografías de los geles.

A James Pavlovich, Universidad de California en Santa Bárbara, por la realización de las mediciones de ESI-MS y su valiosa ayuda en la interpretación de los espectros.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de esta facultad (Rosy y Oscar) y del Centro de Investigación en Química de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Carolina, Karen e Ismael) por su apoyo para realizar las titulaciones en ^1H -RMN.

A los integrantes del laboratorio 113 de Química Analítica, de la División de Estudios de Posgrado de esta facultad por el equipo y espacio facilitado para realizar las titulaciones potenciométricas.

A los doctores Lena Ruiz, Rafael Moreno y Carolina Godoy por el tiempo de espectrofotómetro concedido, así como a Jesús Gracia, el tiempo de cómputo con Spartan.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito.

Agradezco muy en especial

A los compañeros de trabajo del laboratorio 213, por su paciencia. A los integrantes del departamento de Química Inorgánica y de Química General por todo lo compartido. A los amigos de todos los lugares.

Al Dr. Anatoli, cada una de sus enseñanzas y todas las horas de trabajo que durante estos años me han llevado a disfrutar el quehacer inabarcable de la profesión.

A mis padres Alberto y Yolanda. A mis hermanos, Alberto, Natalia y Scott.

A Julio

...A la química

Je suis apprivoisé

- Tu n'es pas d'ici, dit le renard, que cherches-tu?
- Je cherche les hommes, dit le petit prince. Qu'est-ce que signifie "apprivoiser"?
- Les hommes, dit le renard, ils ont des fusils et il chassent. C'est bien gênant! Ils élèvent aussi des poules. C'est leur seul intérêt. Tu cherches des poules?
- Non, dit le petit prince. Je cherche des amis. Qu'est-ce que signifie "apprivoiser"?
- C'est une chose trop oubliée, dit le renard. Ça signifie "créer des liens..."
- Créer des liens?
- Bien sûr, dit le renard. Tu n'es encore pour moi qu'un petit garçon tout semblable à cent mille petits garçons. Et je n'ai pas besoin de toi. Et tu n'as pas besoin de moi non plus. Je ne suis pour toi qu'un renard semblable à cent mille renards. Mais si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre. Tu seras pour moi unique au monde. Je serai pour toi unique au monde...

"Le Petit Prince"

Antoine de Saint-Exupéry

CONTENIDO

Símbolos y abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
INTRODUCCION	
1. Hidrólisis y sustitución nucleofílica en ésteres y fosfoésteres	5
2. Catálisis en ruptura de ésteres y fosfoésteres	9
Antecedentes	
3. Reactividad esterolítica y fosfoesterolítica de nucleófilos libres	13
4. Complejos reactivos y sus equilibrios en disolución acuosa	17
5. Reactividad de los complejos en la hidrólisis de ésteres y fosfoésteres	21
5.1. Complejos metálicos divalentes y Co(III)	21
5.2. Coordinación directa con los sustratos	22
5.3. Activación de OH ⁻ como nucleófilo	23
5.4. Cooperación ácido-base	25
5.5. Reconocimiento del sustrato	26
5.6. Activación de RO ⁻ como nucleófilo	27
5.7. R ₁ R ₂ C=N-O ⁻ como nucleófilo	28
5.8. Cooperación en complejos dinucleares	29
5.9. Cationes lantánidos (III). OH ⁻ y RO ⁻ como nucleófilos	32
5.10. Cationes tetravalentes y OH ⁻ como nucleófilo	39
5.11. Nucleófilos coordinados en sitios activos de metaloenzimas	41
Objetivos de la tesis	45
Parte experimental	
6. Sustancias empleadas, reactivos y software	47
6.1. Reactivos	47
6.2. Equipo	49
6.3. Software	50

7. Técnicas empleadas	50
7.1. Potenciometría	50
7.2. Cinética	54
7.3. ^1H -Resonancia magnética nuclear	57
7.4. Espectrometría de masas con ionización por electrospray	58
7.5. Ruptura de ADN	58
Resultados y discusión	
8. Ruptura de fosfoésteres con hidroxilamina	59
9. Hidrólisis de ésteres y fosfoésteres con derivados de hidroxilamina	62
9.1. OXDAP-M(II) y Pr(III) en la ruptura de PNPA	62
9.2. OXDAP-M(II) en la ruptura de BNPP	66
9.3. Sistema BDM-M(III) en disolución	70
9.4. BDM-M(III) en la ruptura de BNPP	73
9.5. BDM-M(III) en la ruptura de MNPP	75
9.6. BDM-M(III) en la ruptura de PNPA	77
10. Sistemas BTP-Y(III), Tris-Y(III)	79
10.1. Equilibrios en disolución acuosa BTP-Y(III)	79
10.2. Equilibrios en disolución acuosa Tris-Y(III)	87
11. Comportamiento cinético de los sistemas BTP-Y(III), Tris-Y(III)	90
11.1. Cinética de hidrólisis de BNPP	90
11.2. Cinética de hidrólisis de MNPP y PNPDP	97
12. Discusión general de los sistemas con Y(III) y comparación con sistemas relacionados.	99
13. Comportamiento en disolución acuosa del sistema BTP-Ln(III)	103
13.1. Equilibrios en disolución acuosa BTP-Ln(III)	103
13.2. Especies en disolución acuosa. ESI-MS	110
14. Comportamiento cinético del sistemas BTP-Ln(III)	113
14.1. Cinética de hidrólisis de BNPP	113
14.2. Cinética de hidrólisis de MNPP y PNPA	123

15. Análisis del mecanismo de reacción en términos de correlaciones de Brønsted y estabilización del estado de transición.	129
16. Ruptura de ADN superenrollado	139
Conclusiones	151
Referencias citadas	153
Anexos	
A1. Modelos cinéticos	172
A1.1. Modelo cinético de hidrólisis sucesivas para ruptura de BNPP	172
A1.2. Modelo cinético tipo Michaelis-Menten	174
A2. Derivación del modelo de equilibrios BTP-Ln(III) a partir de las titulaciones potenciométricas y datos de las titulaciones	177
A3. Propiedades electrónicas de los sustratos y ligantes	189

Símbolos y abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ESI-MS	espectrometría de masas con ionización por electrospray
I	fuerza iónica
K	constante de equilibrio en términos de concentración
K_M	constante de Michaelis
k	constante de velocidad
k_{cat}	constante catalítica
k_{hid}	constante de velocidad de hidrólisis
k_{obs}	constante de velocidad observada
pK_a	constante de disociación ácida
r_i	radio iónico
S_N1	sustitución nucleofílica, mecanismo monomolecular
S_N2	sustitución nucleofílica, mecanismo bimolecular
UV	ultravioleta
Vis	visible
δ	desplazamiento químico [ppm]
μ	momento dipolar [debye]

Sustratos

ADN _{SE}	fosfodiéster, ácido desoxirribonucleico superenrollado
BNPP	fosfodiéster, bis(4-nitrofenil) fosfato
BDNPP	fosfodiéster, bis(2,4-dinitrofenil) fosfato
ENPP	fosfodiéster, 4-nitrofenil-etil fosfato
HPNP	fosfomonoéster, 4-nitrofenil-2-hidroxipropil fosfato
MNPP	fosfomonoéster, 4-nitrofenil fosfato
PNPA	éster, 4-nitrofenil acetato
PNPDP	fosfotriéster, 4-nitrofenildifenil fosfato
PNPMP	fosfonato, 4-nitrofenilmetil fosfonato
TpT	dinucleótido, timidil(3',5')timidina

Ligantes y amortiguadores

acac	acetilacetato
BDM	butanodiona monoxima
bipy	2,2'-bipiridina
BisTris	2-bis[2-hidroxietyl]amino-2-[hidroximetil]-1,3-propanodiol
BTP	BisTris propano, 1,3-Bis[tris(hidroximetil)metilamino]-propano
ciclen	1,4,7,10-tetraazaciclododecano
dien	dietilentriamina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
en	etilendiamina
OXDAP	2,6 diacetilpiridíndioxima
fen	fenantrolina
terpy	terpiridilo
tren	trimetilentetramina
trpn	tris(3-aminopropil)amina
tris	tris(hidroximetil)aminopropano
sae	salicilidenaminoctanol
[9]anoN ₃	1,4,7-triazaciclononano

RESUMEN

Este trabajo es un estudio interdisciplinario de la ruptura de ésteres y fosfoésteres en disolución acuosa promovida por complejos de iones metálicos. Los catalizadores de procesos de este tipo pueden aplicarse para resolver problemas ambientales como la detoxificación de pesticidas organofosforados o armas químicas, y en biología molecular, medicina e ingeniería genética como “nucleasas químicas”.

El objetivo principal es diseñar y estudiar complejos como catalizadores estableciendo factores cinéticos y termodinámicos que controlan su reactividad hacia ésteres y fosfoésteres.

Se emplearon cationes metálicos de transición, itrio y lantánidos coordinados con ligantes aminoalcoholes acíclicos y oximas. Los sustratos estudiados incluyeron un éster y mono- di- y trifosfoésteres 4-nitrofenílicos.

Los equilibrios en disolución acuosa entre los ligantes y metales usados se caracterizaron mediante titulaciones potenciométricas y técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear y masas). Con itrio y lantánidos con aminoalcoholes se encontraron series de hidroxocomplejos binucleares que son las especies catalíticamente activas. Con las oximas se forman complejos oximato monoméricos activos.

La catálisis más efectiva en la ruptura de fosfodiésteres se observó con complejos aminoalcohólicos de Y(III) y lantánidos(III). Los resultados cinéticos se analizan conjuntamente con datos de la literatura en términos de correlaciones de Brønsted y de la estabilización del estado de transición. El sistema con lantánidos también es activo en la ruptura de ADN. Los complejos oximato estudiados dan buenos efectos catalíticos y siguen la tendencia esperada: éster>fosfotriéster>fosfomonoéster>fosfodiéster. Los sistemas catalíticos desarrollados en este trabajo tienen actividades comparables o mayores a las reportadas en literatura hasta la fecha.

ABSTRACT

This work is an interdisciplinary study of the cleavage of carboxylic acid and phosphate esters promoted by metal complexes in aqueous solutions. Sufficiently active catalysts find important applications as detoxifying agents against organophosphorus compounds used as pesticides and chemical weapons, and as “chemical nucleases” in molecular biology, medicinal and genetic engineering researches.

The main objective of this work is designing and testing metal complexes as catalysts elucidating the kinetic and thermodynamic factors governing their reactivity.

Transition metals, lanthanide and yttrium cations in weakly basic solutions coordinated with acyclic aminoalcohols and oxime ligands were employed. The substrates studied included an ester and phospho mono-, di- and trisubstituted esters with the 4-nitrophenol leaving group.

Solution equilibria between used ligands and metals were characterized by potentiometric titrations and spectroscopic techniques (nuclear magnetic resonance and mass spectrometry). It was found that the series of dinuclear hydroxocomplexes are formed under reaction conditions and function as the catalytic species in the systems with yttrium or lanthanides and aminoalcohols. Monomeric oximate complexes are the catalytically active species with oximes.

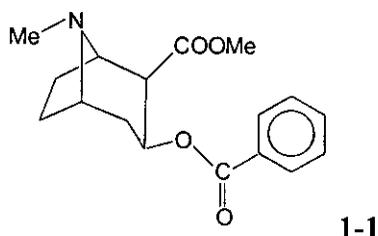
The most effective catalysts in the cleavage of phosphodiester are the aminoalcoholic complexes of Y(III) and lanthanide(III). The kinetic data were analyzed together with the reported data in terms of Brønsted correlations and the transition state stabilization. The lanthanide system is also reactive in the DNA cleavage. The oximate complexes studied follow the expected tendency: ester>phosphotriester>phosphomonoester>phosphodiester. The catalytic systems developed in this work by their activities are similar or superior to the best catalysts reported in the literature.

INTRODUCCION

1. Hidrólisis y sustitución nucleofílica en ésteres y fosfoésteres.

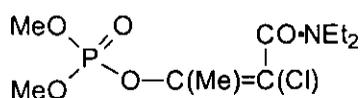
El proceso de ruptura de ésteres de ácidos carboxílicos y fosfato ha sido un campo de intenso estudio en varias áreas de la química debido a su relevancia tanto para sistemas biológicos como para sistemas químicos aplicados.

La hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos es un proceso bastante bien estudiado¹ que generalmente transcurre con una velocidad relativamente grande, sin embargo en algunas situaciones es conveniente acelerar esta reacción. Por ejemplo, un catalizador efectivo de la hidrólisis de cocaína (**1-1**) *in vivo* podría ser un antídoto importante contra este narcótico,² o bien, la rápida hidrólisis del sustituyente carbo(8-quinoloxi) en presencia de iones metálicos permite su uso como protector de grupos amino en la síntesis de péptidos.³

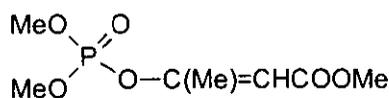


Por su parte, la hidrólisis de ésteres fosfato ha llamado la atención durante los últimos años por su importancia en los sistemas biológicos y sus efectos ambientales.^{4,5} Entre los triésteres fosfato y compuestos análogos hay un gran número de sustancias tóxicas que se utilizan como herbicidas, insecticidas (*fosfamidon 1-2*, *mevinfos 1-3*, *solioxon 1-4*) o armas químicas (**1-5** a **1-7**). Estos fosfoésteres son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, responsable de la transmisión del impulso nervioso; su reactivación implica un proceso hidrolítico para la enzima fosforilada. Por ejemplo, los gases neurotóxicos sarin (**1-5**), soman (**1-6**) y tabún (**1-7**) tienen una toxicidad muy alta (\sim LD₅₀ 10 µg/kg) y sus tiempos de vida media son largos (175, 100 y 9 horas respectivamente a 100°C en agua),⁵ por lo que un catalizador de la hidrólisis de estos compuestos debe ser sumamente eficiente.

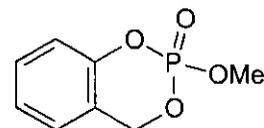
La desactivación de los compuestos empleados como armas químicas es particularmente difícil, y es importante mencionar que la hidrólisis es el único método efectivo de detoxificación^{6,7} ya que el empleo de otros medios de destrucción (p.ej. pirólisis) puede producir sustancias de toxicidad semejante o mayor. Además, la detección de estos compuestos es complicada y el uso de sistemas hidrolíticos que incluyen complejos metálicos permite su detección por métodos más sencillos, por ejemplo potenciométricos.⁸



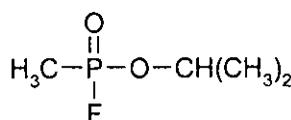
1-2



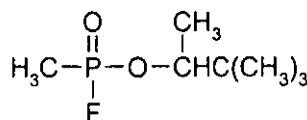
1-3



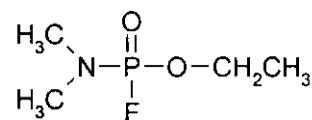
1-4



1-5



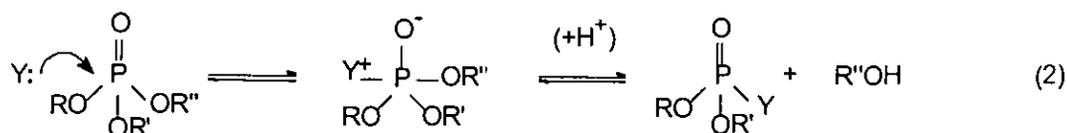
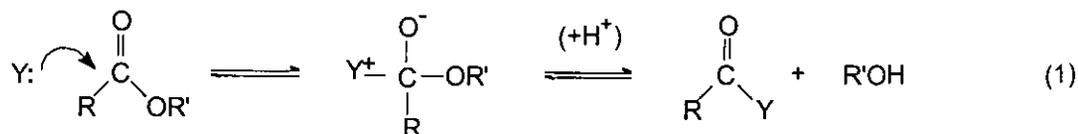
1-6



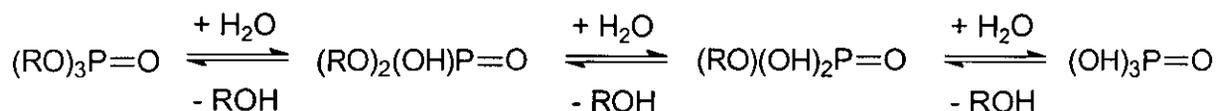
1-7

Una aplicación muy importante de los catalizadores esterolíticos es la ruptura de los enlaces fosfodiéster que forman parte de cadenas de ácidos ribonucleicos (ARN) y deoxirribonucleicos (ADN). Estos fosfodiésteres son sumamente estables a la hidrólisis: a pH 7.0 y 25°C sus tiempos de vida media están estimados en 200 millones de años para ADN⁹ y en 100 años para ARN.¹⁰ De hecho, se ha sugerido que la enorme estabilidad de los fosfodiésteres es una de las razones para que los ácidos nucleicos sean los responsables de almacenar la información genética.¹¹ (La diferencia principal en reactividad entre ambos ácidos nucleicos es la presencia del 2'-OH de la ribosa en el ARN que actúa como un nucleófilo intramolecular y promueve su hidrólisis) Así, una de las etapas principales para la manipulación del material genético es la hidrólisis de estos poliácidos y consecuentemente en la actualidad hay un gran interés en el desarrollo de nucleasas artificiales¹²⁻¹⁴ capaces de romper enlaces fosfoéster, P-O, en ácidos nucleicos.

El mecanismo de la hidrólisis de ésteres puede ser entendido como una sustitución nucleofílica en particular, que transcurre vía el conocido mecanismo de "adición-eliminación"^{1,15} bien establecido para los ésteres de ácidos carboxílicos, reacción (1):

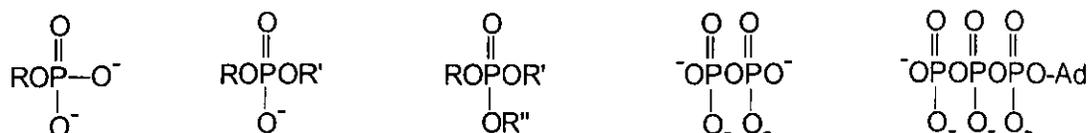


La ruptura de los ésteres fosfato ocurre, en cierta medida, a través de un mecanismo similar al de la reacción (2): hay un ataque nucleofílico hacia el átomo de fósforo, se forma un intermediario pentacoordinado bipiramidal y sale el grupo alcohol en posición axial al nucleófilo entrante; sin embargo su proceso es más complicado y no es claro si existe una similitud en el comportamiento de los diferentes tipos de fosfatos. La reacción global de hidrólisis de un triéster puede verse como la hidrólisis sucesiva y reversible de cada uno de sus grupos éster (3).



Si bien para los triésteres fosfato la reacción (2) representa la primera etapa de hidrólisis, los detalles de los procesos subsiguientes son más complicados: dependen del tipo de sustrato y la ruptura puede ocurrir por diferentes mecanismos. Vale la pena mencionar que los factores determinantes para cada mecanismo de ruptura no han sido comprendidos en su totalidad.

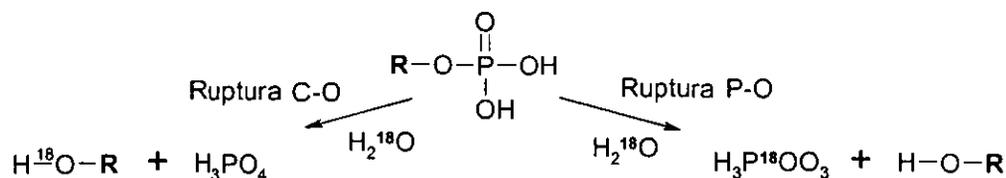
Existen varios tipos de ésteres fosfato. En el esquema 1.1 se muestran como ejemplos mono-, di- y triésteres del ácido fosfórico, aniones de pirofosfato y adenosintrifosfato que a su vez pueden existir, dependiendo del pH, como especies neutras, monoaniónicas, dianiónicas o polianiónicas con diferente susceptibilidad a la ruptura.



Esquema 1.1

Por lo tanto, en contraste con los ésteres de ácidos carboxílicos, para los fosfoésteres hay una gama mucho más extensa de especies reactivas bajo determinadas condiciones de reacción, lo cual puede ser particularmente complicado en sistemas biológicos.

Otra particularidad de la ruptura de fosfoésteres es que, si bien para los fosfotriésteres la hidrólisis generalmente procede vía la ruptura de un enlace P-O, para los fosfomonoésteres y fosfodiésteres el átomo de fósforo puede estar muy desactivado para ser atacado nucleofílicamente y entonces hay dos procesos de hidrólisis que compiten entre sí: la ruptura del enlace C-O y la ruptura del enlace P-O.¹⁶ En principio estos dos tipos de ruptura son distinguibles si se llevan a cabo experimentos en H_2^{18}O ya que la marca isotópica de ^{18}O se incorpora en diferentes productos de la hidrólisis para cada mecanismo (*Esquema 1.2*), aunque pueden surgir dificultades debido al intercambio concomitante entre reactivos y productos.

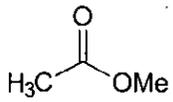
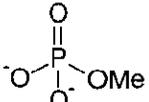
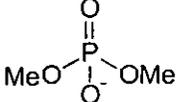
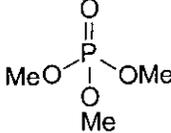


Esquema 1.2

En términos del mecanismo de hidrólisis para ésteres con ruptura C-O, vale la pena mencionar que en el caso de los fosfoésteres no siempre es posible distinguir entre un proceso concertado (tipo $\text{S}_{\text{N}}2$) o un proceso en dos etapas (tipo $\text{S}_{\text{N}}1$). En general, se acepta que para monofosfoésteres con sustituyentes alquil o aril con posibilidades de formar carbocationes estables, la hidrólisis procede vía un proceso de ionización o mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$ con ruptura C-O,^{17,18} aunque puede cambiar si se modifica el estado de protonación del sustrato. Otra versión del mecanismo monomolecular típica para los fosfomonoésteres es la ruptura del enlace P-O con liberación de metafosfato.¹⁶ Cuando no es posible formar carbocationes estables para fosfoésteres, o en el caso de fosfotriésteres y fosfodiésteres, es más factible que la ruptura del enlace C-O o del enlace P-O transcurra por un mecanismo tipo $\text{S}_{\text{N}}2$,¹⁸ aunque ciertamente el mecanismo es cinéticamente indistinguible de un proceso tipo $\text{S}_{\text{N}}1$ en el que el intermediario se descompone tan rápidamente que no puede equilibrarse con el disolvente.

La diferencia más importante en la sustitución nucleofílica entre fosfatos y carboxilatos es la menor reactividad de los fosfatos. Por ejemplo, si comparamos la velocidad de la hidrólisis alcalina (NaOH 1.0 M en agua, 25°C) para ésteres sustituidos sucesivamente con grupos metilo

^{17,19,20} encontramos que la reactividad relativa es: éster >> fosfotriéster >> fosfomonoéster > fosfodiéster (*Esquema 1.3*). De acuerdo con los datos reportados se puede decir que los sustratos menos susceptibles a la hidrólisis son los diésteres fosfato, aclarando que esta tendencia se debe en parte a los cambios en el mecanismo de la hidrólisis al ir de un sustrato a otro.

				
	acetato de metilo	monometil fosfato	dimetil fosfato	trimetil fosfato
velocidad relativa	1	2.5×10^{-9}	5.0×10^{-11}	1×10^{-3}
$t_{1/2}$	6 s	77 años	3850 años	1.7 h

Esquema 1.3

Finalmente, vale la pena mencionar que existe un grupo especial de fosfoésteres: los β -hidroxo, que tienen una reactividad mucho mas alta a la de sus análogos. Su alta reactividad se debe a la participación intramolecular del grupo OH²¹ que durante la hidrólisis permite la formación de un diéster cíclico intermediario con una reactividad muy alta debido a efectos de solvatación y parcialmente a la tensión del ciclo.²²

2. Catálisis en ruptura de ésteres y fosfoésteres

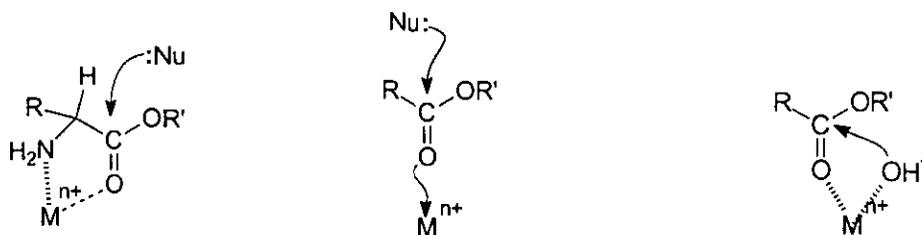
En términos generales se pueden considerar varios tipos de catálisis:²³⁻²⁵ ácido-base, nucleofílica (inter e intramolecular) y con metales.

Los datos publicados en la literatura muestran que la catálisis ácido-base general por sí sola es ineficaz para todos los tipos de ésteres fosfato. Para los ésteres de ácidos carboxílicos sólo es eficaz el mecanismo de la hidrólisis básica específica^{1,23} pues la poca basicidad de los ésteres hace que el intermediario (ácido conjugado del éster) sea extremadamente inestable. La catálisis ácido-base general únicamente ha llegado a observarse en ésteres carboxílicos muy activados y anhídridos.¹ La catálisis orgánica nucleofílica sólo se conoce para triésteres del ácido fosfórico y para ésteres de ácidos carboxílicos con buenos grupos salientes.^{6,17,23} Por ejemplo, para PNPA, es

posible medir la reactividad de nucleófilos tan débiles como TRIS ($1.2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), N-óxido de piridina ($4.17 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e incluso H_2O ($1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).²⁶ La catálisis nucleofílica intramolecular²⁷ es particularmente eficiente debido a la alta “concentración local” del nucleófilo junto al enlace fosforilo o carbonilo, y se ha observado para sustratos con grupos hidroxilo, grupos carboxilo desprotonados o amidas como nucleófilos internos.^{27,17}

En consecuencia, el principal enfoque para catalizar la ruptura de sustratos no activados es el uso de iones metálicos ya sea libres o complejados, con lo que se pueden lograr catalizadores que operen en condiciones muy variadas. Es importante mencionar que el diseño de muchos sistemas esterolíticos se ha basado en la forma de operar de metaloenzimas que catalizan procesos de hidrólisis y transferencia de fosfatos,²⁸ así como la hidrólisis de ésteres y amidas de forma tan eficiente, que en algunos casos la velocidad observada llega al límite impuesto por la difusión de las especies participantes.²⁹

La catálisis de la ruptura de ésteres de ácidos carboxílicos se ha demostrado para diversos cationes metálicos y complejos (ver Antecedentes). En el esquema 2.1 se muestran los tipos de activación propuestos, donde el metal contribuye de tres formas: estabilizando el intermediario tetraédrico que se forma al romperse el doble enlace del grupo carbonilo, coordinado el sustrato y favoreciendo el ataque nucleofílico, y generando grupos OH^- que son muy buenos nucleófilos. Estas dos últimas formas de activación son esencialmente iguales a las que encontramos en los procesos enzimáticos.



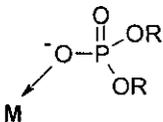
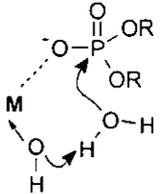
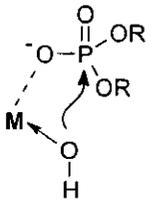
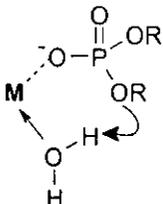
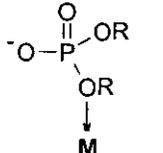
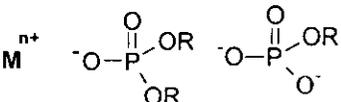
Esquema 2.1

Las formas de activación de los ésteres fosfato en presencia de iones metálicos, tabla 2.1, son similares a las presentadas en el esquema 2.1 para ésteres de ácidos carboxílicos. La activación puede comprender una o varias de estas formas en función del tipo de sustrato, del metal, del nucleófilo y del mecanismo por el cual se lleve a cabo la ruptura.

Es importante señalar que se ha observado que existe una correlación, para varios tipos de catalizadores, entre su actividad en la hidrólisis de fosfatos y su actividad con ésteres de ácidos carboxílicos que son más reactivos. Una de las explicaciones que se ha dado es que debido a que

tanto el grupo carbonilo como el fosforilo son sitios duros, los factores que modulan un ataque nucleofílico a un centro C=O deberían ser iguales o al menos muy similares para un centro P=O. Con base en esta hipótesis, se ha estudiado la ruptura de ésteres de ácidos carboxílicos como pruebas preliminares de actividad para encontrar nuevos catalizadores contra sustratos menos activados, como los fosfoésteres.

Tabla 2.1. Activación de la ruptura de ésteres fosfato con iones metálicos.^{18,30,31}

Activación directa	Activación indirecta	
Coordinación de los oxígenos fosforil con el metal (Activación como ácido de Lewis)		Hidróxidos coordinados al ion metálico. Catálisis básica general 
Coordinación de un nucleófilo al metal (Activación nucleofílica)		Agua coordinada al metal: catálisis ácida general intramolecular 
Coordinación del oxígeno del grupo saliente con el metal. (Activación del grupo saliente)		Activación por interacción electrostática 

Por otro lado, como la hidrólisis es una sustitución nucleofílica, es posible diseñar sistemas cambiando el agua por otro nucleófilo capaz de romper enlaces RC(O)-OR' y (RO)₂P(O)-OR'; en muchos sistemas prácticos la ruptura de fosfatos o carboxilatos no es hidrolítica. Una opción es transferir el grupo acilo o fosforilo del sustrato al nucleófilo empleado, sin una recuperación posterior del nucleófilo. Otra opción más interesante es utilizar nucleófilos altamente reactivos que puedan completar ciclos catalíticos, y que el mismo ion metálico pueda funcionar como un catalizador de la hidrólisis del nucleófilo acilado o fosforilado. Así, resulta sensato emplear α -nucleófilos³² que tienen en su estructura átomos donadores de electrones adyacentes al átomo nucleofílico (en posición α) y muestran una reactividad mayor que la que se deduce de su basicidad. Ejemplos de estos nucleófilos son peróxidos (R-O-O'), hidrazinas (R=N-N=R), hidroxilamina y oximas (R=N-O').

En este trabajo se estudió la ruptura de ésteres fosfato con grupos sustituyentes 4-nitrofenílicos: MNPP (fosfomonoéster), BNPP (fosfodiéster) y PNPDP (fosfotriéster), (ver sección 7.2) que son sustratos típicamente empleados para estudios de actividad de fosfoesterasas y permiten hacer comparaciones con otros sistemas relevantes. Por la misma razón, como éster derivado de ácido carboxílico, se estudió la ruptura del 4-nitrofenil acetato (PNPA). Frente a los sustratos mencionados se estudiaron dos tipos de nucleófilos: agua (hidrólisis) y derivados de hidroxilamina (oximinólisis). En ambos casos la desprotonación de un nucleófilo neutro provee aniones OH^- o R_2NO^- y es acompañada de un gran aumento en la reactividad ($\sim 10^{10}$ veces).

De lo anteriormente expuesto, resalta que los iones metálicos son capaces de estabilizar estos aniones por coordinación y este es uno de los factores más importantes en la catálisis. La formación de complejos hidróxido es bien conocida pero la formación de NH_2O^- (un nucleófilo fuerte por efecto α) por coordinación no ha sido reportada. Nuestros intentos para promover la formación de aniones NH_2O^- fueron infructuosos y por ello trabajamos con derivados orgánicos de la hidroxilamina: oximas. Para conseguir una coordinación del grupo oxima se preparó un derivado de la piridina. Sus complejos de Cd(II), Zn(II), Mn(II), y Pb(II) son muy activos frente al éster carboxílico PNPA³³ y se encontró que tienen una reactividad notable con fosfodiésteres pero solamente a temperatura muy elevada. Otro derivado empleado fue una α -cetoxima, que es capaz de formar complejos con los cationes de lantánidos. La reactividad fosfodiesterolítica de estos complejos fue alta pero inferior a la de la reactividad de los hidroxocomplejos de lantánidos, los cuales fueron estudiados con más detalle.

Los cationes de lantánidos con frecuencia se usan como acuoiones que tienen una baja estabilidad debido a su precipitación como hidróxidos, y por otro lado se usan los complejos con ligantes macrocíclicos que se enlazan tan fuertemente a los cationes que con frecuencia llevan a su desactivación. En este trabajo probamos series de ligantes acíclicos aminoalcohólicos que pertenecen a un grupo de “amortiguadores biológicos” y encontramos que TRIS y aún mejor BisTris propano (BTP) pueden estabilizar cationes de lantánidos en medios básicos, donde se forman hidroxocomplejos, sin una pérdida significativa de su electrofilia y sin precipitación de los correspondientes hidróxidos. Con estos ligantes la catálisis fue efectiva a temperatura ambiente en presencia de Y(III) y lantánidos (III). El último sistema resultó ser activo también en la ruptura de ADN.

ANTECEDENTES

3. Reactividad esterolítica y fosfoesterolítica de nucleófilos libres

Existen diferencias importantes en la reactividad entre los ésteres carboxílicos y fosfatos y una de estas diferencias es la baja sensibilidad de los fosfatos a la basicidad de los nucleófilos. Una forma sencilla de analizar la relación que existe entre la reactividad de un nucleófilo y su basicidad es graficar el logaritmo de la constante de velocidad observada en función del pK_a de su ácido conjugado (coordenadas de Brønsted). Para nucleófilos del mismo tipo se han encontrado correlaciones lineales cuya pendiente puede ser interpretada como una medida de la afinidad relativa del nucleófilo hacia el sustrato en el estado de transición (con carga positiva) reflejada en $\log k_{obs}$, comparada con la afinidad del nucleófilo hacia el protón reflejada en el pK_a . Cuando la pendiente de esta correlación es igual a 1, la interacción del sustrato en el estado de transición con el nucleófilo es predominantemente electrostática implicando un mecanismo tipo base general; si la pendiente es cero, quiere decir que la etapa limitante de la velocidad no incluye al nucleófilo o bien hay factores que compensan la nucleofilia y la basicidad del nucleófilo.

En el caso de los monoésteres fosfato, la reactividad del nucleófilo casi no depende de la basicidad de éste. Por ejemplo si se comparan aminas primarias como nucleófilos en la ruptura de monoésteres fosfato, el valor de la pendiente de Brønsted es muy pequeño, ~ 0.2 ,^{23,34} y para otros tipos de aminas, este valor cambia muy poco y depende básicamente del grado de sustitución en el nitrógeno de la amina. En contraste, la naturaleza del grupo saliente juega un papel importante y las reacciones de hidrólisis para fosfoésteres son particularmente sensibles a la basicidad del grupo saliente.^{23,35,20} Esta gran sensibilidad se refleja en valores de la pendiente del $\log k_{hid}$ vs. el pK_a del ácido conjugado del grupo saliente cercanas a 1: para monoaniones de fosfodíesteres es de -0.97 ($k_{hid} \text{ min}^{-1}$, a 100°C)²⁰ y para dianiones de monoésteres fosfato es de -1.23 ($k_{hid} \text{ min}^{-1}$, a 39°C).³⁶ En la hidrólisis de fosfoésteres monosustituídos esta alta dependencia puede interpretarse como el poco grado de formación de enlace con el nucleófilo en el estado de transición y una gran contribución de la ruptura del enlace del grupo saliente; se ha postulado que posteriormente se rompe el enlace del grupo saliente y se forma el ion metafosfato como intermediario.^{36,37}

Debido a que los fosfoésteres son mucho menos reactivos que los ésteres de ácidos carboxílicos, hay pocos nucleófilos que permiten comparar la reactividad del mismo nucleófilo hacia varios ésteres. Existen datos de las constantes de velocidad de hidrólisis de ésteres y fosfoésteres en presencia de OH^- como nucleófilo (hidrólisis alcalina), aunque pocos de ellos son comparables entre sí porque las constantes observadas de primer orden están reportadas a diferentes condiciones. En la Tabla 3.1 se muestran algunos ejemplos de constantes de segundo orden para OH^- a la misma temperatura, y se incluyen algunas constantes de velocidad de hidrólisis espontánea (H_2O , pH neutro), que para varios fosfoésteres es tan lenta que no es posible medirla o estimarla.

Tabla 3.1. Hidrólisis alcalina e hidrólisis espontánea de ésteres y fosfoésteres a 25°C

No.	Sustrato	$k_{\text{OH}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{H}_2\text{O}} (\text{s}^{-1})$	Ref.
1	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$	1.32×10^{-5}		38
2	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{PO}$	6.67×10^{-3}		38
3	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{PO}$	5.17×10^{-1}		38
4	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{PO}$	3.33×10^2		38
5	$(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{PO}$ PNPDP	0.35	9.7×10^{-6}	39
6	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}^-$ BNPP	5.83×10^{-6}	1.1×10^{-11}	38
7	$(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O})\text{P}(\text{O})(\text{O})_2$ MNPP		1.55×10^{-8} ^b	35, 40
8	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{CO}(\text{CH}_3)$	0.11	2.5×10^{-10}	41
9	$(4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O})\text{CO}(\text{CH}_3)$ PNPA	9.5 (14.83)	5.5×10^{-7}	42 (26)
10	$\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{O})(\text{OC}_6\text{H}_4\text{-NO}_2\text{-4})$ PNPMP ^a	2.3×10^{-5}	2.0×10^{-9}	43
11	$(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})\text{CO}(\text{CH}_3)$	1.27	1.2×10^{-7}	42, 41
12	$(2,4\text{-(O}_2\text{N)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{O})\text{CO}(\text{CH}_3)$	53.67	6.7×10^{-4}	42, 41
13	ADN _{SE}		$\leq 1 \times 10^{-11}$	44
14	ARN		2×10^{-11}	45
15	ADN	$\approx 1 \times 10^{-12}$	$\leq 1 \times 10^{-16}$	10,45,46
16	Anhídrido acético	967		42

^a 30°C, ^b 39°C

La reactividad de OH^- es mayor hacia fosfoésteres trisustituídos y menor hacia los disustituídos. Para un mismo tipo de fosfoéster, la constante de velocidad depende notoriamente de los grupos sustituyentes: al cambiar los grupos alcoxo de un fosfotriéster (renglón 1, Tabla 3.1) por un mejor grupo saliente, como 4-nitrofenol (renglón 4, Tabla 3.1), hay un incremento de 7 órdenes de magnitud, el cambio de un solo grupo da un efecto de 500 veces (renglones 1 y 2, Tabla 3.1). La activación del grupo saliente de un éster da un cambio moderado en la constante

de velocidad relativa: fenolato < nitrofenolato < dinitrofenolato ($1 < 10 < 50$). Además de los ésteres fosfato también se usan como sustratos los fosfonatos que tienen una reactividad un poco más alta que los fosfatos correspondientes (Tabla 3.1).

Para fosfoésteres cíclicos, omitidos en la tabla 3.1, la diferencia en reactividad frente a la hidrólisis alcalina comparada con los ésteres acíclicos es muy grande. Por ejemplo, la hidrólisis alcalina del enlace P-O para etilénfosfato transcurre al menos 10^8 veces más rápido que la misma reacción para su análogo acíclico, dimetilfosfato.^{48,49} Esta diferencia refleja alguna distorsión o desestabilización que obliga al sustrato inicial a ir hacia el estado de transición sumado a un cambio en la solvatación.²² Este hecho es importante ya que, si en la hidrólisis de fosfodiésteres es posible lograr que el intermediario catalizador-sustrato se asemeje a un fosfodiéster cíclico al pasar por el estado de transición, es muy posible lograr un efecto catalítico en su ruptura.

La comparación de diferentes nucleófilos en la ruptura del éster PNPA y el fosfonato PNPMP, que son sustratos modelo que han servido de referencia para muchos sistemas, se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Reactividad de nucleófilos hacia PNPA a 25°C, $I=1.0$ M,²⁶ y hacia PNPMP a 30°C.⁴³

No.	Nucleófilo	pK _a	k _{Nu} : (M ⁻¹ s ⁻¹)	
			PNPA	PNPMP
1	H ₂ O	-1.7	1.0×10^{-8}	3.55×10^{-11}
2	OH ⁻	15.7	14.83	2.3×10^{-5}
3	CH ₃ O ⁻	15.7	683	
4	CH ₃ CH ₂ O ⁻	16.0	253	
5	C ₆ H ₅ O ⁻	10.0	1.75	2×10^{-7}
6	TRIS	8.1	0.0012	
7	Hidroxilamina	6.0	1.83	5.5×10^{-5} ^b
8	NH ₂ O ⁻	13.74	3.65×10^4 ^a	
9	N,N-dimetil hidroxilamina	5.2	0.18	
10	N-óxido de trimetilamina	4.6	1.47×10^{-5}	
11	5-Metil-1,2,3-ciclohexanotrioxima	8.0	14.67	
12	5-Metil-1,2,3-ciclohexanotriona 1,3-dioxima	8.3	34.50	
13	Acetoxima	12.4	61.67	
14	Salicilaldoxima	9.2	53.33	
15	Piridina	5.4	0.0017	1.1×10^{-7}
16	F ⁻	3.1	1.7×10^{-5}	1.2×10^{-5} ^b
17	PO ₄ ³⁻	6.9	0.00012	

^a Ref.50, ^b 60°C.

Esta comparación permite predecir cuáles serán los mejores nucleófilos para los fosfoésteres, considerando que como el carbonilo y el fosforilo son sitios duros, deberían seguir la misma tendencia. De estos datos, es claro que la reactividad depende de la naturaleza del nucleófilo y no únicamente de su basicidad (renglones 6, 7, 11, 12, Tabla 3.2).

Llama la atención que la reactividad de los aniones alcoholato (RO^-) es superior a la de su "análogo" inorgánico (OH^-): son cerca de 45 veces más reactivos pese a que la diferencia entre sus valores de $\text{p}K_a$ es mínima. En el caso de hidroxilamina, la sustitución en el átomo de N causa una disminución en la reactividad (renglones 8-10, Tabla 3.2). Para oximas, la diferencia entre sustituyentes aromáticos y alifáticos da una diferencia notable en sus constantes de disociación ácida pero no afecta su nucleofilia (renglones 13 y 14, Tabla 3.2). Es notoria la reactividad de la hidroxilamina en su forma desprotonada NH_2O^- (renglón 8, Tabla 3.2); también se ha reportado su reactividad con fosfotriésteres como sustratos,⁵⁰ pero no con fosfodiésteres.

Aunque para un gran número de nucleófilos existe una correlación lineal entre su basicidad y su reactividad (*vide supra*), algunos aniones nucleofílicos (por el átomo oxígeno) muy básicos salen de esta correlación lineal y muestran una tendencia a "nivelarse": un incremento en la basicidad no incrementa la reactividad (ver Fig.3.1).^{24, 51} Su gran reactividad se atribuye en parte a la blandura o a la polarizabilidad de estos reactivos. En el caso de grupos $\text{R}_2\text{N-O}^-$ la correlación de Brønsted muestra una dependencia lineal con pendiente cercana a 1 si los ácidos conjugados tienen un valor de $\text{p}K_a$ menor que 8 y muestra una "nivelación" (pendiente cero) para aniones más básicos,⁵¹ Figura 3.1. Como veremos más adelante, este comportamiento es altamente favorable para lograr una cooperación eficiente entre el nucleófilo y el ion metálico.

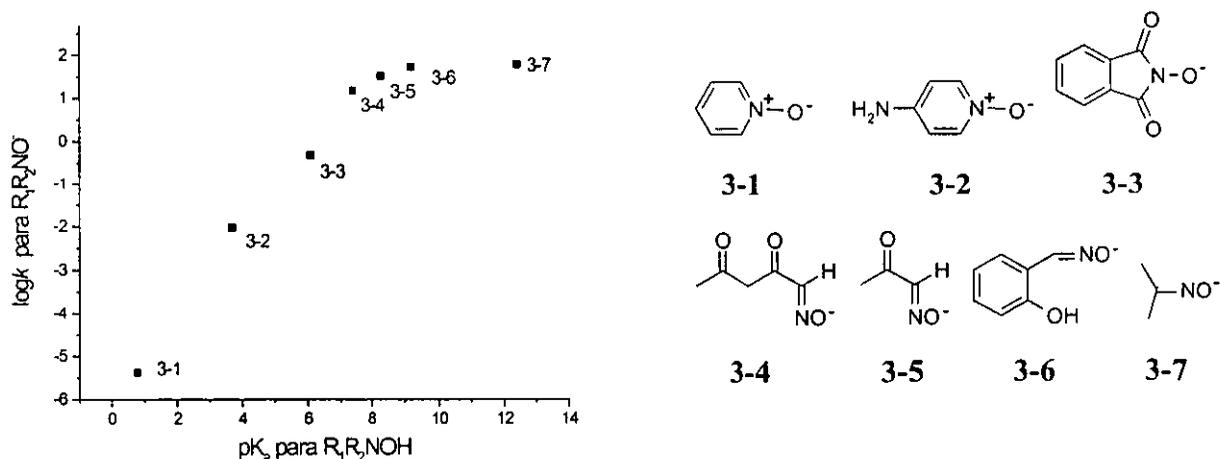
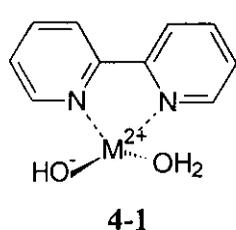


Fig.3.1. Relación entre la nucleofilia (k_{Nu} : $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la hidrólisis de PNPA) y el $\text{p}K_a$ del ácido conjugado para nucleófilos $\text{R}_1\text{R}_2\text{N-O}^-$ (datos experimentales de Ref.26)

4. Complejos reactivos y sus equilibrios en disolución acuosa

Uno de los objetivos al emplear complejos de iones metálicos en la hidrólisis de ésteres y fosfoésteres, es que los ligantes confieran suficiente estabilidad a los acuocaciones o a sus hidroxocomplejos impidiendo la precipitación de sus hidróxidos y que esta interacción no decremente la reactividad de los nucleófilos coordinados; la modificación en la densidad electrónica de un grupo nucleofílico depende del ion metálico con el que se coordine.

Entre los ligantes más empleados están las aminas: diaminas, triaminas, poliaminas, y en sus formas cíclicas y acíclicas. Los complejos de diaminas y triaminas con cationes metálicos de transición como Cu(II), Co(III), Ni(II), etc. son muy estables (K_{ML} hasta $\sim 10^{10}$). Se ha observado que los ligantes diamino favorecen la formación de especies hidroxodiméricas en disolución al incrementarse el pH¹⁸ mientras que con triaminas las especies en disolución son predominantemente monoméricas. Para ligantes nitrogenados derivados de piridina, como **bipy** y **phen**, sucede algo similar. Si se coordinan varios ligantes con el metal, saturando las posiciones de coordinación, los complejos resultantes no tienen reactividad hidrolítica, y si coordina un solo ligante con el metal permitiendo la formación de hidroxocomplejos al ir hacia disoluciones básicas, se forman especies diméricas.⁵²⁻⁵⁴ Por ejemplo, en el caso de Cu(II):



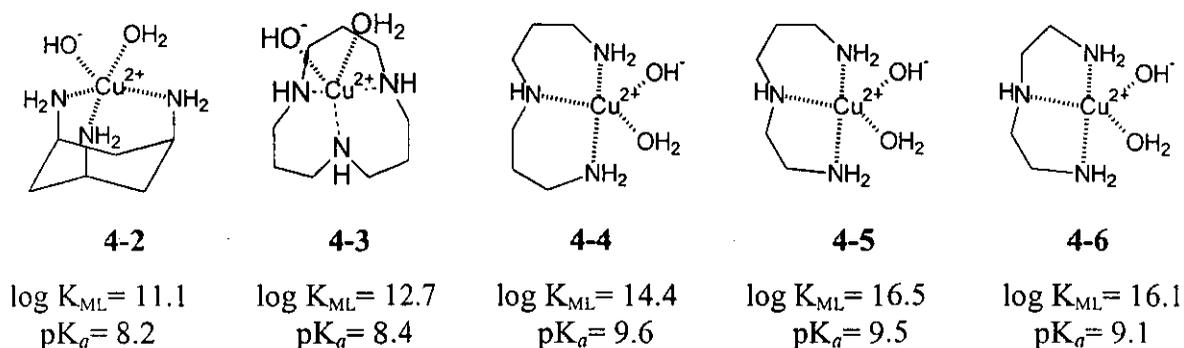
	bipy	phen
$\log ([CuL]/[Cu][L])$	6.3	7.4
$\log ([CuL]/[CuOHL][H])$	7.9	$[CuL]/[Cu(OH)_2L][H]^2$ 17.3
$\log ([Cu(OHL)_2][H]^2/[CuL]^2)$	-10.8	-10.7

De los valores de estas constantes, es claro que la fracción de los complejos hidroxocomplejos monoméricos como **4-1**, con potencial esterolítico o fosfoesterolítico, es muy baja.

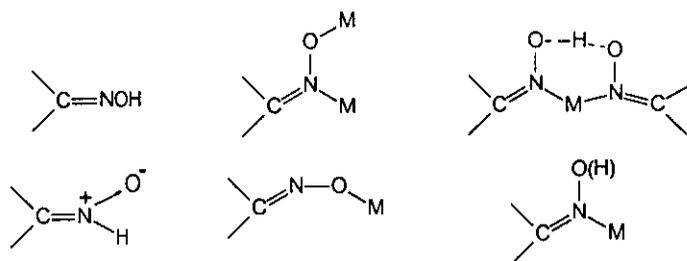
En el caso de los lantánidos, los ligantes acíclicos donadores de nitrógeno, no son una buena opción, aunque se han observado interacciones con nitrógenos muy básicos en estado sólido o disolventes no acuosos.⁵⁵ Por ejemplo, las constantes de formación ($\log K_{ML}$) de **bipy** con lantánidos (III) en disolución acuosa (La 0.8, Pr 0.9, Nd 0.9, Gd 0.8, Dy 0.9) son muy pequeñas comparadas con las de metales divalentes.⁵⁶

Generalmente, las constantes de disociación ácida de compuestos de coordinación se refieren a la pérdida de un protón de una molécula de agua de coordinación. Esto puede verse en

los complejos de Cu(II) 4-2 a 4-6: el valor de K_a muestra variaciones de un orden de magnitud, mientras que los valores de K_{ML} varían en 4-5 órdenes.⁵⁷ La estructura de rayos X de los complejos diméricos muestra que se encuentran unidos por grupos OH puente. Los diagramas de distribución de sus especies muestran que al ir hacia valores de pH básicos hay dos especies predominantes: LCu^{2+} que disminuye y $LCu(OH)^+$ que aumenta junto con el pH.

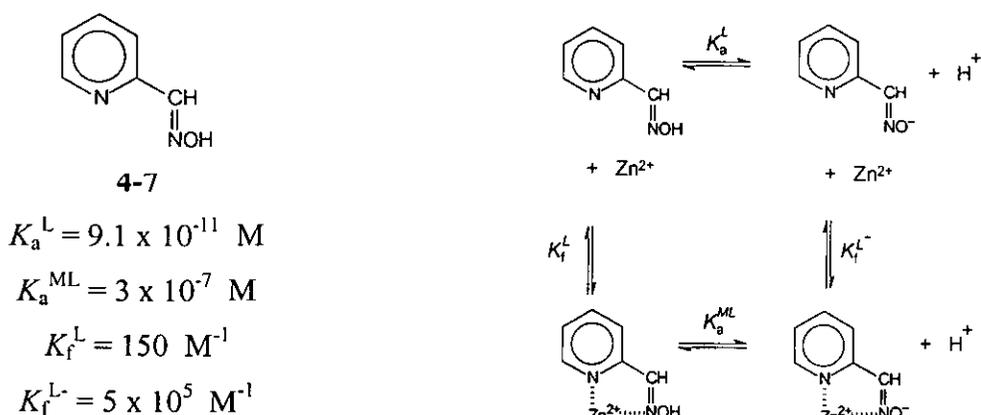


Las oximas tienen varias formas de interacción con un catión metálico (*Esquema 4.1*)⁵⁸ y la posibilidad de generar un nucleófilo muy fuerte por coordinación: el ion oximato.



Esquema 4.1

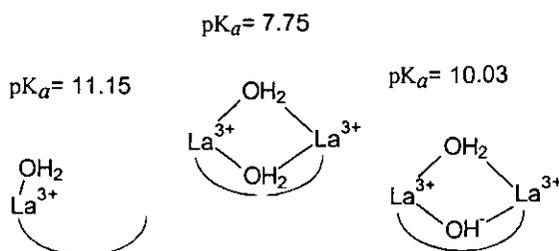
La formación de complejos de Zn(II) con 2-piridin aldoxima (4-7 y *Esquema 4.2*) fue estudiada por el grupo de Breslow.⁵⁹ Como se esperaba hay una considerable acidificación de la oxima por coordinación con el Zn(II), $\Delta pK_a = -3.5$. Este efecto también se observa con otros metales, por ejemplo, para Fe(II) $\Delta pK_a = -3.09$.



Esquema 4.2

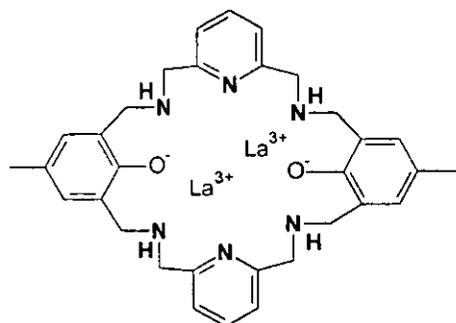
El uso de ligantes macrocíclicos en la formación de complejos reactivos frente a la hidrólisis de ésteres y fosfoésteres, ha permitido determinar el tipo de especies en disolución y algunos aspectos fundamentales de su reactividad, como el efecto de los grupos alcoholato como nucleófilos y la cooperación entre dos cationes metálicos. Estos macrociclos, generalmente forman complejos “inertes” en disolución acuosa: su estabilidad cinética es de varias semanas a pH cercano a la neutralidad y temperaturas entre 25-50°C.⁶⁰ La selectividad hacia los cationes depende en gran medida de su tamaño y del tipo de átomos donadores que contengan.⁶¹

Un ejemplo es el estudio detallado de las especies que se forman en disolución acuosa del macrociclo (4-8) con La(III).⁶² El ligante tiene seis grupos ionogénicos (4 aminas secundarias y 2 fenoles) con valores de pK_a 4.38, 5.76, 7.39, 8.24 (determinados por potenciometría) y 12.84, 12.95 (determinados por espectrofotometría). Los valores de pK_a de sus complejos mononuclear y dinuclear con La(III) son muy diferentes: el pK_a del primero es 11.15 y el pK_a del segundo es 7.75, implicando que la segunda molécula de agua que se desprotona funciona como puente entre ambos iones lantánidos.

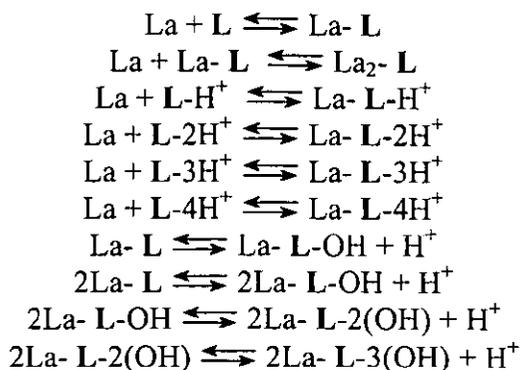


Esquema 4.3

Las especies predominantes a pH entre 8-10, donde se observa reactividad, son dinucleares: $\text{La}_2(\mathbf{4-8})\text{OH}$ y $\text{La}_2(\mathbf{4-8})(\text{OH})_2$. El esquema de sus equilibrios en disolución es:

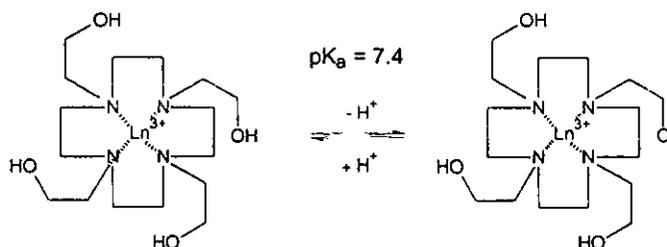


4-8 (L)



Los aniones alcoholato son muy buenos nucleófilos ²⁶ pero los grupos alcohol tienen constantes de disociación ácida muy pequeñas ($\sim 10^{-16}$ M para alcoholes alifáticos)⁶³ por lo que el uso de alcoholatos como nucleófilos en la hidrólisis de ésteres y fosfoésteres no es posible a condiciones de pH cercanos a la neutralidad donde la concentración de estos nucleófilos es prácticamente cero. Una opción para generar nucleófilos RO⁻ a valores de pH moderadamente básicos o neutros es emplear un ion metálico como ácido de Lewis.

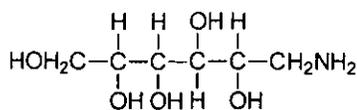
Se han reportado algunos complejos macrocíclicos diseñados particularmente para lantánidos, de tal forma que 8 posiciones de coordinación son ocupadas por el ligante y el metal completa su esfera de coordinación con pocas moléculas de agua. En estos sistemas, la introducción de grupos alcohol pendientes del macrociclo permite que, al coordinarse el alcohol con el metal, se acidifique lo suficiente para desprotonarse a valores de pH cercanos a la neutralidad, aumentando su potencial como nucleófilo. Por ejemplo, el valor de pK_a del complejo [Ln(THED)]³⁺ (4-9) es de 7.4.⁶⁴ La existencia de este alcoholato se confirmó posteriormente con estudios de resonancia magnética de ³¹P, en donde puede observarse el alcoholato fosforilado como producto.



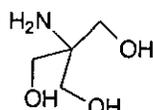
4-9

Vale la pena mencionar que se ha reportado el uso de sencillos aminopoliololes como ligantes: Glucamina 4-10,⁶⁵ Tris 4-11,⁶⁶ TACI (1,3,5-triamino-1,3,5-tridesoxi-*cis*-inositol) 4-12 y TDCI (1,3,5-tridesoxi-1,3,5-tris-(dimetilamino)-*cis*-inositol) 4-13 ⁶⁷, para estabilizar en

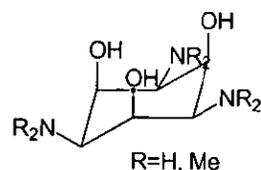
disolución acuosa cationes con carga muy alta, como Zr(IV), aunque prácticamente no hay información de las especies que se forman en disolución.



4-10



4-11

TACI (H) 4-12
TDCI (Me) 4-13

5. Reactividad de los complejos en la hidrólisis de ésteres y fosfoésteres

El empleo de complejos metálicos en la hidrólisis de ésteres fosfato y de ácidos carboxílicos es un área de investigación muy activa.^{30,31,67-72} Los sistemas empleados son muy variados, e incluyen desde el uso de óxidos y sesquióxidos minerales,^{73,74} anticuerpos,⁷⁵ sistemas micelares,^{7,76,77} microemulsiones,⁷⁸ compuestos organometálicos,^{79,80} complejos de porfirinas,¹⁴ ciclodextrinas,^{59,81,88} complejos intercaladores de ADN⁸² o complejos macrocíclicos,⁶² hasta complejos más sencillos con aminas,^{78,83} oximas,⁸⁴ etc., en los cuales se encuentran incluidos cationes de metales de transición, lantánidos, actínidos⁸⁵ e incluso cationes como Bi(III)⁸⁶ o Pd(II).⁸⁷

5.1. Complejos metálicos divalentes y Co(III)

Los estudios de hidrólisis de ésteres y fosfoésteres con complejos de cationes metálicos divalentes incluyen sobretodo metales de la primera serie de transición, particularmente Cu(II) y Co(III), así como Zn(II); muchos de estos sistemas son modelos estructurales de metaloenzimas.

El intenso estudio de la reactividad de complejos de Co(III) ha aportado una valiosa información respecto a los mecanismos de reacción, ya que por formar complejos inertes ofrecen posibilidades de explorar varios tipos de activación; sin embargo tienen la gran desventaja de dar productos de transesterificación, lo que descarta la posibilidad de que operen catalíticamente. Los sistemas con Cu(II) tienen, en general, menor reactividad que los de Co(III), pero varios de ellos son capaces de romper más de una molécula de sustrato.⁸⁸ El mecanismo fosfoesterolítico propuesto para algunos de estos sistemas implica la estabilización del estado de transición del

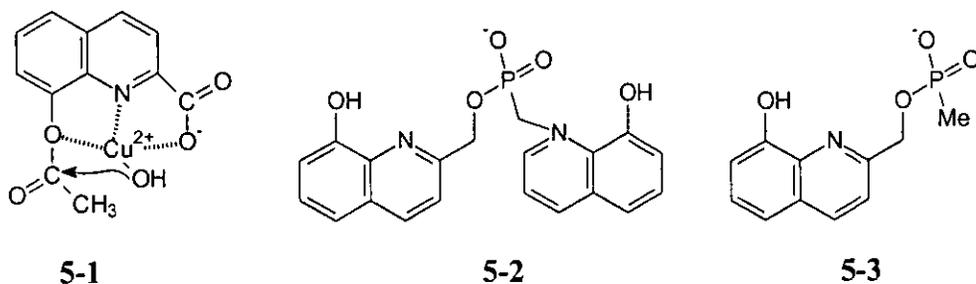
sustrato, donde el metal forma un intermediario cíclico de 4 o 5 miembros con los dos oxígenos del fosfato.⁸⁹ La mayoría de los sustratos estudiados con estos sistemas están muy activados y la reactividad hacia fosfodiésteres ha sido estudiada con sustratos que contienen un potencial nucleófilo intramolecular, como los ésteres fosfato derivados del glicerol (utilizados como modelos de ARN), y con ADN_{SE} .

Los estudios con estos iones metálicos reportados en la literatura se pueden agrupar, por los efectos estudiados en: coordinación directa con los sustratos, activación de OH^- como nucleófilo, cooperación ácido base, reconocimiento del sustrato, activación de otros nucleófilos por coordinación, y cooperación en complejos dinucleares

5.2. Coordinación directa con los sustratos

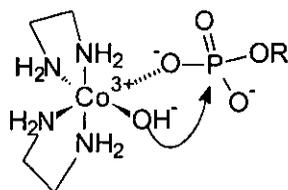
En el caso particular de la catálisis por coordinación directa de catión metálico con el éster, la activación depende de la estructura del sustrato y, obviamente, de su habilidad para coordinar iones metálicos. Se ha observado que la coordinación de un ion metálico genera nucleófilos intramoleculares: RO^- para sustratos tipo ARN y OH^- para otros sustratos. En ambos casos el efecto de aceleración esterolítico o fosfoesterolítico es muy grande.

Por ejemplo, el efecto de iones metálicos, como Cu(II) , para promover la hidrólisis del éster 8-hidroxiquinolina 2-carboxilato^{90a} (**5-1**) ha sido estudiado a detalle y se reportó que la presencia del ion metálico incrementa la velocidad de hidrólisis en *ca.* 10^8 veces; mientras que la 8-hidroxiquinolina en presencia de metales no se hidroliza.^{90b} Es importante mencionar que algunos de estos sistemas son muy sensibles a la naturaleza y número de iones metálicos. El éster **5-2** se coordina con dos iones La(III) y su velocidad de hidrólisis aumenta 10^{13} veces (k_{obs} es 1.36×10^{-3} y $\sim 5 \times 10^{-17} \text{ s}^{-1}$, respectivamente a pH 8.0 y 30°C), mientras que la presencia de cationes Ni(II) , Co(II) , Zn(II) , Cu(II) , Al(III) no tienen ningún efecto sobre la velocidad; además se comprobó que es necesaria la coordinación de dos iones La(III) ya que para **5-3**, que coordina un solo La(III) , no hay ningún efecto.⁹¹

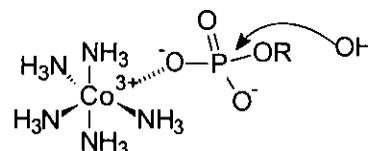


5.3. Activación de OH⁻ como nucleófilo

Uno de los primeros grupos en reportar catálisis fosfoesterolítica con complejos de Co(III) y aminas simples (en, trien o dien) fue el de Sargeson,¹⁸ estableciendo que la catálisis M-OH⁻ comparada con la hidrólisis alcalina es más efectiva en la hidrólisis de fosfoésteres:



5-4



5-5

Catálisis : $10^6 - 10^8$ veces

$10^2 - 10^3$ veces

pK_a [L₂Co³⁺(H₂O)] 7.3

H₂O 15.7

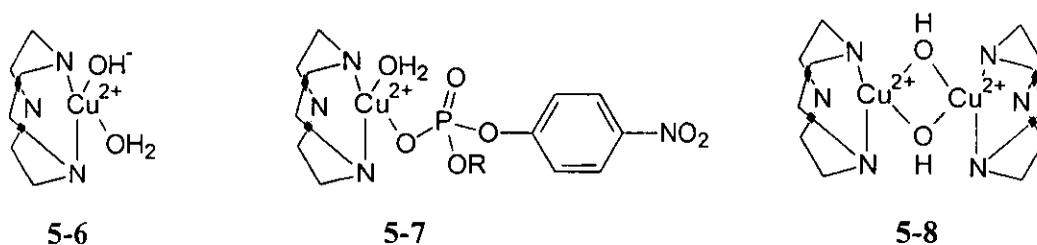
La coordinación de OH⁻ con Co(III) produce una disminución muy fuerte de su basicidad, como se al comparar el pK_a del agua coordinada y libre. Sin embargo, el ataque nucleofílico intramolecular de un OH⁻ menos básico (5-4) es más eficiente que un ataque intermolecular (5-5). Esto indica la gran importancia del efecto de aproximación entre los reactivos que se manifiesta también en la “molaridad efectiva” en reacciones orgánicas (ver Introducción).

El grupo de Chin descubrió que el complejo [(**ciclen**)Co(OH₂)₂]³⁺ produce una aceleración 10¹⁰ veces en la hidrólisis de dimetil fosfato comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea ($k_{\text{obs}}=2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ para el complejo y $k_{\text{obs}}=9.3 \times 10^{-17} \text{ s}^{-1}$ a pD 6.3 y 60°C)⁹. El mecanismo incluye el ataque nucleofílico al fosfato del ion OH⁻ coordinado, y aunque el sistema no es catalítico, la interpretación de este efecto tan dramático ha sido importante para el desarrollo de los sistemas catalíticos.

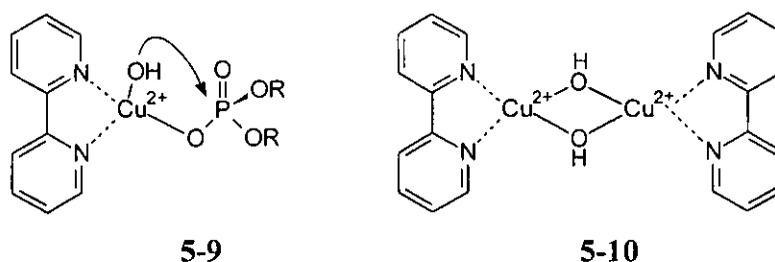
El grupo de Fujii realizó estudios con complejos de Cu(II) con poliaminas (4-2, 4-3 y 4-6, *vide supra*) en la hidrólisis del fosfodiéster (2,4-dinitrofeniletíl fosfato) y del fosfotriéster (2,4-dinitrofenildietil fosfato), sustratos muy activados.⁵⁷ Las constantes de velocidad observadas son 1000 veces mayores que las constantes de hidrólisis alcalina y la dependencia del pH de estas constantes concuerda con la curva de distribución para la especie LCu(OH)⁺, apoyando la participación del OH⁻ coordinado como nucleófilo.

Deal y Burstyn realizaron estudios detallados del complejo de otra poliamina cíclica Cu([9]**ane**N₃)Cl₂,⁷¹ que intercambia rápidamente sus cloruros por H₂O (5-6) y promueve la

hidrólisis de BNPP y ENPP. Respecto a la concentración del sustrato, el sistema se comporta con "saturación" (tipo Michaelis-Menten) formando un intermediario (5-7) y respecto al complejo, éste opera catalíticamente vía un mecanismo concertado; la constante de segundo orden para el hidroxocomplejo frente a BNPP es ca. de 100 veces mayor que para OH^- ($8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 35°C).^{92,93} Sin embargo, aunque la especie monomérica, que es catalíticamente activa, se forma a pH cercano a la neutralidad (pK_a 7.3 de datos cinéticos), se encuentra en muy pequeña proporción porque se forma una especie dimérica no activa (5-8, K_f 1220 M^{-1}). Young y Chin⁹⁴ demostraron que este complejo hidroliza dinucleótidos de ARN, y posteriormente se demostró que el complejo hidroliza sin especificidad ARN⁹⁵ y ADN⁵³ de una y dos hebras. La desventaja del sistema para estas aplicaciones es que en presencia de agentes reductores tiene también un modo de acción oxidativo $\text{O}_2/\text{Cu(I)}$ a pesar de la restricción geométrica que impone el ligante (Cu(I) debe estar coordinado tetraédricamente).

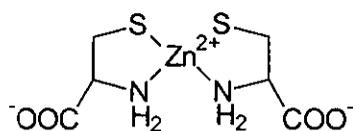


Morrow y Trogler⁹⁶ estudiaron la hidrólisis de tres fosfoésteres con el complejo $\text{Cu}(\text{bipy})^{2+}$ (4-1 y 5-9). Este complejo tiene reactividad sólo a temperatura elevada (para BNPP, MNPP y ENPP $k_{\text{obs}} = 2.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1.1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente a pH 8.0, 75°C). Los efectos de aceleración son moderados, del orden de 10^3 veces, sin embargo el complejo opera catalíticamente (ciclos de ~ 100 -1000 veces). Al incrementar la concentración, el complejo desprotonado se dimeriza y pierde su reactividad (5-10).

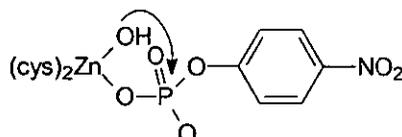


Los complejos de Zn(II) con glicina, histidina y cisteína (5-11) son catalizadores de la hidrólisis de MNPP a 40°C y pH entre 5-10. El efecto catalítico es moderado, sin embargo es

interesante porque se interpreta la reactividad con base en la acción concertada del catión metálico y un OH^- (5-12).⁹⁷ Ibrahim et.al.⁹⁸ estudiaron la hidrólisis de BNPP en presencia de complejos de Zn(II) con ligantes tipo tris(2-aminoetil)amina. La dependencia de k_{obs} en función del pH para dos complejos estudiados tiene una forma sigmoideal, y a partir de su análisis se atribuye la reactividad observada a la especie hidroxilo del complejo con Zn(II).



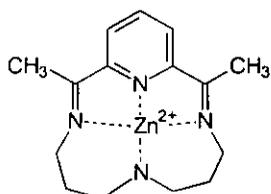
5-11



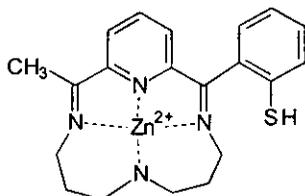
5-12

5.4. Cooperación ácido-base

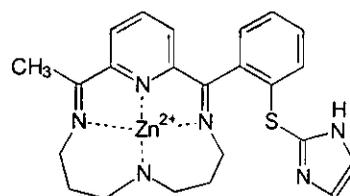
Breslow y colaboradores⁹⁹ estudiaron los complejos de Zn(II) 5-13, 5-14 y 5-15 con el fin de evaluar si existe una cooperatividad de los grupos tiofenol (5-14) e imidazol (5-15) no enlazados directamente al metal en la transesterificación del fosfoéster HPNP a pH 7.0 y 35°C. El efecto de aceleración observado respecto al complejo 5-13 es de 9 veces para el tiofenolato y 20 veces para el imidazol; a partir del análisis de k_{obs} en función del pH se propone que estos grupos funcionan como bases generales en la catálisis.



5-13



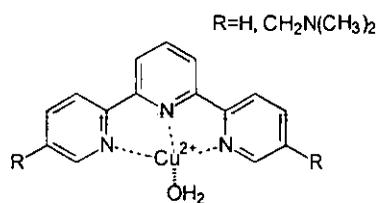
5-14



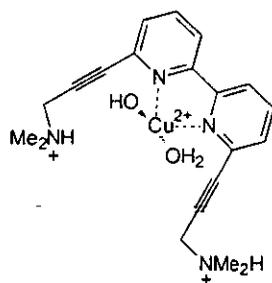
5-15

Jenkins *et.al.* reportaron que el complejo $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{OH}^-)]$ (5-16) promueve la transesterificación de ARN a pH 8.6 y 37°C.¹⁰⁰ Liu y Hamilton hicieron modificaciones enlazando aminas terciarias protonadas al ligante, con un incremento de 7 veces en la velocidad de hidrólisis de HPNP a pH 7.0.¹⁰¹ Jurek y Martell mostraron que 5-16 hidroliza BNPP;^{62,102} la dependencia de k_{obs} respecto a la concentración del complejo muestra una “saturación” tipo Michaelis-Menten, y el efecto de aceleración encontrado es muy modesto: 105 veces respecto a la hidrólisis espontánea. ($k_{\text{cat}} = 1.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 6.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ en 75% EtOH a pH 10.5, 35°C). Este ligante estabiliza al Cu(II) aún a valores de pH > 10. El pK_a del complejo en 75% EtOH es 9.8, y se asigna al agua que genera un OH^- nucleofílico coordinado al metal.

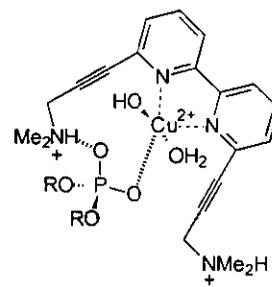
El complejo de Cu(II) (**5-17**) derivado de **bipy** fue estudiado por Kővári y Krämer.¹⁰³ La introducción del grupo N^+HR_2 da un efecto adicional de cooperatividad con el metal (**5-18**) y la reactividad encontrada hacia BNPP es 3400 veces mayor que la del complejo Cu(II)(**bipy**) a pH 6.6 ($k_{cat} = 4.4 \times 10^{-3} s^{-1}$, $K_M = 1.3 \times 10^{-2} M$ (pH 6.6, 95% EtOH); el efecto de cooperatividad es de 107 veces. Este complejo tiene tres grandes limitantes: no es muy soluble en agua (95% EtOH), precipita a pH > 6.8 y la hidrólisis es estequiométrica (un equivalente de MNPP disminuye >50% la velocidad de la reacción).



5-16



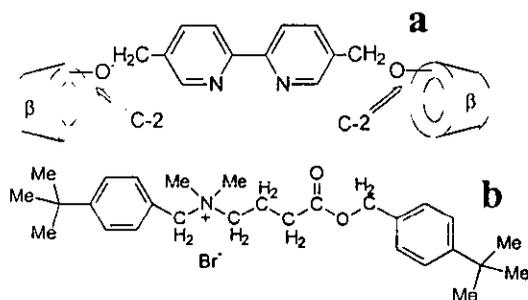
5-17



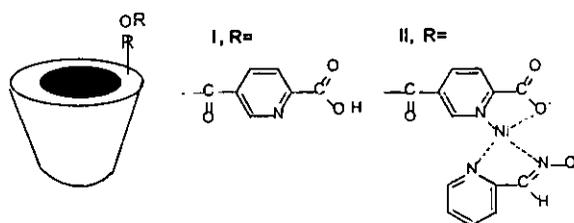
5-18

5.5. Reconocimiento del sustrato

Yan y Breslow⁸⁸ modificaron el ligante **bipy** uniéndole dos moléculas de β -ciclodextrina con espaciadores éter (**5-19a**) y con este ligante se estudió la hidrólisis de un éster que el ligante pudiera “reconocer” (**5-19b**) en disolución acuosa con 30% DMSO a pH 7.0, 25°C. En presencia de Cu(II) y **5-19a** la hidrólisis del éster **5-19b** es 1350 veces más rápida respecto a la hidrólisis espontánea del éster, por lo tanto, el reconocimiento molecular del éster por el catalizador, puede dar un efecto de activación.



5-19



5-20

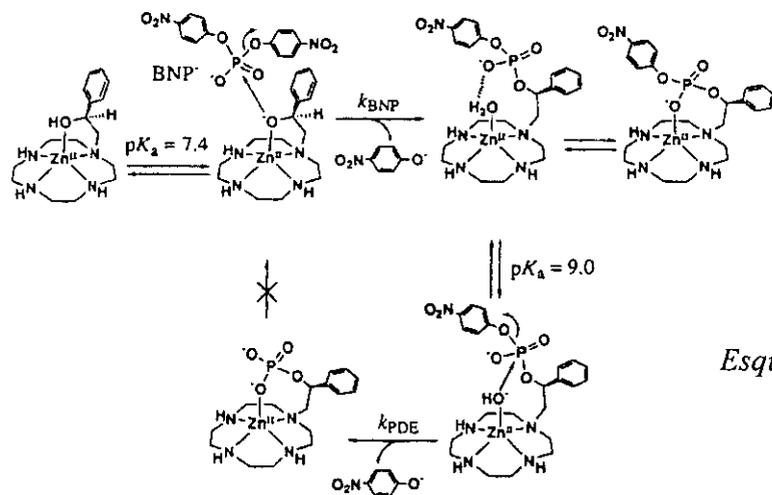
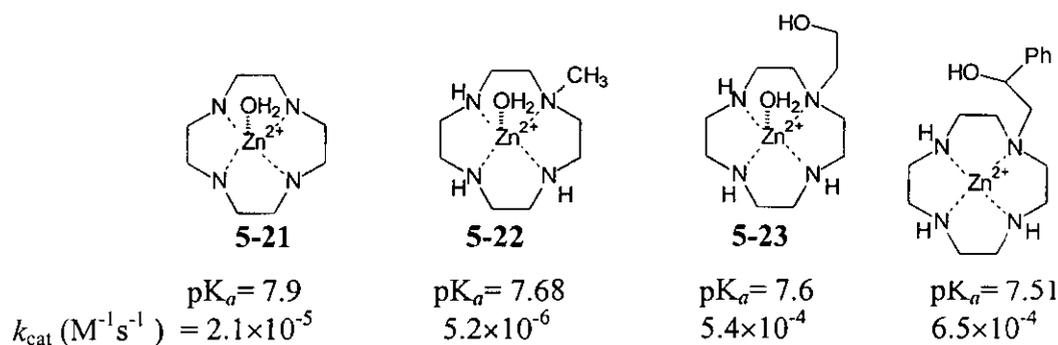
Breslow y Chipman⁵⁹ diseñaron el sistema (**5-20**) donde el nucleófilo es el anión oximato activado al formar un complejo ternario con Ni^{II} y la ciclohexamilosa provee una cavidad hidrofóbica para reconocer la parte aromática del sustrato (PNPA y 5-sulfonato de 8-acetoxiquinoleína). El reconocimiento aumenta la velocidad de hidrólisis más de 1000 veces

para PNPA ($k_{\text{obs}} = 2.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a 55°C para 2-piridinaldoxima- Ni^{II} , y $k_{\text{obs}} = 19.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 30°C para la ciclohexamilosa-2-piridinaldoxima- Ni^{II}).

5.6. Activación de RO^- como nucleófilo

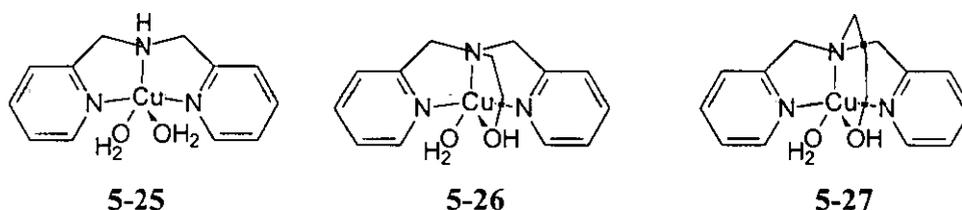
Para ésteres y fosfoésteres se ha encontrado que los alcoholatos son nucleófilos mucho más eficientes que el ion hidroxilo (ver Tabla 3-2) y se pueden activar por coordinación.

Kimura y Kodama¹⁰⁴ investigaron la reactividad de complejos de $\text{Zn}(\text{II})$ con tetraaminas macrocíclicas (5-21 a 5-24) en la ruptura de BNPP a 35°C con fin de evaluar grupos alcohol pendientes como nucleófilos. Los valores de pK_a de estos complejos varían en 0.4 unidades, mientras que las constantes catalíticas (k_{cat} en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) varían más de dos órdenes de magnitud, por lo tanto en el caso de 5-23 y 5-24 los nucleófilos no son grupos hidroxilo; la reactividad de 5-24 comparada con la de 5-21 indica que la presencia del grupo alcoholato causa un efecto de aceleración de 125 veces a pH 9.3, y se forma como producto final el complejo fosforilado. El mecanismo de reacción propuesto contempla dos ataques nucleofílicos: el primero por el alcoholato y el segundo por un grupo hidroxilo coordinado al $\text{Zn}(\text{II})$, esquema 5.1.



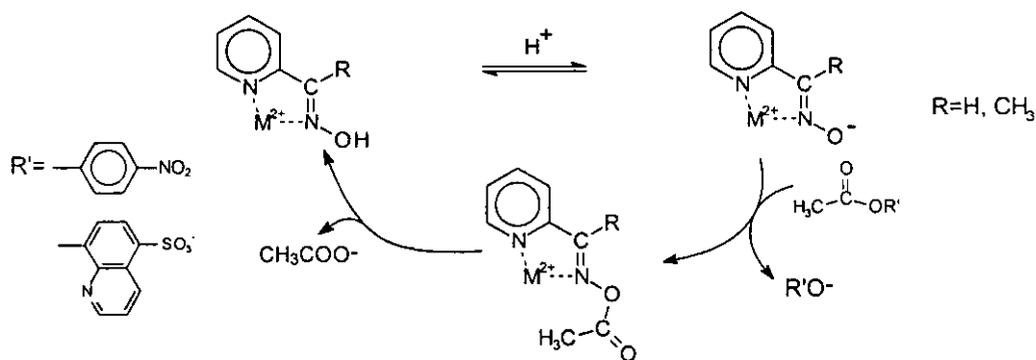
Esquema 5.1

Young *et.al.* trabajaron con complejos Cu(II) comparando la reactividad de dos nucleófilos: alcoxo e hidroxilo (5-25-5-27).¹⁰⁵ Los pK_{as} de los complejos son muy parecidos (9.0, 8.9 y 8.8 respectivamente) mientras que la reactividad del complejo hidroxipropil es 37 veces mayor que el la del complejo hidroxilo en la ruptura de BDNPP ($k= 0.72 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente a 25°C , pH 8.8). Si la cadena del grupo alcoxo es más corta no se forma el alcoholato coordinado y la reactividad disminuye ($k= 9.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Sin embargo, el nucleófilo alcoxo forma el producto de transesterificación sin completar ciclos catalíticos y si el fosfodiéster no tiene buenos grupos salientes, el complejo hidroxilo es más activo.



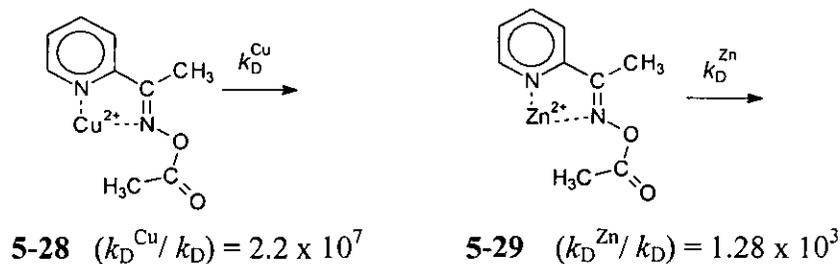
5.7. $R_1R_2C=N-O^-$ como nucleófilo

Los aniones oximato, con reactividad nucleofílica similar al OH^- , han sido estudiados en la hidrólisis de varios ésteres. Por ejemplo, la reactividad esterolítica de complejos de cationes metálicos divalentes con 2-piridinaldoxima en la ruptura de PNPA y del 5-sulfonato de 8-acetoxiquinoleína,⁵⁹ muestran un efecto de aceleración de 100 veces para PNPA y mucho mayor para el éster derivado de quinoleína, comparando el complejo con el ion oximato a pH neutro. En este trabajo se demuestra que el nucleófilo es el grupo oximato que forma un compuesto intermediario O-acilado del oximato y posteriormente se hidroliza; se propone un mecanismo general de esterólisis en presencia de oximas (*Esquema 5.2*).



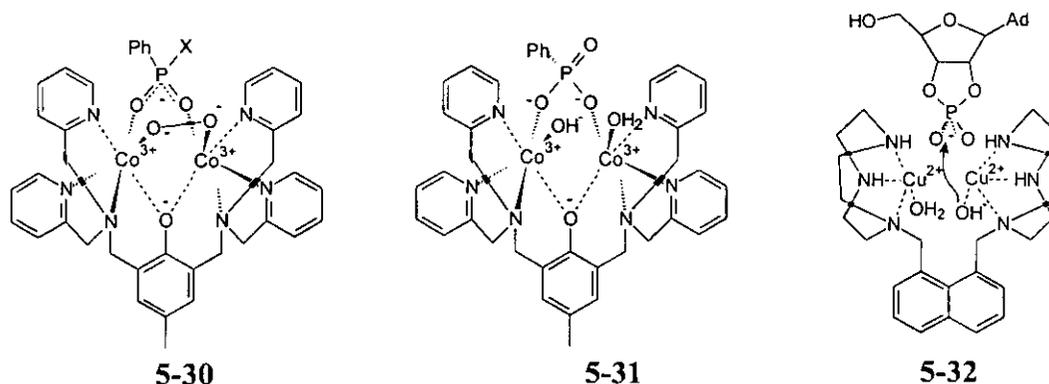
Esquema 5.2

Posteriormente, Suh y colaboradores ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ comparan el efecto de los iones Zn(II) y Cu(II) en la hidrólisis de PNPA en presencia de 2-piridín acetoxima, y en la hidrólisis de su derivado acilado. El complejo de Zn(II) tiene una reactividad muy alta, incluso mayor a la esperada para el ion oximato libre, pero el complejo de Cu(II) casi no tiene reactividad. En la velocidad observada para la desacilación (k_D) de la O-acetil-2-piridín aldoxima, el Cu(II) (5-28) tiene un efecto mucho mayor que el Zn(II) (5-29) respecto a la desacilación espontánea, debido a que disminuye el valor de pK_a de la oxima de 10.0 a 3.2 haciéndolo un grupo saliente mucho mejor. Esta fuerte acidificación de la oxima es, por otro lado, responsable de su pérdida de reactividad como nucleófilo.

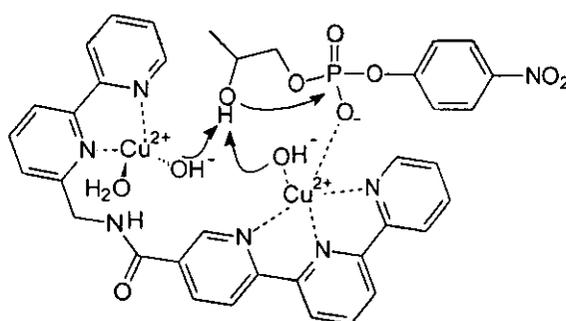


5.8. Cooperación en complejos dinucleares

La importancia de cooperación de dos o más iones metálicos dentro un complejo polinuclear ha atraído la atención debido a que se ha investigado la existencia y función de sitios activos polimetálicos en enzimas hidrolasas (*vide infra*). Por ejemplo para cobalto (III) y cobre(II) hay varios sistemas dinucleares, (5-30, 5-32) en los que uno de los iones contribuye a estabilizar la carga de fosfato, mientras que otro tiene como ligante el grupo nucleofílico que hará la ruptura del éster.^{110,31} Para 5-30 esta interacción con el sustrato se comprobó identificando el producto de reacción 5-31.



Liu y Hamilton¹⁰¹ unieron los ligantes **bipy** y **terpy** para formar un complejo que pudiera coordinar a dos iones Cu(II) **5-33**, y estudiaron la transesterificación del sustrato HPNP, que puede generar un nucleófilo intramolecular ($k_{\text{obs}} = 1.13 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, pH 7.0, 25°C). Observaron que existe cooperatividad: k_{obs} se incrementa 7 veces respecto al complejo Cu(II)(**terpy**), y 300 veces respecto a la ruptura del sustrato sin catalizar. La comparación de otros dos sistemas bimetalícos similares: uno con dos ligantes **bipy** y otro con dos ligantes **terpy**, muestra que el efecto del segundo ion Cu(II) es de 50 veces respecto al complejo mononuclear y del orden de 10^3 veces respecto a la velocidad no catalizada. El esquema de reacción propuesto (**5-33**) implica la activación simultánea, como electrófilo y base, por parte de los iones Cu(II).



5-33

En la Tabla 5.1 se resumen algunos valores de k_{obs} en la hidrólisis de fosfoésteres para algunos sistemas con metales divalentes y Co(III). Como se ha visto, hay sistemas muy reactivos con Co(III), y su estudio ha contribuido principalmente a esclarecer el mecanismo de reacción de los complejos frente a la hidrólisis de ésteres: la activación del nucleófilo, la estabilización del estado de transición, etc.; estos sistemas tienen la gran desventaja de no poder completar varios ciclos catalíticos, ya que los complejos de Co(III) son inertes y el intermediario acilado o fosforilado no se hidroliza para regenerar el complejo catalizador.

En resumen, la reactividad de los complejos de iones metálicos transicionales como Co(III), Zn(II), Ni(II), y Cu(II), como lo demuestran las dependencias del pH de las velocidades de reacción de hidrólisis de ésteres fosfato, se debe a la participación de iones OH^- coordinados como nucleófilos. Para los fosfoésteres que incluyen un grupo ROH, como los derivados fosforilados del glicol, esta activación adquiere un carácter intramolecular añadiendo un factor adicional a la velocidad de hidrólisis.

Tabla 5.1. Hidrólisis de fosfoésteres para sistemas con metales divalentes y Co(III).

Sistema	Sustrato y constante k_{obs} (s^{-1})	Condiciones	Ref.
CaCl ₂	HNPP, 8.9×10^{-8}	pH 7.0, 37°C, 0.5 mM metal	111
MgCl ₂	HNPP, 1.47×10^{-6}	pH 7.0, 37°C, 0.5 mM metal	111
ZnCl ₂	HNPP, 4.7×10^{-6}	pH 7.0, 37°C, 0.5 mM metal	111
PbCl ₂	HNPP, 8.9×10^{-5}	pH 7.0, 37°C, 0.5 mM metal	111
Pb(II) + ([9]aneN ₃)	HNPP, 1.6×10^{-4}	pH 7.0, 37°C, 0.5 mM metal	111
Pb(II)	HNPP, 1×10^{-4}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Cu(II)	HNPP, 2×10^{-5}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Zn(II)	HNPP, 9.0×10^{-6}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Co(II)	HNPP, 1.3×10^{-7}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Mn(II)	HNPP, 2.2×10^{-6}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Ni(II)	HNPP, 1.6×10^{-6}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Mg(II)	HNPP, 7.4×10^{-8}	pH 6.8, 37°C, 0.5 mM metal	112
Ca(II)	HNPP, 4.8×10^{-8}	pH 6.8, 37°C, 50 mM metal	112
Cu(NO ₃) ₂	BNPP, 5.7×10^{-7}	pH 6.5, 75°C, Cu(NO ₃) ₂ 100 mM	114
Co(en) ₂ (OH)(NH ₃) ²⁺	BNPP, $<10^{-6}$	pH 7.0, 50°C, 10 mM complejo	113
Co(en) ₂ (OH)(H ₂ O) ²⁺	BNPP, 2.7×10^{-5}	pH 7.0, 50°C, 10 mM complejo	113
Co(trien)(OH)(H ₂ O) ²⁺	BNPP, 4.8×10^{-4}	pH 7.0, 50°C, 10 mM complejo	113
Co(dien)(OH)(H ₂ O) ²⁺	BNPP, $<10^{-6}$	pH 7.0, 50°C, 10 mM complejo	113
Co(cyclen) ³⁺	BNPP, 4.21×10^{-4}	pH 7.25, 25°C, 2 mM Co(III)	118
Co(trpn) ³⁺	BNPP, 1.66×10^{-4}	pH 7.25, 25°C, 2 mM Co(III)	118
Ni(bipy) ²⁺	BNPP, 4.6×10^{-7}	pH 7.0, 10 mM buffer, 100 mM NaNO ₃ , 75°C, 1 mM complejo	114
Zn(bipy) ²⁺	BNPP, 1.39×10^{-6}	pH 7.0, 10 mM buffer, 100 mM NaNO ₃ , 75°C, 1 mM complejo	114
Cu(bipy) ²⁺	BNPP, 1.36×10^{-5}	pH 7.0, 10 mM buffer, 100 mM NaNO ₃ , 75°C, 1 mM complejo	114
Cu(bipy) ²⁺	BNPP $k_{cat} = 1.5 \times 10^{-6} s^{-1}$ $K_M = 8.3 \times 10^{-3} M$	95% EtOH, 100 mM KCl, 20°C 5 mM Complejo	103
Cu(tren) ²⁺	BNPP, 4.5×10^{-8}	pH 7.0, 75°C, 1 mM Complejo	114
Zn(tren) ²⁺	BNPP, 5.1×10^{-8}	pH 7.0, 75°C	114
Ni(tren) ²⁺	BNPP, 1.7×10^{-7}	pH 7.0, 75°C	114
Ni(en) ²⁺	BNPP, 5.8×10^{-7}	pH 8.60, 75°C	114
Ni(4-14) ²⁺	BNPP, 9.92×10^{-7}	pH 8.60, 75°C	114
Cu(terpy)(OH)	BNPP $k_{cat} = 1.5 \times 10^{-6} s^{-1}$ $K_M = 6.3 \times 10^{-3} M$	pK _a del complejo 9.8, 75% EtOH, 100 mM KCl, 35°C 2 mM Complejo	102
Cu(tren)	BNPP $k_{cat} = 4.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ $K_M = 1.3 \times 10^{-2} M$	pH 6.6, 95% EtOH, 100 mM buffer, 20°C, 5 mM Complejo	103

5.9. Cationes de lantánidos (III). OH^- y RO^- como nucleófilos.

Los primeros reportes de actividad fosfoesterolítica en presencia de iones lantánidos datan de los años 60's y describen sistemas heterogéneos en los que la reactividad se atribuye a los hidroxos geles.³⁷ En los últimos años la aplicación de estos cationes trivalentes en sistemas catalíticos homogéneos en disolución acuosa ha llamado la atención.^{68,71,115,116}

Existen varias ventajas al usar iones lantánidos y sus complejos comparada con los iones metálicos de transición: tienen mayor carga positiva, resisten más la hidrólisis por tener mayores valores de pK_a ,⁵⁴ tienen números de coordinación mayores¹¹⁷ que dejan posiciones libres para interactuar con el sustrato y/o activar nucleófilos, son cinéticamente lábiles lo cual permite diseñar sistemas que pueden completar varios ciclos catalíticos y la mayoría no experimentan reacciones de óxido-reducción a condiciones cercanas a las fisiológicas.⁶⁸

En la mayoría de los sistemas esterolíticos y fosfoesterolíticos intermoleculares basados en iones Ln(III), se considera que las especies con reactividad nucleofílica hacia los sustratos son aniones hidroxos (OH^-) o aniones alcoxo (RO^-); frecuentemente son los únicos nucleófilos que razonablemente pueden proponerse, y cuando existe la posibilidad de que ambos sean nucleófilos, es muy difícil discriminarlos entre sí. Las formas activas de los catalizadores en estos sistemas pocas veces han sido identificadas, sin embargo hay evidencias convincentes de que la ruptura de sustratos en presencia de cationes Ln(III) ocurre mediante la acción concertada del catión metálico y el nucleófilo (OH^- o RO^-).^{30,31,69-72,116,119}

Parte de esta evidencia es la dependencia de las k_{obs} respecto al pH para la ruptura de ésteres fosfato promovidas por cationes Ln(III) (por ejemplo, la hidrólisis de ARN con LaCl_3 ,¹²⁰ la hidrólisis de triésteres fosfato con un complejo macrocíclico de La(III),⁶² y la hidrólisis de ésteres fosfonato con La(III)¹¹⁹). Las curvas de k_{obs} vs. pH muestran poca dependencia en valores de pH ácidos, después tienen un incremento pronunciado en un intervalo de *ca.* 2 unidades de pH y finalmente vuelven a nivelarse en valores de pH básicos; analizando estas curvas sigmoidales es posible asignar un valor de pK_a a un nucleófilo, o proponer el número de especies desprotonadas en la forma cinéticamente activa. Otra parte de esta evidencia ha sido la detección por diferentes técnicas de productos de transesterificación para nucleófilos alcoxo.^{64,122}

No obstante la complejidad de estos sistemas, los efectos de aceleración reportados varían desde de uno o dos órdenes de magnitud hasta efectos de 10^{10} veces respecto a la hidrólisis espontánea del sustrato, haciendo a estos sistemas particularmente interesantes.

Roigk *et.al.* encontraron que los acuoiones de lantánidos (Ln(III)= La, Pr, Eu, Gd, Dy, Er, Tm, Yb, Lu) promueven la ruptura de BNPP a 50°C y pH 7.0,¹²³ donde las especies reactivas probablemente son los hidroxocaciones generados por hidrólisis de los acuoiones. La dependencia de k_{obs} de primer orden respecto a la concentración de los iones Ln(III) exhibe un comportamiento de “saturación” tipo Michaelis-Menten. Los valores de K_M para diferentes cationes, muestran pequeñas variaciones (1600-3200 M⁻¹) sin ninguna tendencia respecto al ion empleado. La constante catalítica, k_{cat} , es del orden 10⁻⁴ s⁻¹ para todos los cationes empleados, y correlaciona inversamente proporcional al radio iónico del catión (excepto para Yb(III) y Lu(III) para los que se forman agregados no reactivos a causa de su alta densidad de carga). Al incrementar la fuerza iónica en presencia de los iones Ln(III) se observa una disminución en los valores de k_{obs} y se sugiere una competencia entre los cationes por los iones fosfato para formar “pares iónicos”. Estos acuoiones también promueven la hidrólisis de ADN plasmídico superenrollado (pBR322). Con ADN_{SE} también se observó un comportamiento tipo Michaelis-Menten respecto al metal y las constantes catalíticas observadas, a concentraciones ~5 mM, son del orden 1×10⁻⁴ s⁻¹.¹²³

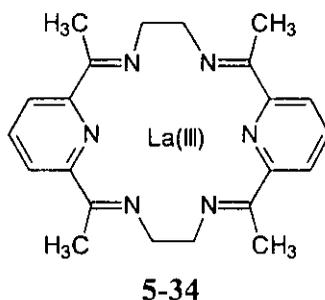
De estos resultados se puede ver que para los acuoiones de Ln(III), dependiendo de la densidad de carga del catión, existe una activación del grupo fosforilo y se genera OH⁻ coordinado como especie nucleofílica; el efecto de aceleración de 7 órdenes de magnitud para la hidrólisis de fosfodiésteres respecto a la hidrólisis espontánea en agua. Sin embargo, a pH neutro la fracción del nucleófilo OH⁻ coordinado es muy pequeña ya que los acuoiones de Ln(III) tienen valores de pK_a alrededor de 9,⁵⁴ y para formar cantidades apreciables de sus hidroxocomplejos es necesario ir a disoluciones básicas. Por otro lado, los hidróxidos de lantánidos tienen productos de solubilidad pequeños (10⁻²⁰-10⁻²² M⁻⁴) y fácilmente coprecipitan con iones inorgánicos simples como nitrato o cloruro que reducen aún más su solubilidad.⁵⁴ Por ejemplo, en el caso de Eu³⁺ el producto de solubilidad para Eu(OH)₃ es igual a 2.5×10⁻²⁶ M⁴ y el valor de pK_a de Eu_{ac}³⁺ es de 8.6.⁵⁴ Esto significa que para una disolución 1 mM el precipitado Eu(OH)₃ aparece a un valor de pH≥6.5 cuando el grado de formación de Eu(OH)²⁺ (una especie con posibilidades de ser esterolíticamente activa) es aún menor al 1%.

En suma, para la mayoría de los acuoiones Ln(III), sus disoluciones se vuelven inestables a valores de pH ligeramente mayores que 7 y sus complejos hidroxido, que son las especies reactivas, solamente se producen en muy bajas concentraciones. Una posible solución a

este problema es el uso de ligantes apropiados, los cuales puedan proteger a un catión Ln(III) de la precipitación, pero no decrementar mucho su electrofilia necesaria para generar el anión OH⁻ u otro nucleófilo coordinado y para activar al sustrato. La estabilización de estas especies conduce a generar hidroxocomplejos esterolíticamente activos.

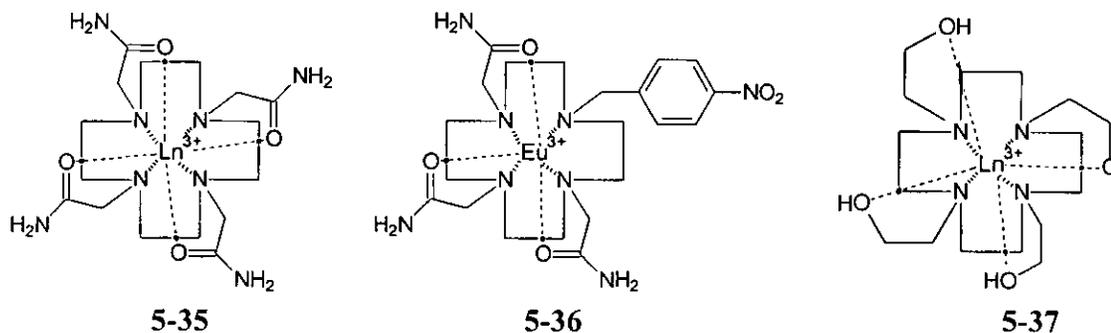
En la literatura existe una gran variedad de sistemas que usan cationes Ln(III) en combinación con ligantes que van desde los polioles más sencillos hasta elegantes macrociclos para hidrolizar diferentes ésteres y fosfoésteres incluyendo ADN y ARN.

Hay y Govan¹²⁴ reportaron un incremento de 100 veces en la actividad del complejo macrocíclico **5-34** de La(III) en la hidrólisis de 2,4-dinitrofenildietil fosfato al ir de pH 7.0 ($k_{\text{obs}} 6.25 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) a pH 9.5 ($k_{\text{obs}} 7.28 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) sin que se observara la precipitación de hidróxidos en disoluciones básicas, pero el sustrato empleado está muy activado y la contribución del anión OH⁻ es muy alta ($k_{\text{OH}^-} 53 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para 2,4-dinitrofenildietil fosfato).

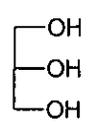
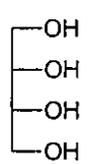
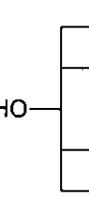
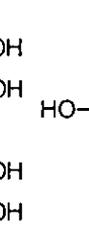
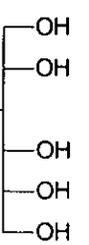
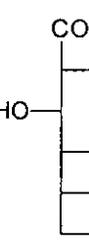
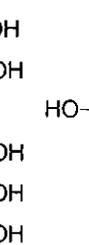


Morrow y colaboradores estudiaron una serie de complejos macrocíclicos de Ln(III) derivados del 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano que son muy estables en disolución acuosa ($t_{1/2} \sim 2-3$ semanas a pH neutro y 37°C).^{64,112b,125-129} Probaron su reactividad en la transesterificación del éster 4-nitrofenílico del 2-hidroxipropil fosfato (modelo de ARN), y en la hidrólisis de oligómeros del ácido adenílico (A₁₂-A₁₈) y BNPP. El complejo **5-35** con La(III) tiene buena reactividad hacia los dos primeros sustratos ($k_{\text{obs}} = 1.61 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4 y $k_{\text{obs}} = 1.58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, pH 7.0 a 37°C). Llama la atención que para el complejo **5-35** de Eu(III) no observan reactividad y para el **5-36** sí, incluso mayor que para La(III) ($k_{\text{obs}} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, pH 7.0 a 37°C con concentraciones mM del complejo). Mediante estudios de luminiscencia mostraron que la diferencia en la reactividad para los complejos de Eu(III) con **5-35** y **5-36** es debida al número de moléculas de agua que puede coordinar y que pueden desprotonarse: en **5-35** se coordina una molécula, pero no se observa ninguna desprotonación entre pH 4-9 y en **5-36** pueden coordinarse dos moléculas y se observa un $\text{p}K_a$ a 6.58. Por lo tanto, para **5-36** a pH neutro existe más del 50%

del complejo en una forma reactiva, mientras que para **5-35** la fracción debe ser casi indetectable. Una modificación interesante es el cambio de las amidas por alcoholes. El efecto sobre la reactividad es notable ya que el complejo **5-35** con Eu(III) puede promover efectivamente la ruptura de monorribonucleótidos y de BNPP ($k_{\text{obs}}=2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4 a 37°C). Este incremento en la reactividad se debe a un cambio en la especie nucleofílica, de OH^- a RO^- , con mayor reactividad intrínseca generado a valores de pH cercanos a la neutralidad.

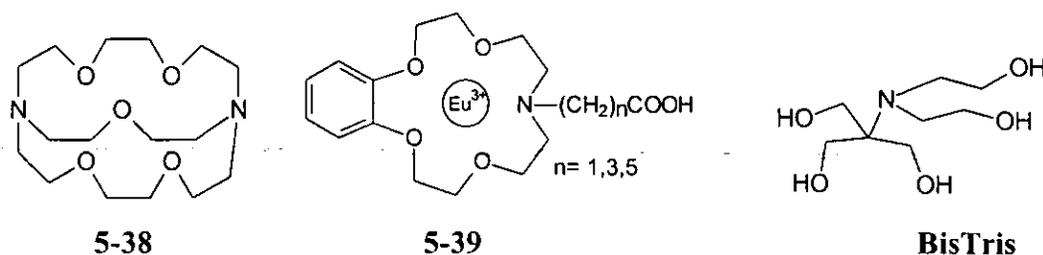


Schneider y colaboradores probaron varios tipos de ligantes (aminas, polioles y aminoéteres) en la reactividad hidrolítica de La(III), Eu(III) e Yb(III) hacia ADN superenrollado a pH 7.0 y 37°C.^{130,131} Encontraron que las aminas, aminoéteres y polioles producen efectos menores sobre la reactividad hidrolítica comparada con los acucationes y en el caso de los ácidos carboxílicos existe una fuerte inhibición, por ejemplo:

								
La(III) vs. ADN	1.05	1.50		1.05	1.05			
Eu(III) vs. BNPP	1.03	1.16	0.54	2.00	2.53	0.0055	<0.0012	

Al parecer esta inhibición se debe a que la mayor estabilidad que proporcionan los ligantes con grupos carboxilato conlleva una desactivación del nucleófilo OH^- también coordinado al catión. Este efecto ha sido observado al emplear La(III) en presencia de EDTA como ligante: su reactividad hidrolítica es tan baja que sólo se manifiesta con polifosfatos inorgánicos.¹³² Este efecto depende del ligante empleado. Por ejemplo, la presencia de la función carboxilato en aminoéteres da constantes de estabilidad entre 10^7 - 10^{12} con algunos cationes,¹³³ pero esta situación cambia con los lantánidos y además se inhibe la hidrólisis de fosfodiésteres.

Por ejemplo, para el aminoéter **5-38** la reactividad del complejo con Eu(III) comparada con el acuocación es solamente 1.02 veces mayor.¹³¹ El estudio del complejo **5-39**¹³⁴ muestra que aún con un carboxilo adicional las constantes de formación del metal con el ligante desprotonado no son muy diferentes a las del aminoéter y sólo alcanzan valores de 10^3 M^{-1} sin depender de la distancia a la cual está el carboxilo. Su efecto es muy modesto en la reactividad hacia ADN y BNPP (para BNPP $k_{\text{obs}} = 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en presencia de Eu(III), $k_{\text{obs}} = 3.08 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en presencia de **5-39**, $n=3$, pH 7.0 y 50°C , 2 mM).

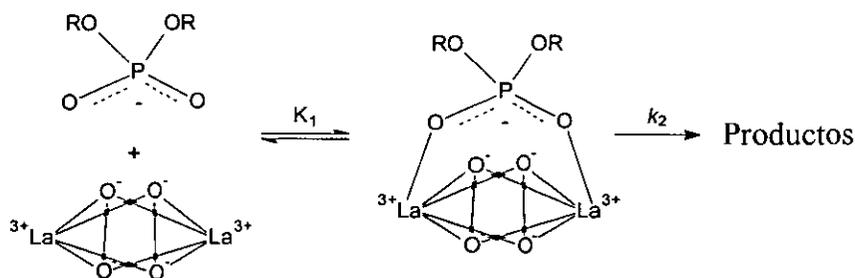


En contraste, la presencia de aminoalcoholes, con menores posibilidades como ligantes, puede estabilizar a los hidroxocomplejos de Ln(III). Por ejemplo, se reportó la estructura y la reactividad del complejo de La(III) con BisTris.¹³⁵ La estructura de RX del complejo muestra al metal decacoordinado con dos moléculas de BisTris, aunque en disolución acuosa los datos muestran que el complejo es 1:1. La constante de formación del complejo es de $K_f = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, y el pK_a del BisTris disminuye de 6.5 a 4.0 en presencia del un equivalente de La(III). La reactividad de una mezcla 1:1 de La(III) con BisTris, en el intervalo de concentraciones de 0.5-20 mM, alcanza un máximo al adicionársele 2 equivalentes de NaOH. La constante de velocidad observada en la hidrólisis de BNPP para disoluciones de BisTris/La(III) y para La(III) ambas con 2 equivalentes de NaOH es muy similar, por tanto, la presencia del ligante no da un efecto negativo en la velocidad pero contribuye a la estabilización de los hidroxocomplejos del metal. La estructura hipotética del complejo activo es $[(\text{BisTris})\text{La}(\text{OH})_4\text{La}(\text{BisTris})]^{2+}$, sin embargo no se reportan ningunos datos, excepto una titulación potenciométrica, que comprueben la estequiometría del complejo activo.

Otro aspecto importante, observado en varios sistemas, y que conduce a incrementos relevantes en la velocidad de reacción es el efecto de cooperatividad entre iones metálicos. En la literatura se pueden encontrar ejemplos de cooperación entre: 1) Ln(III) con Ln(III), 2) Ln(III) con otros iones metálicos y 3) dos iones Ln(III) en complejos dinucleares.¹³⁸ Por ejemplo, se ha reportado que existe un efecto importante de cooperatividad entre el acuocación de La(III) y sales

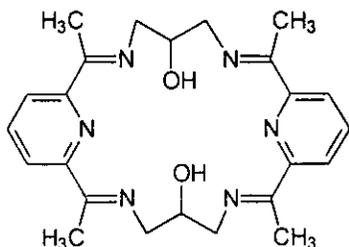
de Fe(III), Mn(III), Sn(IV), In(III) y Ga(III) en la hidrólisis de BNPP ¹³⁶ pero un aspecto muy dudoso de este trabajo es que la catálisis se observa en medios acuosos a pH 7.0 y temperatura 50°C, es decir, a condiciones de precipitación cuantitativa para las sales sencillas de todos los cationes usados.

Takasaki y Chin encontraron un efecto de cooperatividad entre peróxido de hidrógeno y Ln(III) (La, Pr, Nd y Eu) en la ruptura del fosfodiéster BNPP que incrementa la velocidad de ruptura en 8 órdenes de magnitud ($k_{\text{obs}} \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.0 y 25°C, concentraciones mM).^{119,137} La dependencia de la constante de velocidad observada es de orden 2 tanto para la concentración de La(III) como para la concentración de peróxido, y la dependencia del pH es muy pronunciada y su ajuste requiere considerar 2 La(III) y 2 O₂²⁻, por lo tanto, se propone que la especie que interactúa con el fosfato, a estas condiciones, es dinuclear (Esquema 5-3). Por otro lado, mediante experimentos con H₂¹⁸O₂ se determina que el peróxido funciona como nucleófilo, activado por su coordinación con los iones La(III).

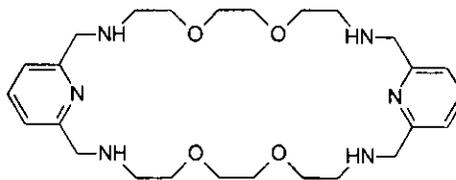


Esquema 5-3

En algunos sistemas fosfoesterolíticos se ha observado que es necesaria la participación de dos iones lantánidos,¹³⁸ incluyendo trabajos realizados con complejos macrocíclicos dinucleares. Estos últimos muestran que la participación de ambos iones metálicos puede tener un efecto catalítico muy importante en la hidrólisis de fosfodiésteres.^{62,139,140} Por ejemplo, la hidrólisis del ADN_{SE} plasmídico pUC19 es promovida por los complejos dinucleares de Ho(III) y Er(III) con **5-40**.¹⁴⁰ La presencia de Ho(III) prácticamente no afecta la velocidad de hidrólisis, mientras que en presencia de (**5-40**)Ho₂ se ve incrementada 1.5 veces a pH neutro y 37°C. Los complejos de Eu(III) y Pr(III) con **5-41** catalizan la hidrólisis de BNPP y ADN_{SE} a pH 7.0 y 50°C. Para BNPP la velocidad de hidrólisis se incrementa 1.5 veces respecto a la presencia del acuocación al emplear (**5-41**)Eu₂ y para (**5-41**)Pr₂ el efecto es de 72 veces.

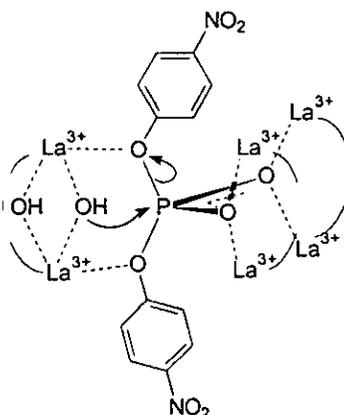


5-40



5-41

Jurek y Martell encontraron cooperatividad en la hidrólisis de BNPP entre iones La(III) del complejo macrocíclico para la activación de OH⁻ como nucleófilo y además observaron la participación de 3 complejos dinucleares en el proceso.⁶² Las constantes de velocidad observadas en la hidrólisis del fosfodiéster BNPP en presencia de La(III) y 4-8 dan efectos de aceleración de *ca.* de 10 órdenes de magnitud en medios básicos ($k_{cat} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.0 y $\sim 0.32 \text{ s}^{-1}$ a pH 10 a 37°C, complejo 5 mM). La mayor parte de la reactividad observada es debida al complejo 4-8 La₂(OH)₂ (*vide supra*). Esta reactividad inusualmente alta se debe principalmente a la cooperación de los dos grupos OH⁻ de la especie dinuclear. Otro aspecto de este trabajo es que el orden de reacción es de tres para el complejo dinuclear, lo que implica la participación de 3 complejos dinucleares en el proceso de hidrólisis. El esquema 5-4 muestra el mecanismo propuesto por los autores.⁶²



Esquema 5-4

A partir de estos y otros estudios similares se ha propuesto que, en sistemas dinucleares donde el nucleófilo es un grupo OH⁻, los cationes metálicos le proporcionan a este nucleófilo activación y aproximación al grupo fosforilo de manera simultánea.

5.10. Cationes tetravalentes: OH⁻ como nucleófilo.

Existen varios ejemplos en la literatura de sistemas hidrolíticos con gran reactividad, particularmente con diésteres fosfato, que emplean complejos de iones metálicos en estado de oxidación (IV), como Zr(IV), Ce(IV), Th(IV) y UO₂²⁺, en la hidrólisis de fosfodiésteres sintéticos, ADN y dinucleótidos, y se ha comprobado que son capaces de romperlos,¹⁴¹⁻¹⁵⁶ pero desafortunadamente no hay una sistematización. En estos sistemas se considera que los aniones OH⁻ unidos al ion metálico son los nucleófilos. En términos generales podemos pensar que, por ser tetravalentes, su habilidad como ácidos de Lewis para compensar la carga negativa de los ésteres fosfato (P-O) es mayor que para iones trivalentes o divalentes, pero hay que considerar que el ataque nucleofílico de los OH⁻ coordinados depende de la basicidad de estos aniones.

Una consecuencia directa sobre la reactividad es que estos metales tienen valores de pK_a muy bajos: las moléculas de agua de hidratación se desprotonan incluso a pH ácido (el pK_a de Th(IV) es 3.89, el pK_a de Ce(IV) es -0.72) generando la especie nucleofílica M(IV)-OH⁻ a bajos valores de pH.⁵⁴ La reactividad de estos sistemas hacia fosfodiésteres es una de las mayores encontradas en la literatura (efectos de aceleración de hasta 10¹⁰ veces)¹⁴¹⁻¹⁴³ pero tienen una química complicada en disolución acuosa: los hidroxocomplejos de estos cationes fácilmente forman oligómeros (tetrámeros, octámeros, especies unidas por puentes hidroxilo, etc.) y posteriormente precipitados, incluyendo geles, que han impedido la caracterización de sus especies en disolución y por tanto no es claro cuáles son las especies responsables de tan alta reactividad. En algunos casos, para estabilizar las especies reactivas, se han adicionado otros reactivos que finalmente limitan la aplicación de estos sistemas; en otros, se han empleado ligantes polidentados que formen complejos estables con M(IV), como ligantes policarboxilatos (EDTA), pero desafortunadamente reducen fuertemente su reactividad esterolítica.¹⁴⁴

Los estudios generalmente se realizan a pH ácido para evitar la presencia de geles. Por ejemplo, la ruptura del dinucleótido TpT (timidilil (3',5')timidina) a pH ≤4 empleando Ce(IV) a 50°C y Th(IV) a 70°C transcurre con una k_{obs} del orden de 10⁻⁶ s⁻¹, pero no es posible mejorar mucho este tipo de sistemas sin su estabilización a mayores valores de pH, pues las temperaturas empleadas ya son altas; además Th tiene la desventaja de ser un elemento radioactivo.

Hay varios estudios que involucran procesos oxidativos. Por ejemplo, se ha empleado Ce(III)/O₂ - Ce(IV) en la hidrólisis del dinucleótido dApdA¹⁴⁵ con valores de k_{obs} de ~10⁻⁴ s⁻¹ a 37°C pero estos procesos redox no son deseables debido al poco control que puede tenerse

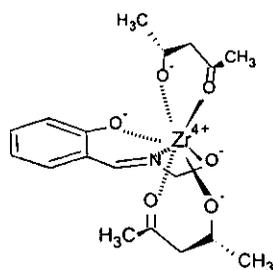
comparado con las rutas nucleofílicas que son mucho más específicas. En la Tabla 5.2, se presenta un resumen de algunos sistemas con M(IV) en la ruptura no oxidativa de BNPP y dinucleótidos.

Tabla 5.2. Hidrólisis de fosfodiésteres con hidroxocomplejos de M(IV)

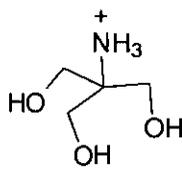
Sistema	Sustrato y k_{obs} (s^{-1})	Condiciones	Ref.
$[\text{Zr}^{\text{IV}}(\text{acac})_2(\text{sae})]$	BNPP, 1.5×10^{-5}	pH 7.0, 10 mM Tris/HCl, 10 mM KCl y MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 37°C, 0.045mM Complejo, BNPP 0.016 mM	154
Zr(IV)	TpT, 2.3×10^{-6}	pH 3.5 (pH_{max} 4.0), 50°C, Zr(IV) 1 mM en presencia de Tris	155
Zr(IV)	BNPP, 8×10^{-4}	pH 3.5, 37°C, micelas Brij, Hepes, 1mM Zr(IV)	151
Ce(IV)/palmitato ₂	BNPP, 2.6×10^{-2}	pH 7.0, micelas Brij, Hepes, 37°C [Ce(IV)/palmitato ₂] > [BNPP]	143
Ce(IV)	TpT, 5.28×10^{-5}	pH 7.0, 50°C, estequiométrica	150
Ce(IV)	TpT, 5.5×10^{-5}	pH 7.0, 50°C, gel de hidroxocomplejos de Ce(IV)	146
Ce(IV)/Pr(III)	TpT, 4.7×10^{-4}	pH 7.0, 50°C, gel de hidroxocomplejos de Ce(IV) y Pr(III)	149
Ce(IV)	TpT, 4.6×10^{-6}	pH 1.3-3.3, 50°C, Ce(IV) 1 mM	146
Th(IV)	BNPP, 2.8×10^{-2}	pH 6.0, micelas Brij-35 2 mM, HEPES 10 mM, 37°C, Th(IV) 1 mM, BNPP 0.05 mM	143
Th(IV)	TpT, 4.5×10^{-6}	pH 4.0, 70°C, Th(IV) 4 mM	153
UO_2^{2+}	BNPP, 9.5×10^{-6}	pH 6.0, HTMED, 37°C, [HTMED/ UO_2^{2+}] > [BNPP]	156

Un catión interesante es Zr(IV), que si bien tiene hidroxocomplejos con equilibrios complicados en disolución acuosa, tiene la ventaja de no presentar una química redox. Para el complejo $[\text{Zr}^{\text{IV}}(\text{acac})_2(\text{sae})]$ (5-42) se reportó la hidrólisis de BNPP con una constante de velocidad observada moderada, comparable a la observada para acuocaciones de lantánidos(III)¹⁵⁴ probablemente debido a la excesiva desactivación por los ligantes carboxilato y alcoholato.

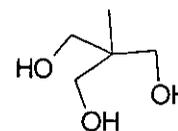
Vale la pena mencionar que para Zr(IV) a pH 3-5 y 20°C la presencia del aminoalcohol, Tris, incrementa la reactividad de la sal del metal 1.5 veces ($k_{\text{cat}} = 4.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a pH 3.5 y 20°C)¹⁵⁵ a las mismas condiciones en la hidrólisis de los fosfodiésteres BNPP y el dinucleótido TpT y promueve la hidrólisis de MNPP con constantes de velocidad comparables a las de BNPP. En contraste, la presencia de su análogo tris (hidroximetil)etano, que carece de la función amino, no contribuye a la velocidad de la reacción.



5-42



TRIS



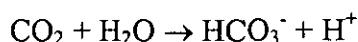
Tris(hidroximetil)etano

Por lo expuesto anteriormente la coordinación de los iones lantánidos y de iones con carga (IV), sigue siendo uno de los factores más importantes para desarrollar catalizadores activos en la hidrólisis de ésteres. Posiblemente los ligantes más adecuados como estabilizadores y no desactivantes son ligantes abiertos con grupos donadores de oxígeno o combinaciones de oxígeno y nitrógeno, como aminoalcoholes y oximas, que tienen constantes de estabilidad aceptables para estos cationes, y es posible que no decrementen excesivamente su electrofilia.

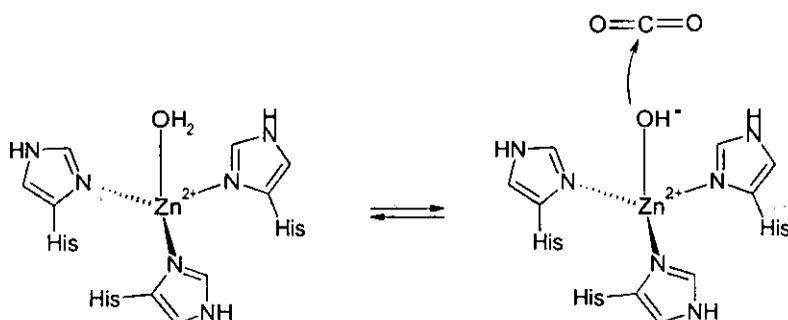
El hecho de coordinar a estos cationes tri- y tetravalentes permite solucionar el problema de la baja estabilidad de las especies que incluyen sus hidroxocomplejos, pues se protegen de la precipitación. Por otro lado, esta coordinación puede tener una repercusión complementaria en el ligante. Por ejemplo, si al coordinarse el ligante puede generar grupos nucleofílicos diferentes al anión OH^- , como peróxidos (ROO^-), alcoholatos (RO^-), oximatos ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{N}-\text{O}^-$) etc., y puede pre-organizarlos favoreciendo una interacción óptima con el sustrato, la suma de todos estos efectos puede llegar a dar una actividad catalítica muy importante.

5.11. Nucleófilos coordinados en sitios activos de metaloenzimas

Existe una gran variedad de metaloenzimas hidrolíticas tanto proteasas y esterasas como fosfatasas y nucleasas. Todas estas enzimas operan mediante mecanismos que incluyen el ataque nucleofílico por parte de un nucleófilo coordinado a la molécula de sustrato con asistencia tanto del ion metálico como de numerosos grupos laterales de la proteína. La misma idea de “activación” de un nucleófilo mediante su coordinación y disminución del $\text{p}K_a$ que se ha desarrollado en sistemas químicos proviene de estudios de metaloenzimas. Este efecto se observa, en una forma más clara y sencilla, en el mecanismo simplificado de la anhidrasa carbónica.¹⁵⁷ Esta enzima cataliza la hidratación de CO_2 :



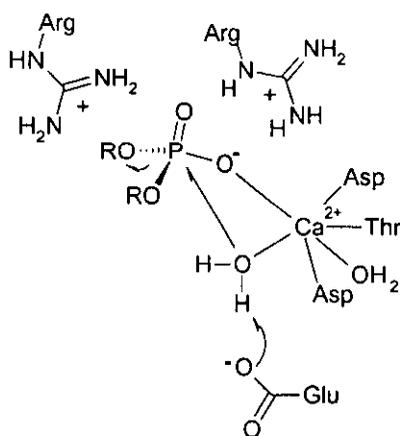
La constante de velocidad de la reacción espontánea con agua como nucleófilo es $k_{H_2O}=7.7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y en presencia de la enzima (anhidrasa carbónica humana, isozima II) sube a $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ es decir, llega al límite donde la velocidad de la reacción enzimática es controlada únicamente por la difusión de los reactivos. El mecanismo enzimático (*Esquema 5.5*) incluye la desprotonación del agua coordinada con el Zn(II) del sitio activo, que tiene pK_a alrededor de 7, y un ataque nucleofílico del OH^- a la molécula de CO_2 .



Esquema 5.5

En este caso el catión metálico no produce ninguna activación del sustrato, únicamente disminuye el pK_a del agua de 15.7 hasta 7, pero evidentemente el anion hidróxido no pierde su nucleofilia a pesar de que la pérdida de su basicidad es grande.

La desprotonación completa del agua coordinada no ocurre en otras metaloenzimas, tales como la carboxipeptidasa y la nucleasa de estafilococos. Esta última enzima¹⁵⁸ cataliza la ruptura de las cadenas de ADN y ARN en forma no específica con un efecto de aceleración sobre la reacción espontánea es del orden de 10^{16} veces y representa uno de los mayores efectos catalíticos en la naturaleza. El mecanismo de acción de la enzima se presenta en el *Esquema 5.6*.

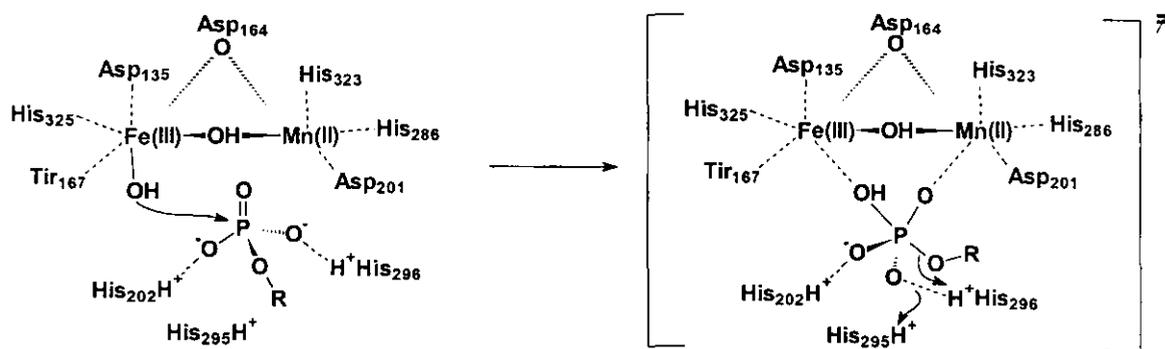


Esquema 5.6

Para esta enzima, el nucleófilo agua está coordinado con Ca(II), pero no se desprotona sólo por coordinación con el ion metálico, sino que requiere una asistencia adicional de tipo base-general del carboxilato del ácido glutámico. El catión de Ca(II) promueve la desprotonación del agua y además realiza una activación electrofílica (o electrostática) al sustrato fosfodiéster. Además existe una asistencia del mismo tipo que proviene de dos argininas, aminoácidos catiónicos. Este tipo de contribución se ha empleado en sistemas sintéticos como el 5-18.

Con frecuencia las enzimas hidrolíticas contienen sitios activos polinucleares. Como ilustración de los mecanismos correspondientes podemos considerar dos enzimas fosfatasas estudiados en detalles: fosfatasa alcalina¹⁵⁹ y fosfatasa púrpura ácida.¹⁶⁰ Ambas enzimas son poco específicas y muy activas. Sus sustratos son monoésteres fosfato.

La fosfatasa púrpura tiene un centro activo heterobimetálico: incluye los cationes Fe(III) y Mn(II). El catión más electrofílico, Fe(III), acidifica una molécula de agua coordinada convirtiéndola en OH⁻, mientras que el Mn(II) junto con tres aminoácidos catiónicos (histidinas en sus formas protonadas) realizan la activación electrofílica del fosfato (*Esquema 5.7*).



Esquema 5.7

Todas las enzimas mencionadas tienen además del sitio catalítico, donde ocurre la transformación química del sustrato, un sitio de complejación no-covalente del sustrato. Como resultado, la transformación química sigue un mecanismo intramolecular que es más eficiente.

Se puede decir que para lograr una posible imitación de los mecanismos enzimáticos, el efecto más sencillo a reproducir en sistemas químicos es la disminución del pK_a del nucleófilo a través de su coordinación. También es posible imitar la asistencia electrofílica del mismo catión metálico, pero evidentemente se requiere la presencia de sitios de coordinación vacíos, es decir,

debería ser más fácil para metales con altos números de coordinación, como los lantánidos. Modelar el efecto de asistencia electrofílica que proporcionan los grupos laterales al sitio catalítico y la aproximación entre el sustrato y el catalizador por complejación del sustrato en forma no-covalente requiere sistemas mucho más complicados y actualmente hay pocos ejemplos de estos efectos en sistemas químicos.

Objetivos de la tesis

Por lo expuesto en las secciones previas, resulta importante diseñar, caracterizar y evaluar sistemas con iones metálicos, los cuales deben ser muy reactivos, tanto esterolíticamente como fosfoesterolíticamente, y deben tener la posibilidad de generar procesos cíclicos. Ambas características son necesarias para poder ser aplicados en procesos como el “*footprinting*”^{*} de ADN y ARN, el tratamiento de desechos tóxicos y reacciones sintéticas con ésteres y fosfoésteres como sustratos. Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo general:

Desarrollar nuevos sistemas con una mayor eficiencia para promover la ruptura de ésteres de ácidos carboxílicos y fosfatos, que permitan su aplicación práctica como esterasas y/o nucleasas químicas. El desarrollo de estos sistemas esterolíticos y fosfoesterolíticos con base en nucleófilos coordinados se plantea de forma análoga a los mecanismos de acción de metaloenzimas hidrolíticas.

Objetivos particulares:

1. Investigar la reactividad de uno de los nucleófilos más sencillos con efecto α , la hidroxilamina, en la ruptura de fosfodiésteres y su posible cooperación con iones metálicos.
2. Realizar un estudio de la reactividad esterolítica y fosfoesterolítica de una serie de oximas coordinadas enfocado a:
 - establecer interrelaciones entre la basicidad y la nucleofilia del grupo oximato coordinado
 - lograr efectos específicos de estabilización del estado de transición del ataque nucleofílico por coordinación con metales, y

- encontrar sistemas con posibilidades de realizar la ruptura de los sustratos de modo catalítico, es decir, realizar tanto acilación del oximato como desacilación del intermediario aciloxima con regeneración del grupo nucleofílico.

3. Estudiar como posibles catalizadores de hidrólisis los complejos de Y(III) y lantánidos (III) con ligantes aminoalcohólicos para los cuales se esperaría la formación de nucleófilos hidroxilo o alcóxido coordinados. Los puntos principales de este estudio son:

- la caracterización de la composición de las especies en disolución, y la determinación de sus constantes de estabilidad
- la determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de sustratos ésteres de diferentes tipos (ésteres de ácidos carboxílicos, mono-, di- y triésteres fosfato, ADN)
- el establecimiento del mecanismo de hidrólisis catalizado con base en estos datos.

* *“footprinting”*: Es un método para identificar el segmento exacto de ADN al que se une una proteína afín a éste.

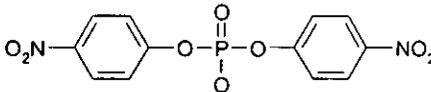
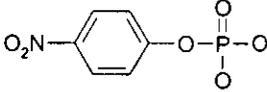
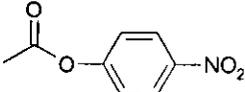
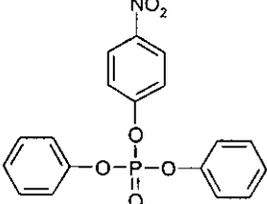
6. Sustancias empleadas, equipo y software

6.1. Reactivos

a) Sustratos

Los sustratos empleados en este trabajo (Tabla 6.1) son ésteres y fosfoésteres que se usan como modelos de sustratos biológicos o sustancias tóxicas en reacciones esterolíticas y fosfoesterolíticas. Su hidrólisis es irreversible y da como producto en disolución acuosa el anión nitrofenolato cuya detección puede hacerse mediante espectrofotometría UV-Vis (ver sección 7.2). Además, su uso permite hacer comparaciones con los datos reportados en la literatura. En el Anexo 3 se muestran algunas propiedades electrónicas, calculadas para una geometría definida de estos sustratos en el vacío.

Tabla 6.1. Sustratos empleados.

Bis(4-nitrofenil) fosfato, sal de sodio (Sigma) Peso fórmula 362.2, pK_a 1.04* Se recristalizó de una mezcla etanol/agua.	
4-Nitrofenil fosfato di(Tris) sal (Sigma) Peso fórmula 461.4, $pK_{a1} < 2$ y $pK_{a2} 5.5$, ¹⁸⁸	
4-Nitrofenil acetato (Aldrich) Peso fórmula 181.1 Se recristalizó de una mezcla acetato de etilo/ácido acético	
4-Nitrofenildifenil fosfato Peso fórmula 371.3 Sintetizado en la Facultad de Química de la Universidad de Rutgers, E.E.U.U. Obtenido como un donativo.	
4-Nitrofenol grado espectrofotométrico (Sigma) Peso fórmula 139.1, pK_a 7.0, ¹⁸³	

* Calculado con el programa ACD pK_a Ver. 3.00 de Advanced Chemistry Development Inc.

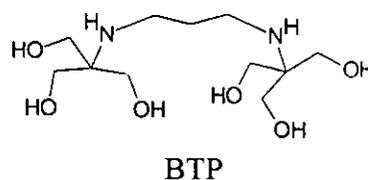
b) Ligantes

Tabla 6.2. Ligantes empleados

BisTris propano (Sigma)

(1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano)

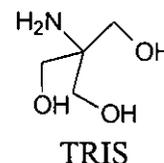
Peso fórmula 282.3

 pK_{a1} 6.75 y pK_{a2} 9.10;¹⁸⁴ pK_{a1} 6.83 y pK_{a2} 9.10, este trabajo (ver sección 10.1)

Trizma base (Sigma)

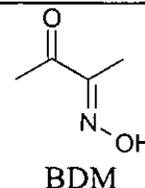
Peso fórmula 121.1

(tris[hidroximetil]aminometano)

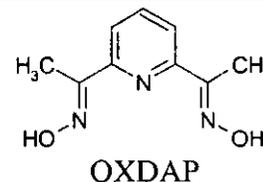
 pK_a 8.09,⁵⁴ pK_a 8.01, este trabajo (ver sección 10.2)

2,3-Butanodiona monoxima (Aldrich)

Peso fórmula 101.1

 pK_a 9.5 (EtOH/H₂O)¹⁷⁶ pK_a 9.40 este trabajo (ver sección 9.3)2,6-Diacetilpiridín dioxima. Se preparó a partir de 2,6 diacetilpiridina (Aldrich) e hidroxilamina.³³

Peso fórmula 193.2

 pK_{a1} 11.3 y pK_{a2} 11.5;¹⁸³

Hidroxilamina (Clorhidrato) (Aldrich)

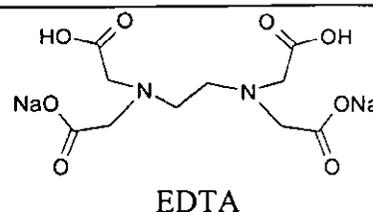


Peso fórmula 69.49

 pK_{a1} 6.1 y pK_{a2} 13.73,⁵⁰

Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica (Aldrich)

Peso fórmula 232.24

 pK_{a1} 2.00, pK_{a2} 2.67, pK_{a3} 6.16, pK_{a4} 10.26,⁵⁴

c) Sales de los cationes metálicos

- Percloratos de lantánidos (III) grado reactivo (Aldrich). Las disoluciones acuosas al 40 % en peso de los percloratos de La, Pr, Nd, Eu, Gd y Dy se usaron sin purificar, después de comprobar su pureza mediante emisión atómica de plasma. A partir de las disoluciones adquiridas se prepararon disoluciones patrón en las que la concentración de los iones metálicos se determinó adicionando un exceso de EDTA y retrovalorando con $ZnCl_2$ en presencia de negro de eriocromo T como indicador.¹⁶¹ Es importante aclarar que todas las disoluciones adquiridas de percloratos de lantánidos contienen ácido perclórico en diferentes cantidades para prevenir la precipitación de los hidróxidos metálicos.
- Nitrato o perclorato de Y(III) (Aldrich). Su disolución patrón se estandarizó al igual que las anteriores.
- Zn metálico (99.999% pureza) (Aldrich). Se empleó para preparar una disolución patrón de $ZnCl_2$ disolviéndolo en HCl.
- $NaClO_4$ grado reactivo (Aldrich).
- NaOH grado reactivo y libre de carbonato (Aldrich). Las disoluciones de NaOH se emplearon frescas, y se procuró evitar la formación de carbonato; se estandarizaron con biftalato de potasio en presencia de fenolftaleína como indicador.

d) H_2O

En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada con una resistividad de $18.2 \pm 0.1 M\Omega cm$ obtenida mediante el sistema Barnstead Nanopure.

6.2. Equipo

Las mediciones de volumen se realizaron con micropipetas Eppendorf Research serie 2000 con volúmenes variables. Las mediciones de pH se hicieron con un potenciómetro digital para investigación Orion Model 710-A, y se usó un electrodo Orion ROSS que permite el uso de amortiguadores derivados de TRIS. Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores estándar de referencia frescos a 25°C, pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01). Durante los experimentos de potenciometría se mantuvo constante la temperatura utilizando un baño de recirculación de agua marca Fischer Scientifics Isotemp 1016S ($\pm 0.1^\circ C$). La temperatura de las disoluciones fue verificada con un termómetro digital Digi-Thermo ($\pm 0.1^\circ C$). Las

mediciones espectrofotométricas en el ultravioleta y el visible se hicieron en un equipo Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos equipado con un compartimento termostatado con sistema Peltier ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian Gemini 300 NMR de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas (ESI-MS) fueron obtenidos en un espectrómetro de masas VG Platform II cuadrupolar con una fuente de ionización por electrospray en la Universidad de Santa Bárbara, California. Las muestras se corrieron por introducción directa desde una bomba con jeringa Harvard Apparatus Modelo 22 a una velocidad de $20\ \mu\text{L}/\text{min}$, los voltajes empleados fueron de 5-15 volts y los datos se colectaron y analizaron en una PC con el software VG Masslynx.

6.3. Software

Los ajustes por regresiones lineales o no lineales por el método de mínimos cuadrados fueron realizados en el programa Microcal™ Origin™ Ver. 5.0 de Microcal Software, Inc. Las constantes de equilibrio fueron calculadas utilizando el programa Hyperquad 2000 Version 2.1 NT.^{162b,c} Los diagramas de distribución de especies fueron generados usando las constantes determinadas en el programa Species Ver. 0.8 Academic Software 1999 de K.J.Powell. Los espectros de ^1H -RMN mostrados en esta tesis fueron procesados a partir de los FID mediante el programa NutsPro-NMR Utility Transform Software Professional 2D Ver. 19990218.

7. Técnicas empleadas

7.1. Potenciometría

Todas las titulaciones se realizaron en una celda de 75 mL termostatada a $25.0\pm 0.1\ ^\circ\text{C}$, siguiendo las recomendaciones generales para titulaciones potenciométricas.¹⁶² El volumen inicial de las disoluciones a titular fue de 50.0 mL en todos los casos. La fuerza iónica se mantuvo constante adicionando NaClO_4 0.1 M como electrolito soporte. Las disoluciones a titular se burbujearon y se mantuvieron bajo atmósfera de N_2 para evitar la presencia de CO_2 debido a que los carbonatos de los lantánidos son muy insolubles. El potenciómetro (electrodo) se calibró usando, primero, amortiguadores estándar de referencia a 25°C , pH 4.00, 7.00 y 10.00 y posteriormente se calibró en términos de la concentración de protones.

Debido a que los valores de diferencia de potencial obtenidos en las celdas electroquímicas utilizadas en potenciometría dependen de la actividad y no de la concentración de las especies, las constantes determinadas directamente de los valores de mediciones potenciométricas son en realidad constantes mixtas pues contienen términos de actividades (para protones) y de concentraciones (para las otras especies).¹⁶³ Si consideramos que la actividad de una especie iónica no es un parámetro mensurable experimentalmente, las constantes en términos de concentraciones están definidas más claramente y por esto, para el estudio de equilibrios en disolución, es preferible su uso. Además, el cálculo de las constantes de equilibrio a partir de datos potenciométricos está basado en la solución de sistemas de ecuaciones en los que se incluye el balance de masa para protones, por lo que se requiere conocer la concentración y no la actividad de los protones. Por estas razones, es más adecuado calibrar al electrodo en términos de la concentración de protones.¹⁶²

Es posible demostrar que en una titulación de ácido fuerte con base fuerte, la relación entre las variables involucradas puede representarse con la ecuación:¹⁶⁵

$$V + (V_0 + V)[H']/C_B - (V_0 + V)K_w/(C_B[H']f) - V_e = 0$$

en donde: V es el volumen de titulante de concentración C_B molar

V_0 es el volumen inicial de la muestra

K_w es el producto iónico del agua

V_e es el volumen de equivalencia

$[H']$ es la concentración de H^+ no corregida, tomada directamente de las mediciones de pH ($[H'] = 10^{-pH}$)

f es el factor de corrección, función de los coeficientes de actividad y del potencial de unión líquida (junction potential)

Entonces, si conocemos la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH para cada adición, es posible calcular el valor de f y de pK_w en las condiciones experimentales.

Como parte de la calibración rutinaria del electrodo se titularon 50.0 mL de $HClO_4$ 0.01 M estandarizado con $NaOH$ estandarizado en presencia de $NaClO_4$ 0.1 M como electrolito soporte haciendo pequeñas adiciones de $NaOH$, permitiendo a la disolución equilibrarse y registrando el pH instrumental. Las curvas de titulación obtenidas, con aproximadamente 45

puntos separados de pH, se ajustaron mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados a la ecuación anterior reordenada en términos del volumen

$$V = (V_e C_B + V_0 K_w / [H^+] - V_0 [H^+] f) / (C_B + [H^+] f - K_w / [H^+])$$

Para la ecuación de ajuste en el programa Origin se hicieron $V_e = P1$, $K_w = P2$, $f = P3$, $pH = X$

$$V = (P1 * C_B + V_0 * P2 * 10^X - V_0 * P3 / 10^X) / (C_B + P3 / 10^X - P2 * 10^X)$$

donde P1-P3 son parámetros de ajuste.

Estos datos se ajustaron para obtener los valores de pK_w y f . Este último valor se empleó para corregir la escala del potenciómetro (Fig.7.1). Vale la pena hacer notar que la influencia de los coeficientes de actividad y el error asociado a la variación del potencial de unión líquida se manifiestan como el factor f en la expresión de la concentración de H^+ . En consecuencia, al emplear valores de pH debe restarse el logaritmo de f del valor de pH observado para corregir la escala del potenciómetro y usarla en términos de la concentración de protones.

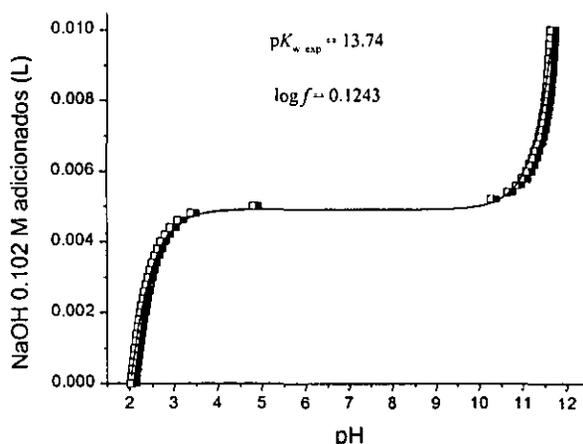


Fig.7.1. Ejemplo de calibración del electrodo. Lecturas de pH sin corrección (■). Valores de pH corregidos (□)

En las condiciones experimentales de esta tesis se determinó un valor promedio de pK_w de 13.79 ± 0.04 como uno de los parámetros de ajuste y f se determinó antes de cada titulación como el otro parámetro de ajuste. El valor reportado en la literatura para el pK_w a fuerza iónica $I = 0.1$ M es de 13.8^{162} , que es igual, en los límites del error, al valor encontrado. El valor de $\log f$, usualmente en el intervalo de 0.1-0.2, se usó para corregir la escala de pH del potenciómetro ($-\log[H^+] = pH - \log f^{165}$) y calibrar el electrodo en términos de la concentración de protones.

Una titulación típica se realizó adicionando pequeñas cantidades (50-200 μL) de NaOH de concentraciones entre 0.1 y 0.2 M a la muestra y registrando los valores de pH obtenidos,

teniendo cuidado de que estos valores fueran estables. Las muestras a titular se prepararon disolviendo el ligante sólido y llevándolo a su forma totalmente protonada adicionando los equivalentes de HClO_4 correspondientes, el NaClO_4 sólido, y por último la cantidad necesaria del ion metálico en disolución. Cada muestra se desgasificó y se mantuvo bajo atmósfera de N_2 durante toda la titulación. Es de suma importancia que la disolución a titular esté libre de carbonatos y que no haya absorción de CO_2 durante la titulación para obtener curvas de titulación reproducibles. Estas curvas de pH vs. volumen de NaOH adicionado fueron corregidas por el factor f determinado para cada uno de ellas para obtener los valores de $-\log[\text{H}^+]$ vs. volumen de NaOH adicionado (Fig.7.2).

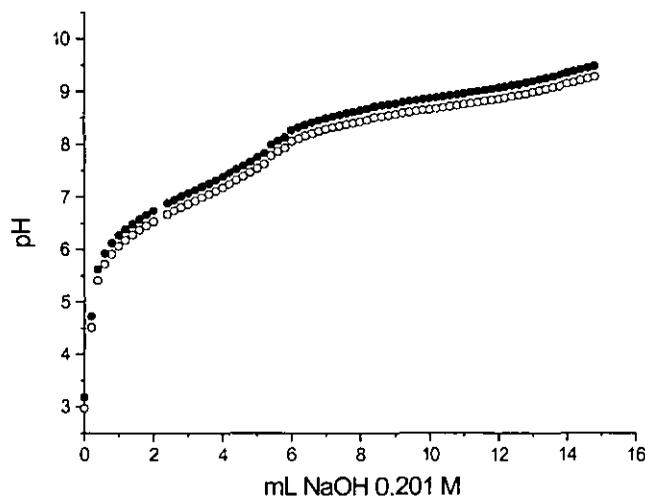


Fig.7.2. Ejemplo de corrección de pH para la titulación de BTP 20 mM, La(III) 10 mM, NaClO_4 100 mM. Lecturas de pH instrumentales (●). Valores corregidos: $-\log[\text{H}^+] = \text{pH} - \log f$. (○)

Se hicieron varias titulaciones de los ligantes (BTP, Tris y BDM) en presencia de iones metálicos (Ln(III) e Y(III)). Las titulaciones de BTP se hicieron en el intervalo de concentraciones de 5-20 mM de cada uno de los componentes. Para Tris, en el intervalo de 10-50 mM de ligante y 5-10 mM de Y(III) . En las titulaciones se adicionaron 2 equivalentes de HClO_4 por cada mol de BTP, y 1 equivalente de ácido por cada mol de Tris y BDM, de manera que las titulaciones comenzaran siempre con el ligante totalmente protonado. Siempre que se usaron disoluciones de percloratos de lantánidos se observa, al inicio, la titulación del HClO_4 que contienen las disoluciones de lantánidos adquiridas.

7.2. Cinética

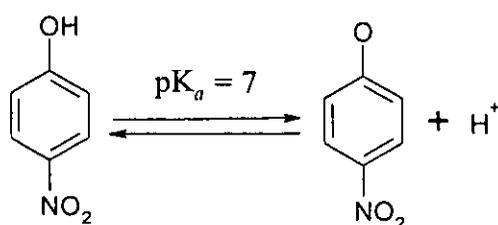
El transcurso de todas las reacciones de hidrólisis con los sustratos BNPP, MNPP, PNPDP y PNPA se siguió espectrofotométricamente por la aparición del anión 4-nitrofenolato a 400 nm. En experimentos a $\text{pH} < 8$ se usó la absorción molar de 4-nitrofenolato corregida por la ionización incompleta del producto.

Se emplearon disoluciones patrón acuosas recién preparadas de los sustratos BNPP y MNPP. Las disoluciones patrón de PNPDP fueron preparadas en dioxano seco, debido a que este sustrato es poco soluble en agua, y la mezcla de reacción final contenía típicamente un 2% en volumen de dioxano. Las disoluciones de PNPA fueron preparadas en acetonitrilo y la mezcla de reacción final contenía 4% de acetonitrilo. Los bajos porcentajes empleados de dioxano y acetonitrilo permiten considerar que el sistema es acuoso y no se hicieron correcciones en las constantes obtenidas por la presencia de estos disolventes. Todas las disoluciones patrón se mantuvieron selladas y en refrigeración por periodos de no más de 2 semanas para evitar su descomposición. Para las mediciones cinéticas se usaron los sustratos en concentración $40 \mu\text{M}$.

Después de la hidrólisis, para MNPP, PNPA y PNPDP se observó la liberación de un equivalente de 4-nitrofenolato por mol de sustrato. Para estos sustratos (MNPP, PNPDP y PNPA) las constantes de velocidad observadas de primer orden (k_{obs}) fueron calculadas a partir de de velocidades iniciales para reacciones lentas, y por el método integral para las reacciones más rápidas que siguieron una curva cinética de primer orden.

En el caso de la hidrólisis de BNPP el proceso puede llegar sólo a la etapa de formación de un mol de MNPP y un mol de 4-nitrofenolato o ir hasta la formación de fosfato y dos equivalentes de 4-nitrofenolato. Por esto, para este sustrato se cuantificaron los productos de reacción: el anión 4-nitrofenolato y fosfato.

El anión 4-nitrofenolato, como ya se había mencionado, es un anión amarillo intensamente colorido; su cuantificación mediante espectrofotometría UV-visible es sencilla y permite detectar cantidades del orden de 10^{-6} M .



$$\lambda_{\text{max}} \quad 400 \text{ nm}$$

$$\epsilon_{400} \quad 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

La cantidad de fosfato en la mezcla de reacción se determinó por el método colorimétrico estándar de reducción del complejo fosfomolibdato en presencia de hidrazina en medio ácido;¹⁶⁶ el compuesto azul resultante de la reducción absorbe a 830 nm ($\epsilon = 26800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para el análisis se incubaron en baño maría durante 10 minutos 2.5 mL de la disolución de analito con 2.0 mL de disolución fresca de molibdato/hidrazina (25.8 mM de molibdato, 1.15 mM de hidrazina y 2.5 N de H_2SO_4 , preparada a partir de Na_2MoO_4 al 2.5% en H_2SO_4 10 N e $\text{N}_2\text{H}_5 \cdot 2\text{HSO}_4$ 0.15% en disolución acuosa) y 0.5 mL H_2O . Se determinó la cantidad de fosfato en las mezclas de reacción empleadas para cinética mediante espectrofotometría UV-Vis haciendo adiciones estándar de Na_3PO_4 . La figura 7.3 muestra la determinación de fosfato para (a) una mezcla de reacción con BNPP no hidrolizado y (b) una mezcla de reacción con BNPP hidrolizado. En la disolución (a) no se detecta la presencia de fosfato, en la disolución (b) se determinó: $0.046 \pm 0.005 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$ (y espectrofotométricamente $0.083 \pm 0.002 \text{ mM}$ 4-nitrofenolato). En resumen: 1) no se desarrolla color para PO_4^{3-} cuando se utiliza BNPP no hidrolizado y 2) estos resultados muestran que los productos de reacción contenían un equivalente de fosfato y dos equivalentes de 4-nitrofenolato por un equivalente de BNPP hidrolizado.

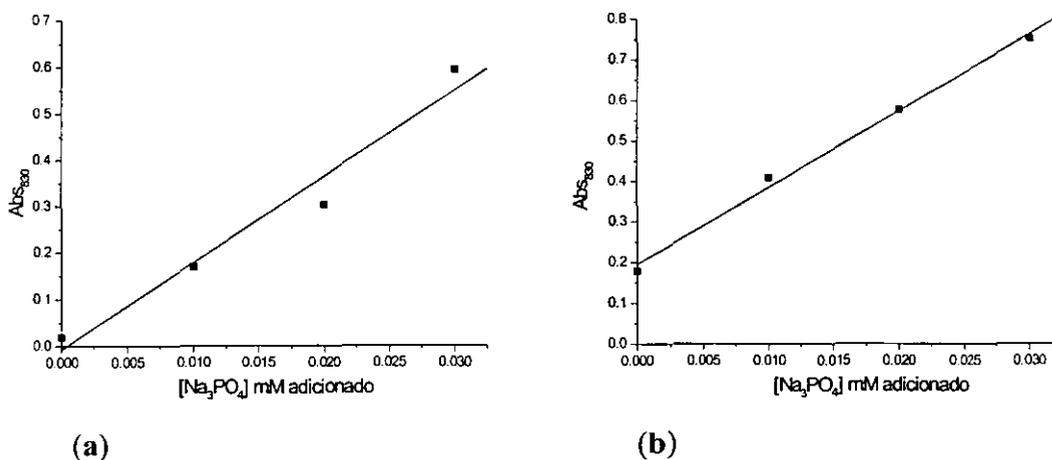
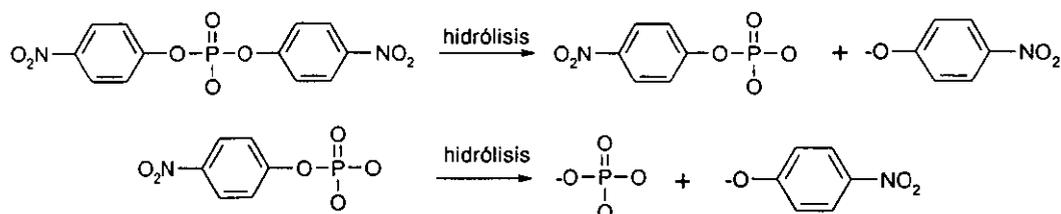


Fig.7.3. Determinación de fosfato en las disoluciones empleadas para cinética, 0.04 mM de sustrato BNPP, 20 mM de BTP, 2 mM La(III). (a) Disolución con BNPP sin hidrolizar. (b) Disolución con BNPP hidrolizado.

Durante la cinética de hidrólisis de BNPP se observó la liberación de dos equivalentes de 4-nitrofenolato por un mol de sustrato. Sin embargo en algunos casos los perfiles de absorbancia en función del tiempo mostraron una desviación notable de una cinética simple de primer orden

cuando la velocidad de hidrólisis del intermediario, MNPP, fue muy lenta. Estas curvas cinéticas se ajustaron a una ecuación exponencial un poco más compleja, derivada del esquema de dos etapas sucesivas de hidrólisis de primer orden (*Esquema 7.1*): la hidrólisis de BNPP a MNPP y la posterior hidrólisis de MNPP a fosfato con la liberación de un equivalente de 4-nitrofenolato en cada etapa (ver Anexo 1).



Esquema 7.1

$$A_t = \epsilon_{NP} [\text{BNPP}]_0 \left\{ 2 + (k_{\text{obs},1} e^{-k_{\text{obs},2} t} + (k_{\text{obs},1} - 2k_{\text{obs},2}) e^{-k_{\text{obs},1} t}) / (k_{\text{obs},2} - k_{\text{obs},1}) \right\} \quad (7.1)$$

en donde A_t es la absorbancia al tiempo t , ϵ_{NP} y $[\text{BNPP}]_0$ son la absorptividad molar del anión 4-nitrofenolato a un pH dado y la concentración inicial del sustrato respectivamente y $k_{\text{obs},1}$ y $k_{\text{obs},2}$ son las constantes de velocidad de la ruptura de BNPP y MNPP respectivamente. Este esquema fue verificado comparando primero, las constantes de velocidad calculadas con la ecuación 7.1 contra las constantes de velocidad obtenidas de las velocidades iniciales (k_{obs} de la primera etapa) y después, con los valores de las constantes de velocidad de las cinéticas de hidrólisis de MNPP (k_{obs} de la segunda etapa).

Las disoluciones de reacción se prepararon combinando las cantidades apropiadas de disoluciones frescas de ligante y patrón de metal al volumen deseado (en total 2500 μL considerando el sustrato); el pH se ajustó adicionando pequeñas cantidades de disoluciones acuosas de HClO_4 cuyo volumen fue considerado en el total. Es importante mencionar que primero se fijó el valor de pH del ligante de forma que al hacer la adición del metal el pH fuera ligeramente mayor al deseado. De esta forma no se usó una base concentrada para ajustar el pH y se previno la formación local de precipitados. A las reacciones con hidroxilamina se les burbujeó N_2 para evitar su descomposición.

Las reacciones se iniciaron adicionando una alícuota de disolución de sustrato, teniéndose especial cuidado en prevenir, hasta donde fue posible, la presencia de CO_2 durante las corridas cinéticas. El pH de las disoluciones a medir fue determinado al inicio y al final de cada corrida y

se excluyeron las corridas cinéticas en las que se obtuvo una variación mayor de 0.05 unidades. Para obtener una capacidad amortiguadora adecuada las cinéticas fueron estudiadas, en general, en exceso de ligante respecto a la concentración del metal. En algunos casos fue necesario adicionar un amortiguador cuya contribución a la velocidad de reacción fue restada.

Para el sistema de OXDAP e iones metálicos, la fuerza iónica de las disoluciones se fijó adicionando NaCl 0.1 M como electrolito soporte. Sin embargo, la ruptura de PNPA se inhibe en presencia de iones cloruro (Fig.9.3b), por lo que para los otros sistemas estudiados, se decidió emplear un electrolito soporte menos coordinante: NaClO₄.

Para los sistemas de BDM, Tris y BTP en presencia de iones lantánidos, se observó que la adición de NaClO₄ como electrolito soporte inhibe fuertemente las reacciones de ruptura de los sustratos (Fig.14.2a), lo que indica que es posible que se formen pares iónicos entre el anión perclorato y las especies reactivas de los lantánidos cargadas positivamente. Por estas razones se decidió emplear un electrolito soporte solamente cuando el cambio en la fuerza iónica fuera considerable. Los experimentos realizados para estudiar la dependencia de k_{obs} al variar el pH y la dependencia de k_{obs} al variar la concentración de iones lantánidos se llevaron a cabo en presencia de un exceso de ligante, y no fue necesario adicionar un electrolito soporte. A estas condiciones el cambio máximo que experimenta la fuerza iónica al aumentar las concentraciones de los lantánidos hasta 5 mM, o variar el pH en el intervalo de 6.5 a 9.0 es de $\Delta I = 0.003$ M sin adicionar un electrolito soporte; este cambio es menor al 5% de la fuerza iónica total, ya que la mayor contribución proviene del ligante en exceso. Por lo tanto para estos sistemas solamente se adicionó NaClO₄ como electrolito soporte al variar la concentración del ligante.

7.3. ¹H-Resonancia Magnética Nuclear

Las disoluciones empleadas se prepararon en D₂O, sin embargo, en algunos casos, las disoluciones patrón de los percloratos de los metales tenían cierta cantidad de H₂O correspondiente a la tomada de la disolución original (40 % en peso) adquirida. Las muestras se prepararon combinando las cantidades apropiadas de disoluciones deuteradas frescas de ligante y de metal al volumen deseado, y los valores de pH se ajustaron haciendo pequeñas adiciones de disoluciones deuteradas de HClO₄. Posteriormente, los valores instrumentales de pH medidos en D₂O fueron corregidos a sus respectivos valores de pD con la ecuación $pD = pH + 0.4$.^{167,168}

7.4. Espectrometría de masas con ionización por electrospray

Esta técnica ha sido aplicada para la caracterización de complejos metálicos en disolución acuosa en varios sistemas con buenos resultados.^{169,170} Esta variante de la espectrometría de masas permite pasar a fase gas los iones a analizar directamente de la disolución acuosa con poca fragmentación, y por tanto puede proporcionar información cualitativa de la naturaleza de las especies cargadas que existen en disolución acuosa. Se obtuvieron los espectros de disoluciones de BTP 20 mM, BTP 20 mM y La(III) 1 mM; en todos los casos el pH fue ajustado a 9.2.

7.5. Ruptura de de ADN.

La metodología empleada para la hidrólisis de ADN se incluye en la sección 16.

RESULTADOS Y DISCUSION

8. Ruptura de fosfoésteres con hidroxilamina

Desde la década de los 60's se sabe que la hidroxilamina es un α -nucleófilo^{23,32} con una reactividad muy alta en la hidrólisis de PNPA ($k_{\text{NH}_2\text{OH}} \sim 1.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C),²⁶ particularmente en su forma desprotonada NH_2O^- ($k_{\text{NH}_2\text{O}^-} = 3.65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C).⁵⁰ Esta alta reactividad del anión NH_2O^- también se observó con triésteres fosfato⁵⁰ pero su reactividad con fosfodiésteres no ha sido investigada, por lo que decidió probarse con el sustrato BNPP.

El anión de hidroxilamina es muy básico ($\text{p}K_a$ de NH_2OH es 13.73) y por esto su alta reactividad se manifiesta solamente en medios alcalinos. Se hicieron experimentos para evaluar la reactividad de la hidroxilamina y se observó que a pH 12.0 hay un efecto sobre la ruptura de BNPP: en presencia de hidroxilamina la reacción es más rápida que la simple hidrólisis alcalina (Fig.8.1); la velocidad depende fuertemente del pH y en menor proporción de la fuerza iónica. La dependencia de la k_{obs} de primer orden respecto a la concentración de hidroxilamina es lineal (Fig.8.2) y la constante de segundo orden para el anión de la hidroxilamina, obtenida de la pendiente de la recta corregida por la desprotonación parcial de la hidroxilamina es $k_{\text{NH}_2\text{O}^-} = 5.1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (a pH 12.0 solamente 2% de la hidroxilamina se encuentra en forma aniónica). El efecto de aceleración en la ruptura de BNPP debido al anión oximato es de casi 100 veces comparado contra la hidrólisis alcalina ($k_{\text{OH}^-} = 5.83 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)³⁸ haciéndolo un sistema interesante para estudios más detallados.

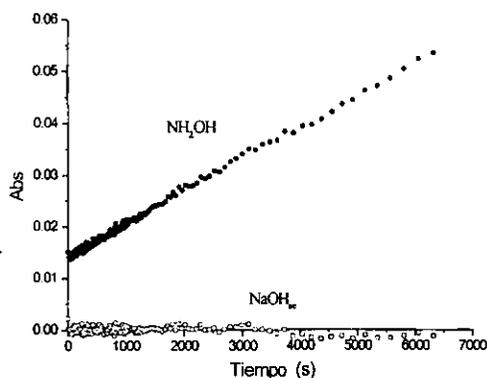


Fig.8.1. Curva cinética de hidrólisis de BNPP a 25°C . Círculos vacíos hidrólisis a pH 12.00. Círculos rellenos hidrólisis en presencia de NH_2OH 20 mM a pH 12.00.

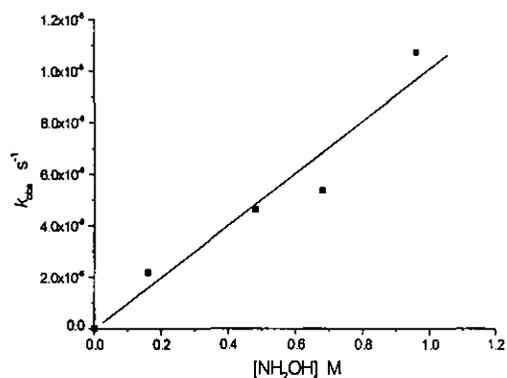


Fig.8.2. Constantes de velocidad observadas en la ruptura de BNPP 0.04 mM, pH= 12.00, $I = 1.0 \text{ M}$ NaCl, 25°C .

Sin embargo, para la posible aplicación de este sistema en la ruptura de ésteres fosfato, no es deseable que la reactividad del anión oximato, NH_2O^- , sólo se observe en condiciones de pH muy básico; sería deseable que esta especie nucleofílica pudiera formarse a valores de pH cercanos a la neutralidad. Una forma de lograrlo es mediante su coordinación con iones metálicos ya que se sabe que, por un lado, la hidroxilamina tiene posibilidades de coordinarse con algunos iones metálicos como Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) o Zn(II),⁵⁴ y por otro lado, uno de los efectos importantes sobre un ligante coordinado, es la disminución de su $\text{p}K_a$. Por lo tanto, se buscó un efecto catalítico empleando iones metálicos.

Se probaron varios cationes divalentes: metales de la primera serie de transición Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) y además, Cd(II), Pb(II) y Hg(II) en el intervalo de concentraciones de 0-20 mM para el metal y 0-1.5 M para NH_2OH , variando el pH desde 6.5 hasta el valor de pH más alto impuesto por la precipitación del metal, sin encontrar resultados positivos. Para mantener el pH constante se probaron varios amortiguadores, particularmente de tipo biológico como MES, MOPS, HEPES, TRIS, BisTris, BTP, y en ningún caso se observaron resultados positivos. A bajas concentraciones de metal, 1 mM, no hay efecto, y a concentraciones altas, 15 mM, se observa precipitación o la aparición de reacciones de óxido reducción como en el caso de Mn(II). Se decidió entonces probar cationes más ácidos en términos de Lewis, como los cationes trivalentes de lantánidos, Ln(III), empezando por La(III).

Se fijó la concentración de hidroxilamina en 20.0 mM, una concentración en exceso de BTP como amortiguador, 50 mM, y el valor de pH en 9.0 (el mayor valor de pH antes de la precipitación de hidróxido de lantano). Bajo estas condiciones, en ausencia de metal, se puede despreciar la contribución de la hidroxilamina a la velocidad de reacción ya que los valores obtenidos son del orden del error calculado para estos experimentos. En presencia de La(III), las constantes de velocidad observadas de primer orden, k_{obs} , son mucho mayores que las reportadas para el acuoación libre¹²³ o la hidroxilamina, pero la dependencia de k_{obs} en función de la concentración de metal (Fig.8.3) muestra un comportamiento con "saturación" similar al encontrado en la literatura para hidrólisis de BNPP en presencia de lantanidos.^{123,131}

Esta dependencia se ajustó con una curva tipo Michaelis-Menten cuyo esquema cinético involucra un equilibrio complejo-sustrato seguido de la ruptura del sustrato ($k_{\text{cat}} * [\text{Catalizador}] / (K_M + [\text{Catalizador}])$), ver anexo A1. Al hacer este ajuste (Fig.8.3) se encontraron los valores de $k_{\text{cat}} = 2.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $K_M = 5.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a pH 9.0 y 25°C, que muestran

un efecto de aceleración respecto a la reacción no catalizada e incluso respecto a los valores obtenidos para esta acucación con el mismo sustrato a una temperatura más elevada ($k_{\text{cat}} = 1.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 2.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a 50°C , pH 7.0).¹²³

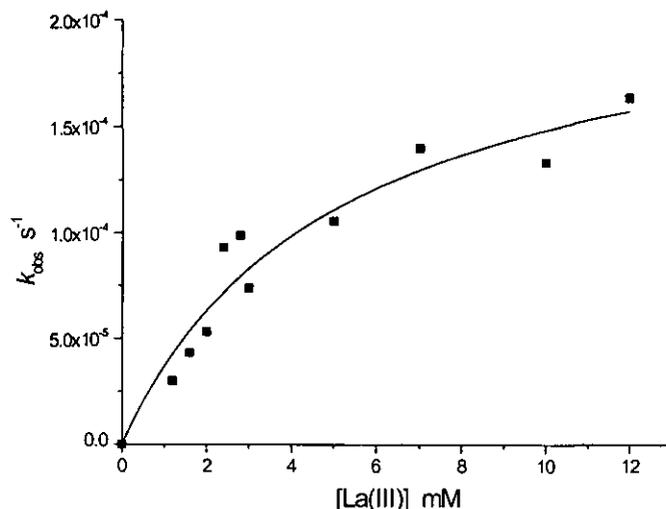


Fig.8.3. Constantes de velocidad observadas en la esterólisis de BNPP 0.04 mM a pH 9.0 y 25°C en presencia de NH_2OH 20 mM y BTP 50 mM. Los cuadros rellenos son los valores promedio de las constantes de velocidad observadas de primer orden y la línea el ajuste a una ecuación tipo Michaelis-Menten: $(k_{\text{cat}} * X) / (K_M + X)$.

El orden respecto a la concentración de NH_2OH , en presencia de BTP 50 mM y La(III) 2 mM a pH 9.0 y 25°C , sólo pudo obtenerse de manera aproximada debido a la dispersión observada en las constantes de velocidad (Fig.8.4). Considerando esta dependencia lineal, el orden de reacción es 1 para NH_2OH y la constante de segundo orden correspondiente es de $8.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. No obstante el error obtenido en la constante de segundo orden, si comparamos las constantes de velocidad observadas ($\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) con la velocidad de hidrólisis alcalina a las mismas condiciones ($k_{\text{hid}} = 6 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ a 25°C , pH 9.0),³⁸ es claro que existe un efecto catalítico de más de 10^6 veces. Por otro lado, el grado de desprotonación de la hidroxilamina a pH 9 es despreciable (0.002%) y probablemente la reactividad observada debe atribuirse a la interacción de BNPP con NH_2OH neutra catalizado por La(III) .

Se hicieron experimentos para determinar una constante de estabilidad entre La(III) e hidroxilamina en las condiciones de trabajo pero no se obtuvieron buenos resultados, probablemente debido a que es muy pequeña. Por tanto, el empleo de la hidroxilamina como ligante es muy limitado debido a la baja estabilidad que, presumiblemente, tiene su complejo con La(III) y no es posible realizar estudios más detallados de las especies en disolución.

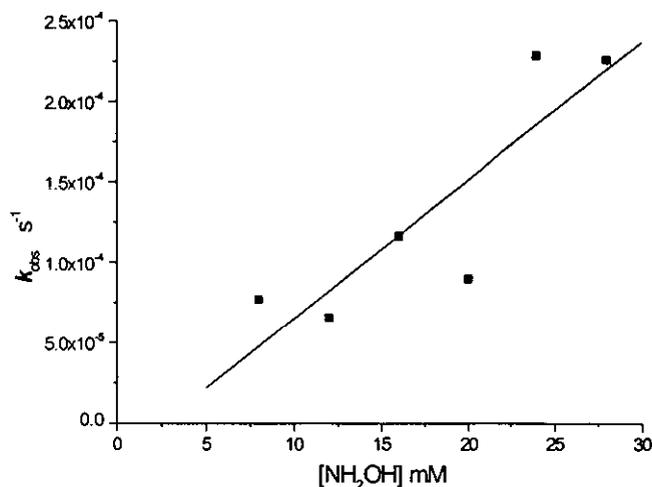


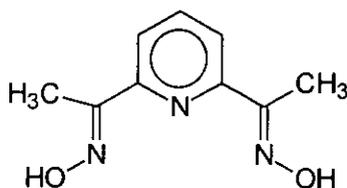
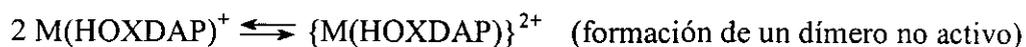
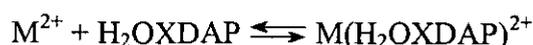
Fig.8.4. Constantes de velocidad observadas en la hidrólisis de BNPP 0.04 mM en presencia de BTP 50 mM, La(III) 2 mM, pH = 9.0, 25°C. Los cuadros rellenos son los promedios de las constantes (error ~ 20%) y la línea continua muestra un ajuste lineal para estos datos.

9. Hidrólisis de ésteres con derivados de hidroxilamina

El sistema encontrado con hidroxilamina es un sistema interesante en términos de su reactividad frente a fosfodiésteres, sin embargo, nuestros esfuerzos por incrementar la reactividad del sistema en presencia de iones metálicos fueron infructuosos. Una alternativa es trabajar con derivados de hidroxilamina, como las oximas formadas a partir de compuestos carbonílicos e hidroxilamina,¹⁷¹ para las cuales se puede elegir un derivado carbonílico que favorezca su coordinación con iones metálicos.

9.1. OXDAP-M(II) en la ruptura de PNPA

En trabajos previos se mostró que la 2,6-diacetilpiridín dioxima (OXDAP 9-1), que tiene una estructura más apropiada para coordinarse que la hidroxilamina, forma complejos estables con varios iones metálicos (M= Cd(II), Mn(II), Pb(II), Zn(II), Hg(II), Pr(III), Ni(II), Cu(II) y Co(II)); estos complejos son capaces de hidrolizar PNPA y pueden completar varios ciclos catalíticos.^{33,172} El esquema de los procesos establecido mediante titulaciones espectrofotométricas y datos cinéticos¹⁷² se puede resumir como sigue:

9-1 (H₂OXDAP)

Esquema 9.1

Aunque el PNPA, derivado de ácido carboxílico, es un sustrato mucho más activado que los ésteres fosfato, su estudio nos permite evaluar si el sistema podría tener actividad fosfoesterolítica. Los resultados de estos trabajos se resumen en la tabla 9.1.

La OXDAP desprotonada tiene reactividad nucleofílica muy alta (Tabla 9.1, renglón 3) sin embargo, debido al alto valor de pK_a de su ácido conjugado, la reactividad observada de esta oxima en medios neutros es baja, renglón 2. La coordinación con metales, como se esperaba, induce una disminución considerable del pK_a (ver la última columna de Tabla 9.1). Debido a este efecto, a pH 8 la OXDAP coordinada ya se encuentra desprotonada y la constante de segundo orden observada para el sistema OXDAP/M(II) a este pH ya coincide con la k_2 reportada en la Tabla 9.1. Así, por ejemplo para el complejo con Cd(II) a pH 8.0 la reactividad sube 10^4 veces comparada con la reactividad de la oxima libre (ver renglones 2 y 4, Tabla 9.1). Esto se debe a que se incrementa la concentración del nucleófilo presente en disolución por desplazamiento de su pK_a .

Tabla 9.1. Efecto de los iones metálicos en presencia de OXDAP en la esterólisis de PNPA 25°C.

	Metal- OXDAP	$k_2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	pK_a
1	OH^- ^a	14.0	15.7
2	Oxima ^b	0.0415 ± 0.0025	-----
3	Oximato ^c	90 ± 10	11.3
4	Cd(II)	518 ± 6	7.1
5	Mn(II)	283 ± 25	7.0
6	Pb(II)	207 ± 16	6.4
7	Zn(II)	53.5 ± 2.2	≤ 6.0
8	Hg(II)	3.5 ± 1.6	
9	Pr(III)	2.7	
10	Ni(II)	0.092 ± 0.008	
11	Cu(II)	no se detectó catálisis	2.8
12	Co(II)	no se detectó catálisis	
13	9-2 ^d	17.3	9.75
14	9-3 ^e	0.13	7.7
15	quimotripsina ^f	2800	7.0

^a Constante de velocidad reportada $k_{\text{OH}^-} \approx 14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C (Ref.26)

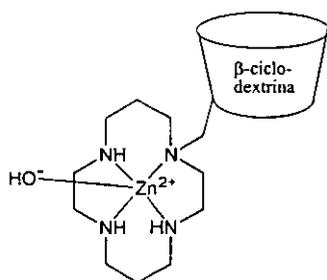
^b Constante de velocidad observada a pH 8.0 para un grupo oximato.

^c Constante de velocidad observada para el anión de la OXDAP

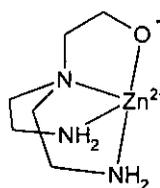
^d Ref. 173.

^e Ref. 174.

^f Ref. 175.



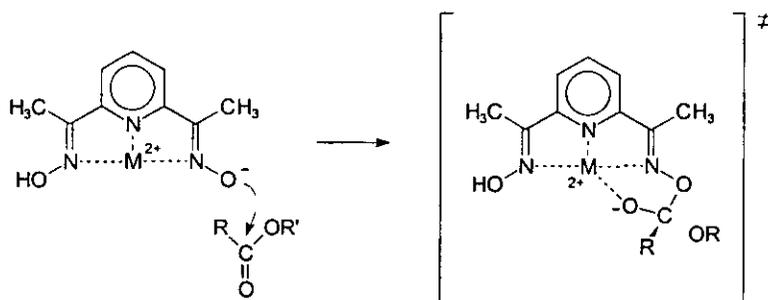
9-2



9-3

La reactividad de la oxima coordinada es función de su basicidad (Tabla 9.1) tal como se esperaría para las oximas con valores de pK_a menores que 7 (ver antecedentes). De estos resultados es importante resaltar que para Cd(II), Mn(II) y Pb(II) la constante de esterólisis es aún mayor que la que se puede calcular considerando que toda la oxima está disponible como nucleófilo, en forma de ion oximato; también es mayor al valor que podría esperarse de acuerdo al efecto de nivelación, que en las coordenadas de Brønsted se observa para los iones oximato

(Figura 3.1).²³ Una posible interpretación de esta gran reactividad precisa de un factor adicional al de la disminución del pK_a de la oxima, y resulta lógico pensar que el estado de transición se ve estabilizado por el ion metálico (*Esquema 9.2*). Cabe mencionar que la estabilización de la carga en la ruptura de ésteres de ácidos carboxílicos adquiere mayor importancia al pasar a ésteres fosfato.¹⁷ El fenómeno de “sobrerreactividad” del oximato coordinado observado en este estudio ha atraído la atención en la literatura⁸⁴ y aparte del mecanismo presentado en el esquema 2 fueron propuestos otros factores, tales como los efectos electrónicos de los sustituyentes en el ligante.



Esquema 9.2: Estabilización del estado de transición por el ion metálico

La reactividad esterolítica hacia PNPA como sustrato se usa tradicionalmente como una medida de la eficiencia de varios modelos de enzimas hidrolíticas. Tomando en cuenta este aspecto, la Tabla 9.1 incluye datos para algunos modelos basados en los complejos metálicos más recientes (renglones 13 y 14). El complejo 9-2 donde el nucleófilo coordinado es OH^- tiene la reactividad ca. un orden de magnitud más baja que $\text{Cd}(\text{OXDAP})$ y además el valor de pK_a alto hace el sistema sea poco eficiente en disoluciones neutras. En el complejo 9-3 el nucleófilo es un alcóxido y su reactividad no alcanza ni siquiera la reactividad de OH^- libre, de hecho es 100 veces más baja. Es notable, que nuestro sistema con $\text{Cd}(\text{II})$ casi alcanza la reactividad de la quimotripsina que es una enzima hidrolítica cuya reactividad tradicionalmente se usa como referencia para “esterasas” artificiales (renglón 15).

Otro resultado interesante es que aunque la constante catalítica obtenida para el ion $\text{Pr}(\text{III})$ comparada con las obtenidas en presencia de los otros metales tiene un valor pequeño, si existe un efecto, y de acuerdo con las referencias encontradas en la literatura los iones lantánidos son catalizadores de la hidrólisis de ésteres y aún de ésteres no activados como fosfodiésteres. Cabe mencionar que este ion tiene mayor carga positiva que los otros iones metálicos probados, por

tanto, la reactividad observada frente a PNPA no depende únicamente de la carga del ion metálico en el compuesto de coordinación sino de la naturaleza del metal como se esperaba (ver Antecedentes).

Es muy posible que la baja reactividad de la OXDAP en presencia de Pr(III) se deba a que estos iones tienen muy poca afinidad por el ligante y los complejos formados sean muy débiles. Esto concuerda con el hecho de que, a diferencia de los cationes de metales de transición, los lantánidos tienen poca afinidad para ligantes totalmente nitrogenados (ver capítulo 4).

9.2. OXDAP-M(II) en la hidrólisis de BNPP

Con base en la alta reactividad encontrada para el sistema OXDAP-M(II) se decidió probarlo en la ruptura del fosfodiéster BNPP. Se probaron los complejos con Cd(II), Mn(II), Pb(II), Zn(II), Ni(II) y Cu(II) y se obtuvieron resultados de una reactividad adecuada para realizar estudios más detallados sólo en el caso de Cd(II), Tabla 9.2.

Tabla 9.2. Efecto de los iones metálicos con OXDAP en la ruptura del BNPP, pH 7.0, 50°C, [metal(II)]=[OXDAP]=10 mM.

Metal	$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
Co(II)	1.8×10^{-5}
Ni(II)	9.2×10^{-6}
Cu(II)	no hay reactividad
Zn(II)	3.2×10^{-5}
Cd(II)	4.7×10^{-5}

El efecto del complejo OXDAP-Cd(II) en la hidrólisis del diéster se ilustra en la curva cinética de la Fig.9.1 comparado con la OXDAP a las mismas condiciones. Llama la atención que no sigue una cinética de primer orden, y es aproximadamente lineal aun cuando ya se ha hidrolizado irreversiblemente más del 30% del sustrato, condiciones a las que se esperaría cierta curvatura. Debido a que el sustrato tiene 2 grupos nitrofenolato, es posible que se observe la ruptura de ambos grupos y no de uno solo, y que las velocidades de ruptura sean diferentes. Considerando lo anterior, se analizaron las curvas cinéticas con un modelo cinético para el que se plantea un mecanismo de hidrólisis consecutivas, ecuación (7.1) (ver sección 7.2 y Anexo 1).

Para la curva cinética mostrada las constantes de velocidad observadas (k_1 y k_2) son del mismo orden de magnitud ($k_1 = 3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_2 = 2.79 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) y por esta razón aparenta ser una línea recta que, dada la irreversibilidad de la hidrólisis del sustrato y la concentración de sustrato empleada, es inexplicable como velocidad inicial.

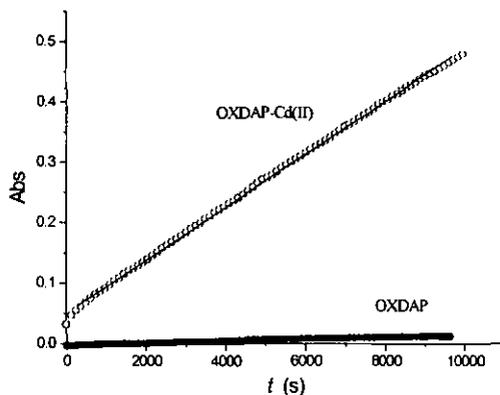


Fig.9.1. Curva cinética de la hidrólisis de BNPP con OXDAP 10 mM en presencia y ausencia de Cd(II) 10 mM a pH 8.0, Tris 10 mM. Círculos rellenos: OXDAP, círculos vacíos: complejo OXDAP-Cd(II). La línea sólida es el ajuste al modelo cinético de hidrólisis sucesivas, ecuación (7.1).

Se estudió la dependencia de la constante de velocidad de fosfoesterólisis respecto a la concentración de la oxima, a una concentración fija del metal (1 mM). De estos datos es posible decir que a bajas concentraciones de oxima, es decir, en exceso de metal, la constante de velocidad observada es mayor que al acercarse a una relación metal-ligante 1:1 (Fig.9.2). Esta disminución aparente en la reactividad se debe a la formación de complejos diméricos inactivos en la disolución.

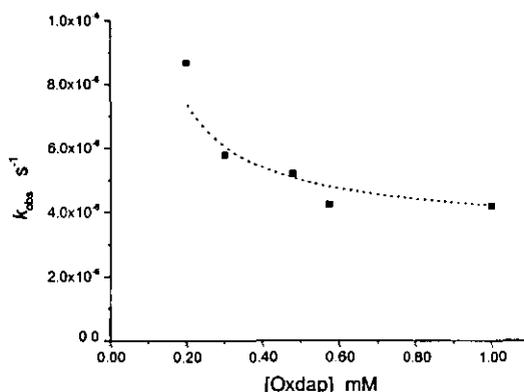


Fig.9.2. Dependencia aparente de la constante de velocidad observada en la hidrólisis de BNPP en función de concentración de OXDAP a pH 8.0 y 25°C, en presencia de Cd(II) 1mM y Tris 10 mM. La línea punteada muestra la tendencia de los datos experimentales.

La dependencia de k_{obs} en función de la concentración del complejo OXDAP-Cd(II) se muestra en la Fig.9.3. El orden respecto al complejo es 2, lo cual implica que a diferencia del mecanismo para la hidrólisis de PNPA, para los ésteres fosfato se requiere la participación de dos complejos. No fue posible realizar estudios variando la relación metal:ligante o extender el intervalo de concentraciones debido a la baja solubilidad del complejo en disolución acuosa. Se encontró que la participación del contraion es importante: un medio con cloruros (Fig.9.3a) comparado contra un medio con nitratos (Fig.9.3b) tiene una influencia negativa sobre las constantes de velocidad posiblemente por competir con la OXDAP como ligante, por tanto, es importante trabajar con los contraiones menos coordinantes como percloratos.

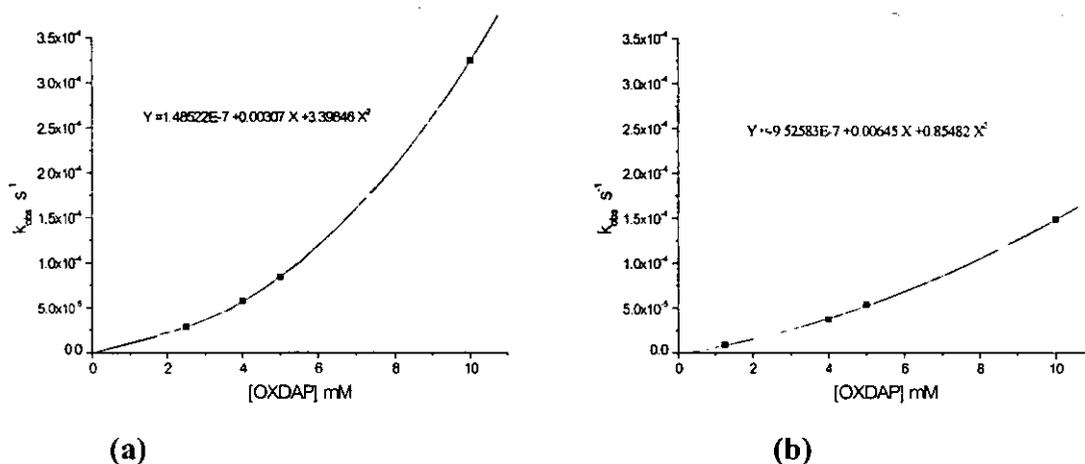


Fig.9.3. Dependencia de la constante de velocidad observada de primer orden en la hidrólisis de BNPP respecto a la concentración del complejo OXDAP-Cd(II) en relación 1:2 (exceso de metal) a pH 8.0, 50°C. BNPP 0.04 mM, Tris 10 mM. (a) medio NO_3^- , (b) medio Cl^- .

En la literatura se han reportado estudios de hidrólisis de ésteres fosfato a diferentes temperaturas en el intervalo de 25 a 100 °C, dependiendo de la reactividad del sistema empleado. Por tanto, para poder comparar este sistema, resulta importante evaluar la dependencia de k_{obs} respecto la temperatura para nuestro sistema OXDAP-Cd(II).

Para ello se varió la concentración de la OXDAP en presencia de un exceso de Cd(II) a tres temperaturas: 37, 50 y 60° C y se calculó a cada concentración la energía de activación (Tabla 9.3, Figuras 9.4 y 9.5). De este pequeño estudio podemos decir que la energía de activación no depende de la concentración de la oxima, y por tanto del complejo, y permitió estimar la energía de activación del proceso en 14 Kcal mol⁻¹, valor que está en un intervalo normal (~20 Kcal mol⁻¹).³⁸

Tabla 9.3. Constante de velocidad observada de primer orden y energía de activación en función de la concentración de OXDAP, $[\text{Cd(II)}] = 1 \text{ mM}$.

[OXDAP] M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$ a 50°C	E_a (Kcal mol^{-1})
1.99×10^{-4}	8.67×10^{-6}	15.2
2.99×10^{-4}	5.80×10^{-6}	16.7
3.98×10^{-4}	3.24×10^{-6}	14.8
4.78×10^{-4}	5.19×10^{-6}	12.5
7.64×10^{-4}	7.12×10^{-6}	13.9
1.0×10^{-3}	4.20×10^{-6}	16.4

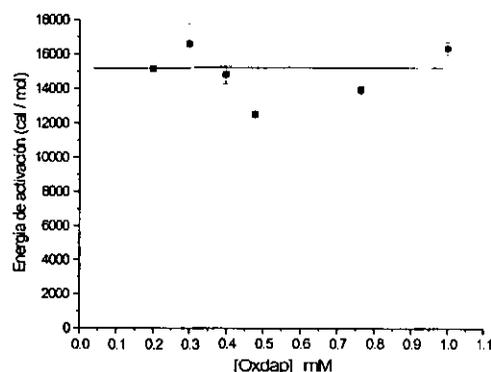
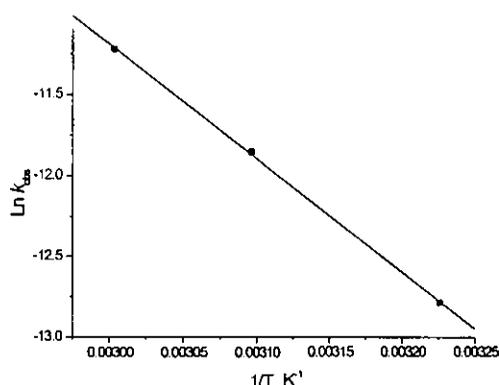


Fig.9.4. Dependencia de la constante de velocidad observada en función de la temperatura a pH 8.0. OXDAP 7.6 mM, Cd(II) 1mM, Tris 0.1 M. $E_a = 13.9 \text{ Kcal/mol}$.

Fig.9.5. Efecto de la concentración de OXDAP sobre la energía de activación en la hidrólisis de BNPP a pH 8.0. Cd(II) 1mM.

Vale la pena mencionar que la reactividad del sistema OXDAP-Cd(II) es suficientemente alta para catalizar la ruptura de ADN superenrollado como sustrato: promueve su hidrólisis incluso a pH 7.0 (ver Capítulo 16).

En resumen, para el sistema OXDAP-M(II), se encontró que se forman complejos estables con varios cationes y particularmente con Cd(II), Mn(II) y Pb(II) tiene una reactividad esterolítica muy alta frente a PNPA; sin embargo la posible aplicación de los complejos de Mn(II) y Pb(II) es limitada: a altas concentraciones de Mn(II) se forman productos de oxidación y el complejo de Pb(II) es poco soluble. El complejo de Cd(II) además mostró reactividad esterolítica frente a dos fosfodiésteres, BNPP y ADN_{SE} , con efectos moderados: las k_{obs} son del orden de 10^{-6} s^{-1} a 50°C . Se observó cierta reactividad de OXDAP con Pr(III) aunque el catión tiene muy poca afinidad por el ligante, por lo tanto, resulta interesante probar otro tipo de ligantes, donadores mixtos de oxígeno y nitrógeno, con cationes trivalentes.

9.3. Sistema BDM-M(III) en disolución.

La monoxima derivada de la 2,3-butanodiona (BDM) forma complejos con Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) y Cu(II) que son insolubles en disolución acuosa, y se ha comprobado, mediante espectroscopía IR, que la especie que se encuentra presente en estos complejos es el anión oximato.¹⁷⁶ Por otro lado, en estudios de fisiología celular se ha probado que esta oxima inhibe la respiración mitocondrial dependiente de ADP (adenosín difosfato),¹⁷⁷ que es un agente nucleofílico que defosforila la acetilcolinesterasa “envenenada” con organofosfatos¹⁷⁸ y se sabe que promueve la defosforilación de proteínas.¹⁷⁹ En estos estudios se ha sugerido repetidamente que la oxima BDM, por ser un nucleófilo fuerte, puede actuar como una “fosfatasa química” *in situ*.¹⁷⁹⁻¹⁸² Debido a estas características y a su estructura, es posible que en presencia de cationes metálicos se pueda activar el ion oximato a pH cercano a la neutralidad. En esta tesis se probó la BDM como nucleófilo en la hidrólisis de sustratos modelo (ésteres y fosfoésteres) en presencia de iones metálicos.

A partir de titulaciones potenciométricas se determinó para la oxima BDM un valor de $pK_a = 9.40 \pm 0.02$ a 25°C y $I = 0.1 \text{ M NaClO}_4$ (Fig. 9.6a) que concuerda razonablemente con el valor reportado en la literatura, 9.5 a 25°C en medio EtOH/agua.¹⁷⁶ Durante estos experimentos se observó que la oxima BDM presenta un cambio de color reversible en función del pH por lo que también se determinó su pK_a mediante espectrofotometría UV-Visible a 350, 360, 370, 380, 390 y 400 nm (Fig.9.6b) encontrándose un valor promedio de 9.45 ± 0.02 25°C y $I = 0.1 \text{ M NaClO}_4$. Los valores de pK_a determinados por ambas técnicas coinciden entre sí, indicando que ambos valores son de la oxima BDM.

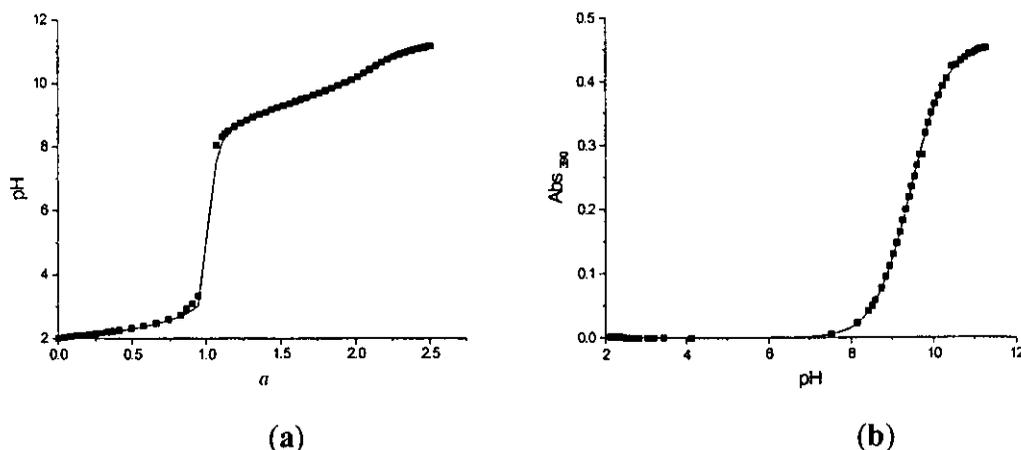
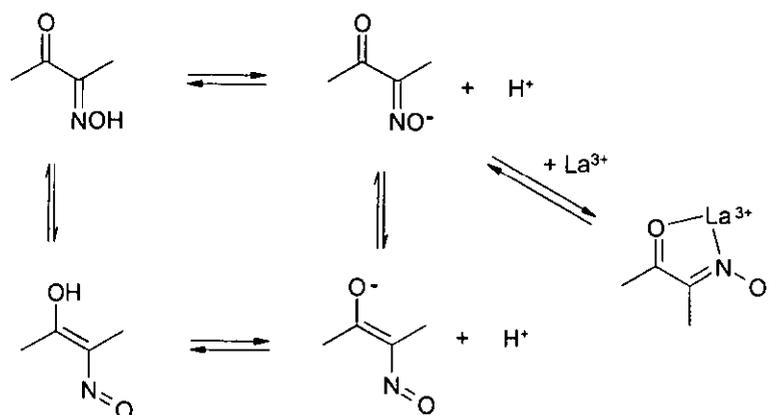


Fig.9.6. Curvas de titulación de la oxima BDM a 25°C y fuerza iónica 0.1 M NaClO_4 . Los cuadros rellenos muestran los puntos experimentales y las líneas las curvas calculadas con los respectivos valores obtenidos de pK_a . (a) Titulación potenciométrica, (b) titulación espectrofotométrica a 390 nm.

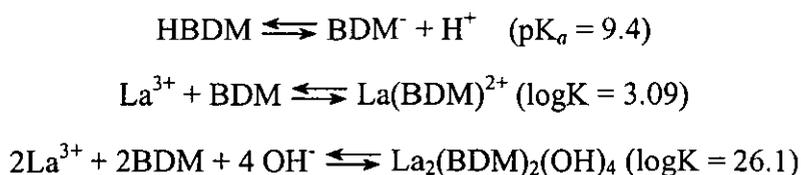
Llama la atención la aparición de un color amarillo de baja intensidad ($\epsilon \sim 50 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), en las disoluciones básicas de la oxima. Es probable que este color se deba a una contribución del tautomero nitroso-enolato que genere un sistema deslocalizado, *Esquema 9.3*.



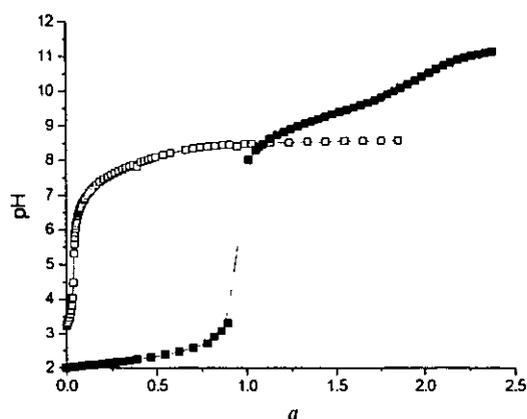
Esquema 9.3

Se encontró que esta oxima, en concentraciones de 2-20 mM, estabiliza varios cationes lantánidos (1-10 mM) hasta valores de pH cercanos a 9. En presencia de los iones metálicos en disoluciones básicas la oxima pierde su color, por lo que el metal debe favorecer la estructura oximato, *Esquema 9.3*.

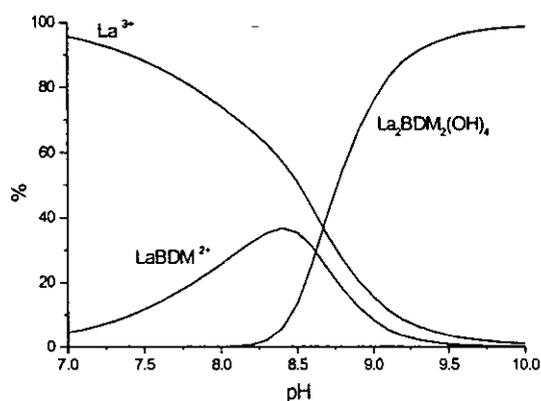
La titulación de BDM en presencia de un equivalente de La(III) se desvía de la curva obtenida para el ligante: no muestra la presencia del punto de inflexión observado para la oxima al adicionar un equivalente de NaOH, y se observa el consumo de más de un equivalente de NaOH por equivalente del metal (Fig 9.7a) por lo que aunque este experimento se realizó en un intervalo corto de pH, es razonable considerar la formación de hidroxocomplejos. Para esta curva de titulación se encontró que el mejor modelo de ajuste incluye solamente un complejo mononuclear y un complejo dinuclear con cuatro grupos hidroxilo. Los equilibrios para este sistema son:



Esquema 9.4



(a)



(b)

Fig 9.7. (a) Curvas de titulación potenciométrica de la oxima BDM 10 mM y un equivalente de HClO_4 (cuadrados rellenos) y de la mezcla de BDM y La(III) 10 mM (cuadrados vacíos) a 25°C y fuerza iónica 0.1 M NaClO_4 . (b) Curvas de distribución de especies para BDM 10 mM y un equivalente de La(III) de acuerdo al esquema 9.4.

9.4. BDM-M(III) en la ruptura de BNPP.

En ausencia de iones metálicos y en concentraciones 2-20 mM de BDM las constantes de velocidad observada de primer orden de la ruptura de BNPP tienen valores $\sim 10^{-7}$ - 10^{-8} s^{-1} en el intervalo de pH entre 6.5-9.5, que si bien son mayores a las debidas únicamente a la hidrólisis alcalina del sustrato, pueden despreciarse frente a las obtenidas en presencia de iones metálicos, por ejemplo, a pH 9 en presencia de BDM 20 mM y La(III) 2 mM la constante es de $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Las constantes de velocidad observada de primer orden (k_{obs}) respecto a la concentración de BDM a pH 9.0 en presencia de La(III) 2 mM, Fig.9.8, muestran una disminución al aumentar la concentración de oxima (4-48 mM).

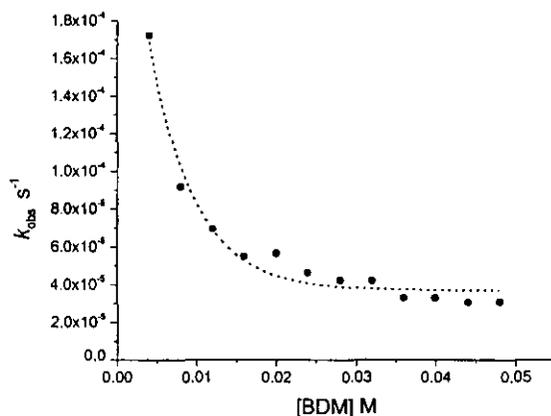


Fig.9.8. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de BNPP en función de la concentración de BDM en presencia de La(III) 2 mM, pH 8.5 y 25°C. La línea muestra la tendencia de los datos experimentales.

Las constantes de velocidad observada en presencia de La(III)-BDM en relación 1:1, son 10 veces mayores que en un exceso de oxima (~1:10) comparadas al mismo valor de pH (Fig.9.9). Evidentemente, con el exceso de BDM se forman complejos M:L de estequiometría 1:2 o mayor, que no se detectan en la titulación potenciométrica hecha a una relación metal:ligante 1:1; estos complejos tienen menor reactividad fosfoesterolítica. El orden de la reacción respecto al metal es diferente dependiendo de la relación La(III): BDM. En exceso de BDM, (Fig. 9.9a) a pH 8.5 y 9.0, se observa una dependencia cuadrática a concentraciones bajas de metal y una dependencia lineal a concentraciones altas, en cambio, si la relación metal: ligante es 1:1, la dependencia es lineal en todo el intervalo (Fig. 9.9b).

A pH 9.0, de acuerdo al modelo del *Esquema 9.4* (Fig.9.7b), la forma predominante del La(III) es el complejo dimérico $\text{La}_2(\text{BDM})_2(\text{OH})_4$; de la pendiente de la línea recta en la Fig.9.9b es posible estimar la constante de segundo orden de la ruptura de BNPP para este complejo en $1.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Vale la pena mencionar que se forma un complejo similar entre La(III) y BTP ($\text{La}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}$ (Capítulo 13.1) para el cual la constante del segundo orden a la misma temperatura es solamente $0.195 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El orden de reacción dos respecto al metal, observado en exceso de BDM, es difícil de interpretar sin la especiación a estas condiciones. Es posible que la fracción del complejo reactivo dimérico sea proporcional al cuadrado de la concentración total del metal; también, como se muestra en el Capítulo 11, es posible que este segundo orden en la ruptura de BNPP se deba a hidroxocomplejos metálicos. Para otros metales, como Gd(III) y Nd(III), las k_{obs} en presencia de un exceso de BDM, muestran una dependencia cuadrática respecto a la concentración total del metal en todo el intervalo a pH 8.5 (Fig. 9.9).

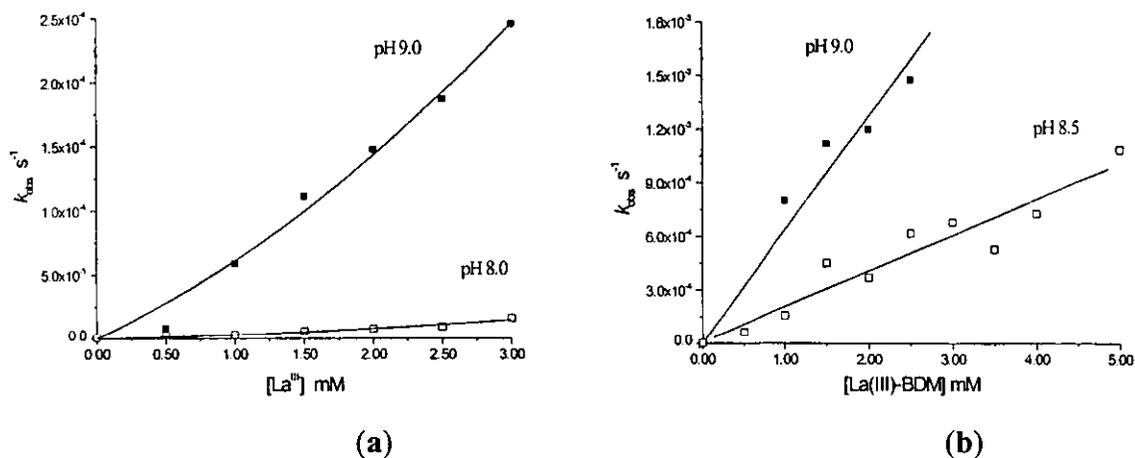


Fig.9.9. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de BNPP a 25°C. (a) En función de la concentración de La(III) en presencia de BDM 20 mM, cuadros rellenos pH 8.5 y cuadros abiertos pH 8.0. La línea muestra el ajuste a la ecuación. $k_{obs} = k_2 [La(III)]_T + k_3 [La(III)]_T^2$. (b) En función de la concentración de La(III) y BDM en relación 1:1. Cuadros rellenos pH 9.0, cuadros vacíos pH 8.5. La línea muestra el ajuste a una recta, $k_{obs} = k_2 [La(III)-BDM]_T$.

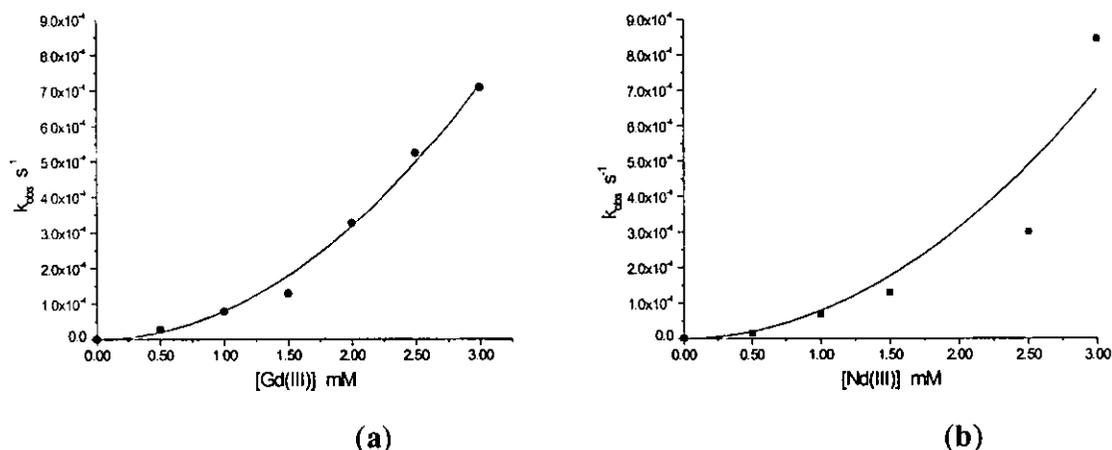


Fig.9.10. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de BNPP en función de la concentración de Ln(III) en presencia de BDM 20 mM a pH 8.5 y 25°C. (a) Gd(III), (b) Nd(III). La línea es la curva de ajuste a la ecuación: $k_{obs} = k_3 [Ln(III)]_T^2$.

La dependencia del pH para los lantánidos más ligeros tiene una forma sigmoideal incrementándose rápidamente entre pH 8 y 9 (el límite superior de estas dependencias está fijado por precipitación), mientras que para los más pesados, Nd(III), Eu(III), Gd(III) y Dy(III), en el intervalo estudiado, muestra la presencia de un máximo (Fig.9.11). La presencia de este máximo puede deberse a que al aumentar el pH se desprotona mayor proporción de las especies neutras de BDM presentes en disolución y se formen complejos superiores con menor reactividad, lo cual concuerda con que este máximo se observe para los cationes más ácidos cuyo efecto sobre la desprotonación del ligante ocurre a valores de pH menores.

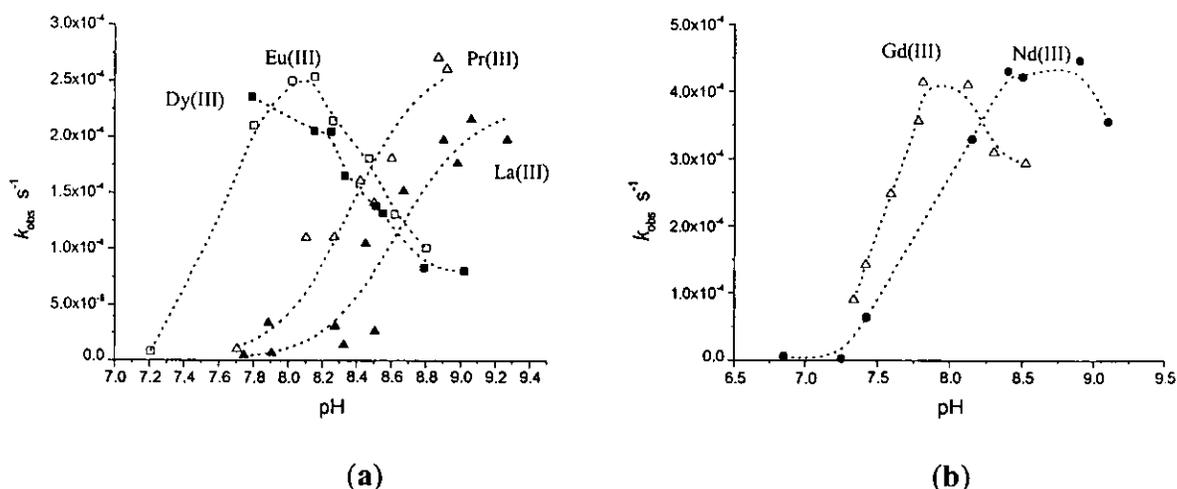


Fig.9.11. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de BNPP en función del pH en presencia de Ln(III) 2 mM y de BDM 20 mM a 25°C. (a) La(III), Pr(III), Eu(III) y Dy(III), (b) Gd(III), Nd(III). La línea muestra la tendencia de los datos experimentales.

Debido a que las condiciones empleadas al determinar las constantes de las especies en disolución del esquema 9.4 (relación metal:ligante 1:1) fueron diferentes a las empleadas para el estudio cinético (exceso de ligante), las conclusiones a las que puede llevar un análisis detallado de la dependencia de la constante de velocidad observada en función del pH, en términos de estas especies, pueden ser erróneas, y por tanto no se presenta este tipo de análisis.

9.5. BDM-M(III) en la ruptura de MNPP.

La ruptura de este sustrato fosfoéster en exceso de BDM respecto a los cationes metálicos transcurre más rápidamente que para BNPP, como cabría esperar de la diferencia en reactividad entre un fosfoéster y un fosfodiéster, pero la dependencia de la concentración del metal es muy diferente. Para MNPP se observa una cierta “saturación” en presencia de La(III), Pr(III) y Nd(III) (Fig.9.12a) y con los metales más pesados, Eu(III), Gd(III) y Dy(III) (Fig.9.12b), se observa un decremento en la constante de velocidad observada. Esto puede deberse a la contribución de dos efectos: una fuerte interacción entre el sustrato MNPP y la especie cinéticamente activa formando un complejo intermediario y a la formación de agregados superiores al incrementar la concentración del metal a este valor de pH. La diferencia con BNPP puede deberse a que el MNPP es un dianión con mayor capacidad de asociarse con complejos metálicos, mientras que el monoanión BNPP es un ligante muy pobre (ver Capítulo 14 para una discusión más detallada).

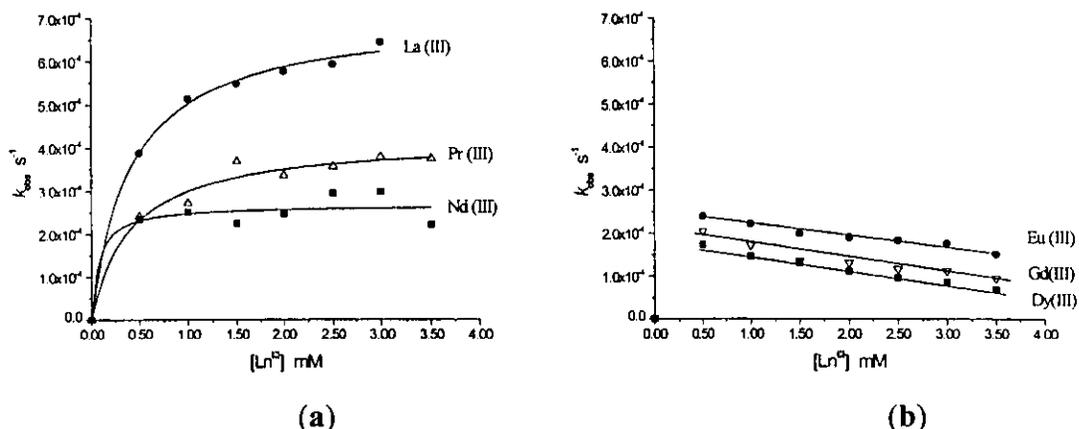


Fig.9.12. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de MNPP en función de la concentración de metal en presencia de BDM 20 mM a pH 8.5 y 25°C. (a) La(III), Pr(III), Nd(III) y (b) Eu(III), Gd(III) y Dy(III) (misma escala).

Por otro lado, la variación del pH a concentración fija del metal y en exceso de ligante, indica que a pH 8.5 para los metales estudiados, excepto La (III), la constante de velocidad ya no depende de este parámetro, y además, el valor límite depende de la acidez del catión: es menor mientras más ácido es el catión. El hecho de que la velocidad a estas condiciones no depende de la concentración del metal indica que se observa una transformación intramolecular del MNPP; el orden de la reactividad relativa de los lantánidos muestra que la activación electrofílica del sustrato complejoado por el ion metálico es de menor importancia que la basicidad del nucleófilo coordinado la cual disminuye para los cationes más ácidos. Como veremos más adelante, existe una tendencia similar para otros sistemas (Capítulo 15).

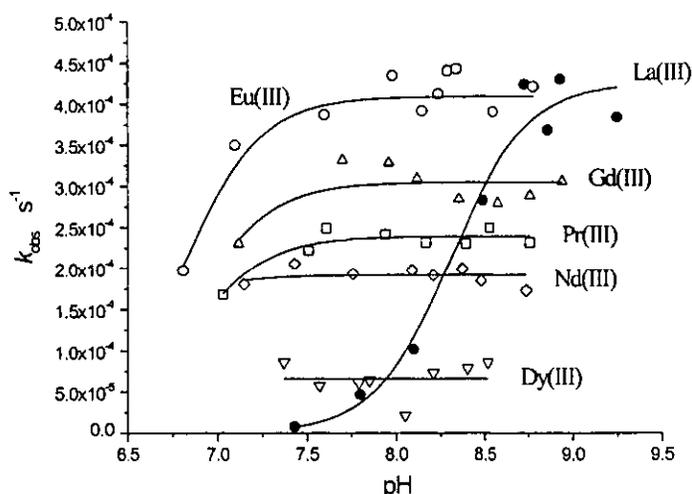


Fig.9.13. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de MNPP en función del pH en presencia de Ln(III) 2 mM y de BDM 20 mM a 25°C. (a) La(III), Pr(III), Eu(III) y Dy(III), (b) Gd(III), Nd(III). Las líneas muestran la tendencia de los datos experimentales.

9.6. BDM-M(III) en la ruptura de PNPA.

El PNPA es sustrato muy activado por lo que es necesario comprobar si, en nuestras condiciones de trabajo, las sustancias que se emplean como amortiguadores tienen alguna reactividad, y además evaluar la contribución de la oxima, BDM. De los valores de la tabla 9.4 puede verse que, la contribución de los amortiguadores probados pueden despreciarse, y las mayores contribuciones son por parte del oximato de BDM y de la hidrólisis alcalina.

Desafortunadamente, existen dificultades experimentales para evaluar la contribución del metal a la k_{obs} : a valores de pH cercanos a la neutralidad es del mismo orden que la suma de la hidrólisis alcalina y la oxima no complejada, (Tabla 9.4 renglones 1 y 2, Fig.9.14a), y al ir a pH más básico, la reacción transcurre tan rápidamente que en 100 segundos ya ha concluido. Sin embargo, hay una contribución del metal: a pH 8.0, las k_{obs} son $3.44 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ en presencia del metal y $2.45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ en ausencia de éste (Tabla 9.4, renglones 2 y 4, Fig.9.14a).

Tabla 9.4. Constante de velocidad observada de primer orden en presencia de diferentes amortiguadores 20 mM en presencia y ausencia de BDM 20 mM, 25°C.

	Amortiguador	pH	$k_{obs} \text{ s}^{-1}$ amortiguador	$k_{obs} \text{ s}^{-1}$ BDM y amortiguador
1	Tris	7.0	3.6×10^{-5}	3.50×10^{-3}
2		---	---	$3.50 \times 10^{-3}^a$
3		8.0	9.5×10^{-5}	2.45×10^{-2}
4		---	---	$3.44 \times 10^{-2}^a$
5		Hepes	7.0	1.2×10^{-5}
6	Heppso	8.0	2.2×10^{-5}	2.40×10^{-2}
7		7.0	7.5×10^{-6}	7.20×10^{-3}
8	Mops	8.0	2.5×10^{-5}	2.93×10^{-2}
9		7.0	2.2×10^{-6}	3.49×10^{-3}

^a en presencia de La(III).

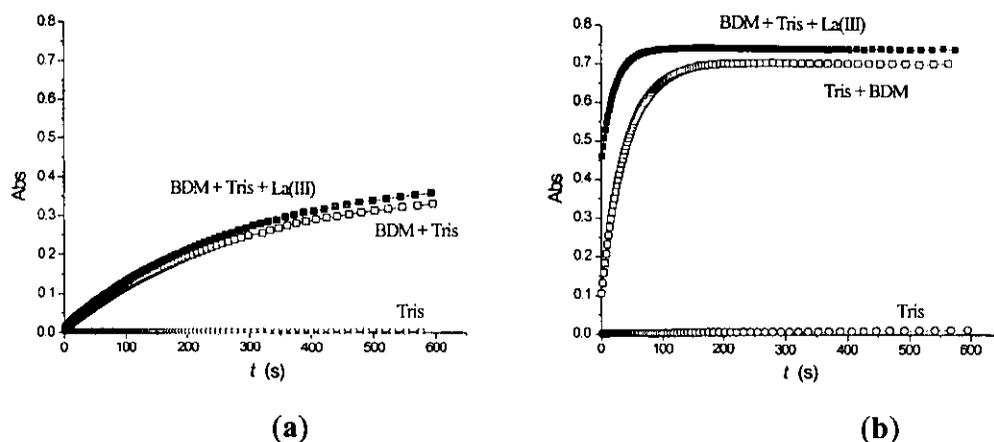


Fig.9.14. Curvas cinéticas comparativas de la ruptura de PNPA en presencia de Tris, Tris-BDM y Tris-BDM-La(III) a 25°C Tris 20 mM, BDM 20 mM y La(III) 2 mM. (a) pH 7.3, (b) pH 8.0 y en presencia de La(III) pH = 8.15. Estas curvas se ajustaron al modelo de una cinética de primer orden.

En resumen:

La reactividad encontrada para BDM es, como se esperaba, diferente para los tres tipos de sustratos probados: éster PNPA, fosfoéster MNPP y diéster BNPP, y las reacciones transcurren en este orden de mayor a menor rapidez si se comparan a las mismas condiciones.

Las constantes de velocidad observadas logradas en presencia de la oxima BDM y La(III) en la ruptura de BNPP son del orden de 10^{-3} s^{-1} , lo cual da un efecto de aceleración de 10^8 veces respecto a la hidrólisis espontánea comparable con los mejores sistemas reportados (ver Antecedentes). Tentativamente en el caso de lantano la especie reactiva es $\text{La}_2\text{BDM}_2(\text{OH})_4$.

El efecto sobre MNPP es menos dramático que para BNPP pero las constantes de velocidad observadas, del orden de 10^{-4} s^{-1} , dan un efecto muy importante de aceleración de 10^5 veces respecto a la hidrólisis espontánea para este sustrato. Además, vale la pena optimizar este sistema respecto a la concentración de BDM, ya que se trabajó en presencia de un gran exceso de oxima respecto al metal (10:1), condiciones a las que se forman especies no reactivas.

Los resultados encontrados con este sistema son muy prometedores, sin embargo se requiere realizar un estudio más detallado, lo cual está más allá del alcance de esta tesis. Debido a que aún no es claro cuáles son las especies nucleofílicas, hidroxio aniones o el mismo oximato, se requiere profundizar en el estudio e identificación de las especies presentes en disolución acuosa a diferentes concentraciones de los componentes; también se requiere probar este sistema frente a sustratos menos activados, incluso con ADN.

10. Sistemas BTP-Y(III) y Tris-Y(III)

Después de revisar la literatura donde se reportan sistemas esterolíticos y fosfoesterolíticos con iones trivalentes, particularmente de lantánidos, fue sorprendente que la actividad catalítica de Y(III) prácticamente no había sido estudiada. Hay buenas razones para pensar en sistemas similares con base en Y^{3+} ya que por sus características es muy parecido a los lantánidos: su tamaño ($r_i=104$ pm, No.Coordinación 6) es muy parecido al de Ho^{3+} ($r_i=104.1$ pm, No.Coordinación 6), y su acidez ($pK_a= 8.61$ a fuerza iónica $I=0.3$ M)⁵⁴ es similar a la de Gd^{3+} ($pK_a= 8.62$ a $I=0.3$ M),⁵⁴ además tiene la ventaja de que es menos susceptible a la precipitación en disoluciones básicas porque el producto de solubilidad para $Y(OH)_3$ ($6.3 \times 10^{-24} M^4$)⁵⁴ es ~600 veces mayor que para estos lantánidos (ca. $1.5 \times 10^{-26} M^4$),⁵⁴ y en contraste con los lantánidos, sus disoluciones no experimentan “añejamiento”.

Se encontró en la literatura que es posible estabilizar complejos hidroxopoliméricos de Y(III) con fórmulas generales $Y[Y(OH)_2]_n^{(3+n)+}$ o $[Y(OH)_2]_n^{n+}$ en presencia de 1.25 equivalentes de ácido antranílico, y que estos complejos catalizan la hidrólisis de 4-nitrofenil metilfosfonato.¹⁸³ Por otro lado, se encontró en la literatura que los aminoalcoholes Tris y BisTris tienen posibilidades de coordinarse con cationes metálicos formando complejos que muestran reactividad fosfoesterolítica.^{66,135} Estas moléculas son interesantes ya que además son amortiguadores de pH (“buffers biológicos”) lo que evita la necesidad de añadir otra sustancia para controlar el pH del sistema.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

10.1. Equilibrios en disolución acuosa BTP-Y(III)

Se probó la capacidad de algunos ligantes sencillos para prevenir la precipitación de Y(III) en disolución acuosa en el intervalo de concentraciones 1-10 mM y en el intervalo de pH 7-9. Los ligantes probados incluyeron algunas aminas y poliaminas como etilendiamina, 1,3-diaminopropano, etc. con las que no hubo resultados positivos, y aminoalcoholes, obteniéndose resultados positivos con Tris y BisTris. Se encontró que 10 mM es la concentración mínima de BTP que debe emplearse para prevenir la precipitación de Y(III) en el intervalo antes mencionado.

Las constantes de disociación ácida de BTP en las condiciones de trabajo se determinaron mediante titulaciones potenciométricas. El ajuste de la curva de titulación para BTP (Fig.10.1) da los valores de $pK_{a1}= 6.83 \pm 0.02$ para $BTPH_2^{2+}$ y $pK_{a2}=9.06 \pm 0.02$ para $BTPH^+$ que concuerdan

con los valores publicados ($pK_{a1}=6.75$ y $pK_{a2}=9.10$).¹⁸⁴ Posteriormente se buscó determinar por potenciometría la formación de complejos entre las especies de BTP e itrio. Para ello se realizaron titulaciones de mezclas de BTP e Y(III) a varias relaciones metal:ligante empleando concentraciones entre 2-20 mM. En todas las titulaciones se añadieron dos equivalentes de $HClO_4$ por equivalente de ligante. La curva de titulación de la mezcla BTP 10 mM en presencia de 1 equivalente de sal de metal (Fig.10.1) se desvía claramente de la titulación con BTP a la misma concentración y muestra el consumo de alrededor de 3.0 equivalentes de NaOH por 1 equivalente del metal. El límite en el intervalo de la titulación lo impuso la precipitación de hidróxido del metal a pH mayor que 10.

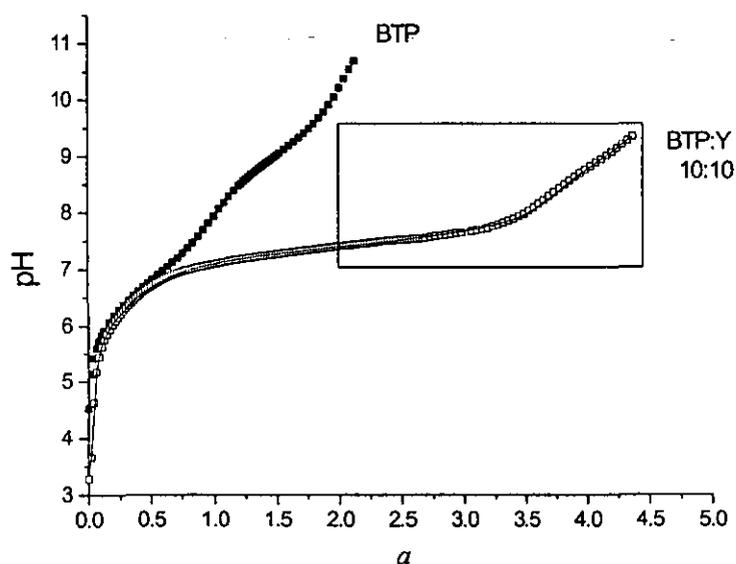
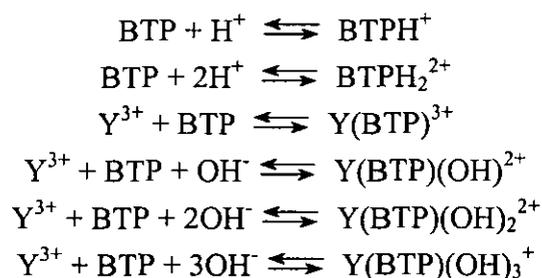


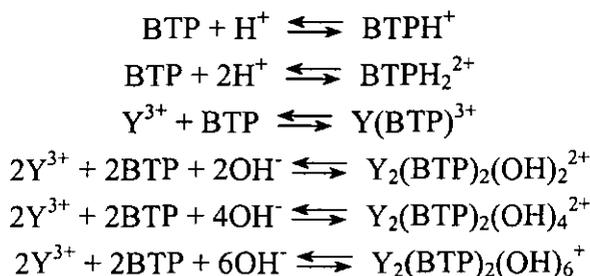
Fig.10.1. Curvas de titulación potenciométricas para BTP 10 mM y para una mezcla 1:1 BTP a Y(III) 10 mM en medio de percloratos en presencia de 2 equivalentes de $HClO_4$. a es el número de equivalentes de NaOH.

El esquema de reacción más simple que podría plantearse a partir de los resultados de estas titulaciones potenciométricas, y que debe satisfacer las observaciones del número de equivalentes de NaOH consumidos, es la formación de series de complejos mononucleares mixtos de composición general $Y(BTP)(OH)_n^{3-n}$, con n en el intervalo 1-3, además de complejos hidróxidos binarios de Y(III): $Y(OH)^{2+}$, $Y_2(OH)_2^{4+}$ e $Y_3(OH)_3^{4+}$. Para el ajuste de estos datos se consideraron las constantes de estabilidad de estos hidróxidos binarios reportadas en la literatura⁵⁴ y se usaron como parámetros fijos en todos los procesos de ajuste.

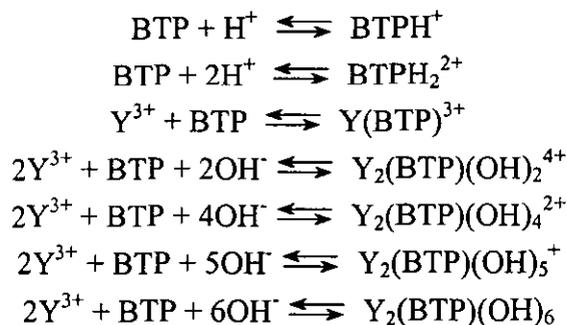
Sin embargo, al comparar nuestros resultados experimentales contra este esquema, 10.1, el ajuste es pobre (Fig.10.2) y fue necesario probar otros modelos. Resulta lógico incluir en el modelo la formación de dímeros dadas la semejanza de Y(III) con los lantánidos y la conocida tendencia de los hidroxocomplejos de estos cationes a polimerizarse. Se probó el esquema 10.2 que involucra dos moléculas de ligante en los complejos diméricos de composición $Y_2(BTP)_2(OH)_n^{6-n}$, pero tampoco fue del todo satisfactorio (Fig.10.2). Para lograr mejores ajustes fue necesario plantear un esquema que involucra la formación de hidroxocomplejos dinucleares de composición $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$ (*vide infra*) cuyo ajuste a los datos experimentales se ilustra comparativamente en la Fig.10.2.



Esquema 10.1



Esquema 10.2



Esquema 10.3

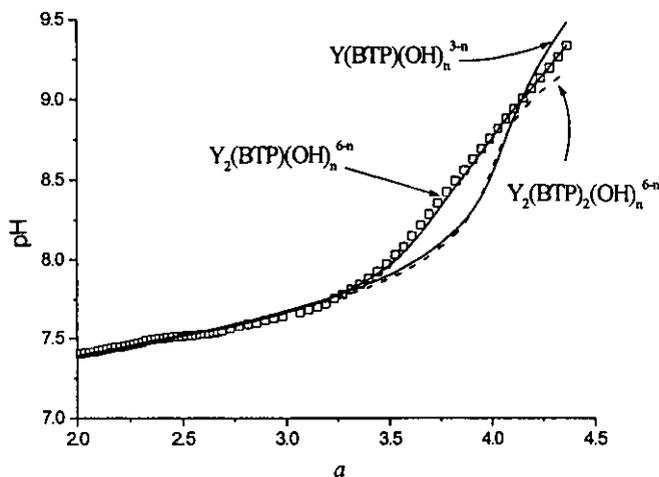


Fig.10.2. Ampliación del recuadro de la figura 10.1. Comparación entre los modelos de ajuste de los esquemas 10.1, 10.2 y 10.3 que corresponden a las composiciones $Y(BTP)(OH)_n^{3-n}$, $Y_2(BTP)_2(OH)_n^{6-n}$ y $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$ respectivamente.

Para corroborar la validez del modelo $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$ se hicieron titulaciones de disoluciones con diferentes cantidades totales de metal y ligante (Fig.10.3). Se encontró que los ajustes para el modelo del esquema 10.3 son más consistentes a todas las concentraciones estudiadas: las diferencias entre los valores pueden atribuirse a la dispersión de los datos. En contraste, para las constantes de formación calculadas para complejos monoméricos o diméricos hay cierta tendencia a ir aumentando conforme se incrementa la concentración total de BTP (Tabla 10.1).

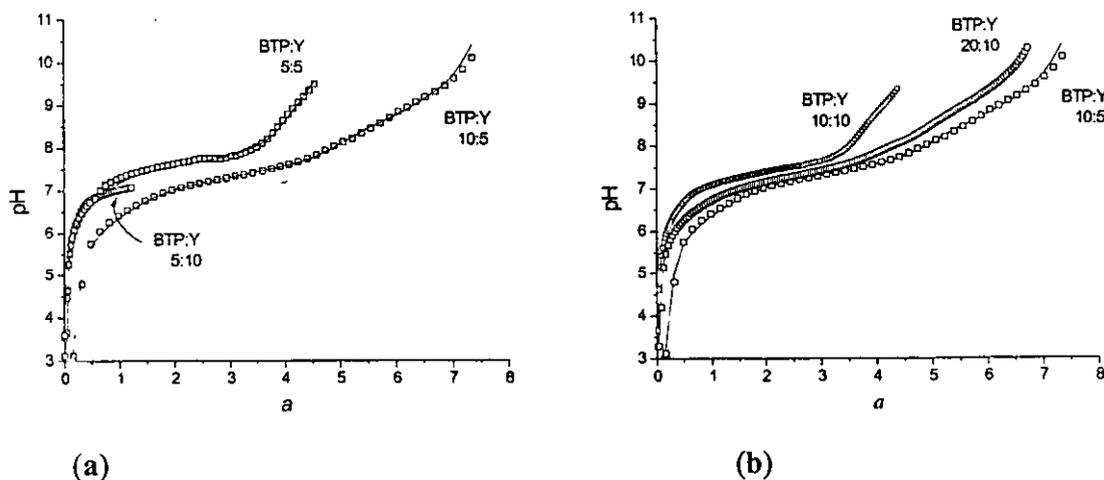


Fig.10.3. Ajustes para curvas potenciométricas de titulación para mezclas BTP e Y(III) en medio de percloratos en presencia de 2 equivalentes a BTP de $HClO_4$ variando la concentración total de metal y ligante en entre 5 – 20 mM al modelo $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$.

Tabla 10.1. Logaritmos de las constantes de estabilidad acumulativas ($\log \beta$)^a determinadas por ajuste de las curvas de titulación potenciométrica a diferentes concentraciones totales (mM) de metal y ligante a los modelos de los esquemas 10.1, 10.2 y 10.3. La composición de los complejos está escrita como $Y_nBTP_pH_q$.

Modelo	Especies n p q	BTP:Y 5:10	BTP:Y 5:5	BTP:Y 10:5	BTP:Y 10:10	BTP:Y 20:10
10.3	1 1 0	3.98	3.70	--- ^b	2.98	--- ^b
	2 1 -2	--- ^b	--- ^b	-8.56	-9.39	-8.82
	2 1 -4	-22.00	-24.00	-23.35	-23.64	-24.18
	2 1 -5	--- ^b	-32.27	-32.08	-32.30	-33.06
	2 1 -6	--- ^b	-42.22	-40.34	-42.38	-43.15
	χ^2	---	---	7.25	15.53	6.00
10.2	1 1 0	4.00	3.75	---	3.01	---
	2 2 -2	---	---	-4.42	-5.11	-5.14
	2 2 -4	-17.19	-20.13	-20.10	-19.71	-21.61
	2 2 -5	---	-28.80	-29.64	---	-31.21
	2 2 -6	---	---	-38.01	-38.33	-41.09
	χ^2	---	24.52	---	70.60	18.00
10.1	1 1 0	---	---	---	---	---
	1 1 -1	---	---	-3.60	-4.63	-3.80
	1 1 -2	---	-11.36	-11.41	-11.00	-11.96
	1 1 -3	---	-21.12	-20.25	-20.78	-21.60
	χ^2	---	26.96	---	100.19	23.50

^a $[ML(OH)]_1 = [MLH_1] = \beta[M][L][OH]/K_w$, en donde H_1 es un protón que puede perderse de una molécula de agua o del ligante.

^b El refinamiento con *Hyperquad* dio una constante negativa, la cual fue excluida de la curva de ajuste.

En la tabla 10.2 se resumen los logaritmos de las constantes de equilibrio para cada etapa. Estos valores son los promedios de las constantes obtenidas por titulaciones de mezclas de BTP-Y(III) a diferentes concentraciones totales y concuerdan, dentro de los límites del error, para todas las concentraciones probadas.

Tabla 10.2. Constantes de estabilidad para la formación de complejos Y(III) con BTP y para la protonación del ligante (25°C, 0.1 M NaClO₄).

Equilibrio	log K ^a
[BTP-H]/[BTP][H]	9.06±0.02 ^b
[BTP-2H]/[BTP][H] ²	15.87±0.02 ^b
[BTP-Y]/[BTP][Y]	3.29±0.34
[BTP-2Y-2OH]/[BTP][Y] ² [OH] ²	18.66±0.24
[BTP-2Y-4OH]/[BTP][Y] ² [OH] ⁴	31.87±0.46
[BTP-2Y-5OH]/[BTP][Y] ² [OH] ⁵	36.55±0.22
[BTP-2Y-6OH]/[BTP][Y] ² [OH] ⁶	40.66±0.61

^a Los errores en las constantes están dados como las desviaciones estándar del promedio de los valores de las constantes de equilibrio calculados con resultados de 5 titulaciones de mezclas Y(III)-BTP variando la concentración total de metal y ligante en entre 5 – 20 mM cada uno.

^b constantes de protonación BTP determinadas en este trabajo.

Estos resultados indican la formación de hidroxocomplejos metálicos o la desprotonación de grupos hidroximetilo del BTP dando lugar a los respectivos alcoxo compuestos, ya que el protón que se pierde puede pertenecer al ligante o a una molécula de agua coordinada al ion metálico. Esta ambigüedad es común para titulaciones de complejos metálicos cuyos ligantes contienen grupos alcohol.^{69,104,105,127,185} Este problema no ha sido resuelto para complejos aminoalcohol con lantánidos,¹²⁷ pero para algunos complejos macrocíclicos que poseen un grupo alcohol que pende del macrociclo, se comprobó la formación de alcoxo complejos mediante las estructuras cristalinas de los complejos aislados.^{104,185} En nuestro caso, los intentos por aislar los complejos desprotonados de Y(III)-BTP fueron infructuosos.

Buscando una posibilidad para discriminar los complejos hidroxocomplejos y alcoxo como especies nucleofílicas en disolución los esfuerzos realizados se enfocaron hacia resonancia magnética. Se ha observado que la desprotonación de un grupo alcohol unido a Zn(II) induce un desplazamiento considerable hacia campo alto (*ca.* 0.3 ppm) de las señales de los grupos metileno en el grupo -CH₂OH.¹⁸⁵ Por lo tanto, cabe esperar que exista un efecto similar, en términos cualitativos, si el Y(III) está unido a los grupos alcohol de BTP.

Se realizaron titulaciones potenciométricas en D₂O registrando para cada valor el espectro de ¹H RMN de BTP en presencia de Y(III). El espectro de ¹H RMN para BTP es muy sencillo: un singlete para los protones metilénicos adyacentes a los grupos alcohol, un triplete para los protones metilénicos de la cadena propilénica α a N y una señal quintuple para los protones metilénicos de la cadena propilénica en posición β a N (Fig.10.3a). Las curvas de titulación obtenidas en ausencia de Y(III) fueron ajustadas a la ecuación 10.1.

$$\delta_{\text{obs}} = (\delta_{\text{BTP}} + \delta_{\text{BTPH}}[\text{D}^+]/K_{a2} + \delta_{\text{BTPH}_2}[\text{D}^+]^2/K_{a1}K_{a2}) / (1 + [\text{D}^+]/K_{a2} + [\text{D}^+]^2/K_{a1}K_{a2}) \quad (10.1)$$

en donde δ_{BTP} , δ_{BTPH} y δ_{BTPH_2} son los desplazamientos químicos para un protón dado en BTP neutro, mono BTPD⁺ y diprotonado BTPD₂²⁺ respectivamente y K_{a1} , K_{a2} son la primera y segunda constante de disociación ácida de las formas protonadas de BTP. El ajuste de los datos experimentales para los desplazamientos químicos de los diferentes tipos de protones de BTP (líneas continuas en Fig.10.3b a d) da valores de constantes de disociación que coinciden entre sí. El promedio de estos valores son $\text{p}K_{a1}=7.55\pm 0.03$ para BTPD₂²⁺ y $\text{p}K_{a2}=9.81\pm 0.03$ para BTPD⁺. Los valores de $\text{p}K_a$ mayores en D₂O como disolvente comparados con los obtenidos en H₂O concuerdan con el conocido efecto isotópico de H/D en las constantes de disociación ácida.¹⁸⁶

Los puntos correspondientes a las disoluciones que contienen Y(III) se desvían de las curvas de titulación del ligante libre en el mismo intervalo de pH donde se observa esta desviación en las curvas potenciométricas (*vide supra*). No se hicieron intentos para ajustar estas curvas de titulación en presencia de Y(III) porque se requeriría el ajuste simultáneo de demasiados parámetros, sin embargo, el análisis cualitativo de estos resultados proporcionan información importante del sistema.

Los desplazamientos químicos de los protones metilénicos de la cadena propilénica en posiciones α- y β- al átomo de nitrógeno de BTP muestran perfiles similares para el ligante libre y experimentan cambios muy pequeños en su desplazamiento en presencia del metal, Fig.10.3 c y d. Por el contrario hay un desplazamiento considerable de las señales de los protones metilénicos en posición α al grupo OH, (CH₂OH, Fig.10.3 b) hacia campo bajo.

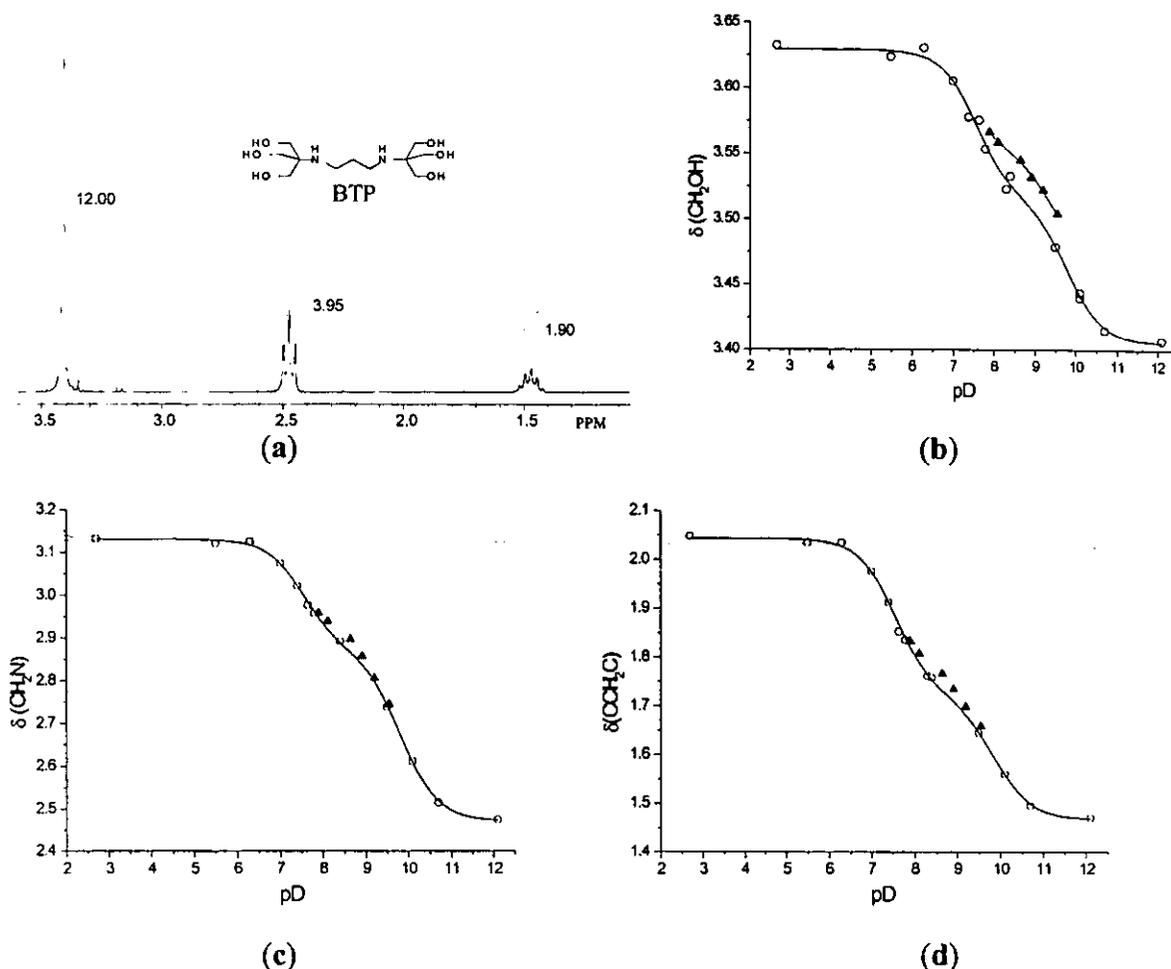


Fig.10.3. (a) Espectro de ^1H RMN para BTP 20 mM. (b) a (d) Desplazamientos químicos contra los perfiles de pD en D_2O en ausencia (círculos vacíos) y presencia (triángulos rellenos) de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ 10 mM correspondientes a: (b) singlete de los protones metilénicos en la posición α con respecto al grupo OH, (c) señal central del triplete de los protones metilénicos en la posición α con respecto al nitrógeno y (d) señal central del quintuplete de los protones metilénicos en posición β al átomo de nitrógeno. Las líneas continuas muestran el ajuste a la ecuación (10.1) de los puntos en ausencia de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$.

Este desplazamiento ocurre en sentido contrario, hacia campo bajo en lugar de ir hacia campo alto, que el reportado con macrociclos de $\text{Zn}(\text{II})$, lo que concuerda con una estructura del complejo en la que no ocurre la desprotonación de los grupos alcohol del BTP. Además el cambio en los desplazamientos de las señales de los protones metilénicos de la cadena propilénica, como CCH_2C , comparados con las señales de los grupos CH_2OH en presencia de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ es mucho menor, es decir, se ven poco afectados por la presencia del metal y por tanto es posible decir que la interacción predominante es entre los grupos alcohol de BTP y el metal sin que estos lleguen a desprotonarse.

Vale la pena resaltar que Y(III), al igual que los lantánidos (III), es un catión cinéticamente lábil, es decir, las constantes de velocidad de intercambio de agua y ligantes unidos débilmente son del orden de 10^6 - 10^7 s⁻¹.^{117b} Congruentemente con esto, la adición de Y(III) a la dicoloración de BTP no produce ninguna nueva señal para el ligante complejado y tampoco causa un ensanchamiento de las señales de BTP. Cuando el intercambio es rápido en la escala de RMN, se observa una sola señal para cada tipo de protones del ligante en una posición que es el promedio ponderado de los desplazamientos químicos para el ligante libre y complejado.

10.2. Equilibrios en disolución Tris-Y(III)

Debido a la similitud entre los compuestos Tris y BTP (BTP consta de dos unidades de Tris conectadas entre sí por una cadena propileno) y a que la interacción observada con BTP puede involucrar a los grupos alcohol presentes en ambos ligantes, cabría esperar un comportamiento similar de Tris como ligante. En general, las titulaciones de mezclas Tris-Y(III) indican una estabilidad mucho menor que con BTP ya que siempre se produce la precipitación del hidróxido metálico por encima de pH 8.0. No obstante fue posible hacer titulaciones de mezclas de Tris-Y(III) en presencia de un exceso de ligante sobre el metal. La figura 10.4 muestra las curvas de titulación para Tris libre y para su mezcla en relación 2:1 con el metal.

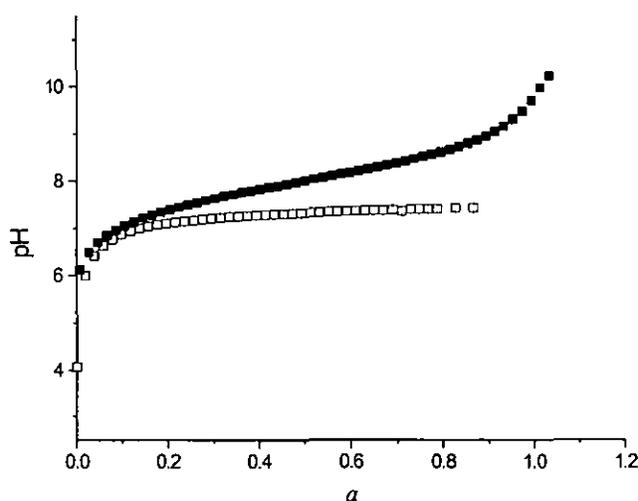
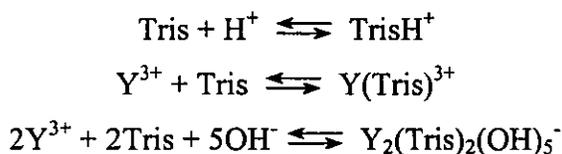


Fig.10.4. Curvas de titulación de Tris 10 mM (cuadrados rellenos) y Tris 10 mM en presencia de perclorato de itrio 5 mM (cuadrados vacíos) en NaClO₄ 0.1 M. Se adicionó un equivalente de HClO₄ por equivalente de Tris al inicio de cada titulación. *a* es el número de equivalentes de NaOH añadidos por equivalente de ligante.

El ajuste de la curva de titulación para Tris da un valor de $pK_a=8.01\pm 0.02$ para TrisH^+ concordando con el valor publicado ($pK_a=8.09$).⁵⁴ La titulación de Tris 10 mM en presencia de Y(III) 5 mM, determinada hasta pH 8.0 por los límites del experimento, muestra claramente la complejación de Tris con Y(III) incluso a valores de pH por debajo del pK_a del ligante.

Los datos para el sistema Tris-Y(III) fueron analizados con los mismos modelos probados anteriormente con BTP; para los ajustes de las titulaciones de las mezclas Tris-Y(III) también fueron consideradas las constantes de estabilidad reportadas de los complejos hidróxidos binarios de Y(III): Y(OH)^{2+} , $\text{Y}_2(\text{OH})_2^{4+}$ e $\text{Y}_3(\text{OH})_5^{4+}$. El mejor ajuste se obtuvo para un modelo que involucra solamente la formación de dos especies metal-ligante: un complejo mononuclear, Y(Tris)^{3+} y un único complejo dimérico, $\text{Y}_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^-$, que incluye dos moléculas de ligante (Esquema 10.4).



Esquema 10.4

Aunque no es posible realizar titulaciones sin exceso de ligante, el análisis de las curvas de titulación en relaciones 10:5, 20:5 y 46.6:5 mM ligante a metal apoya este modelo. Los logaritmos de las constantes de formación acumulativas (β) obtenidas con este modelo se resumen en la tabla 10.3. Sin embargo, debido a que las titulaciones fueron posibles solamente en un intervalo muy estrecho de pH es importante aclarar que este modelo es solamente tentativo aunque ajuste satisfactoriamente las titulaciones a diferentes concentraciones totales de sus componentes.

También es importante aclarar que para este sistema el ajuste de la curva de titulación con un gran exceso de Tris (46.6:5.0 mM ligante a metal) requiere incluir la formación del complejo $\text{Y}_2\text{H}_7\text{Tris}_2$, sin embargo, esta especie no fue considerada al realizar los diagramas de distribución de especies empleados para el posterior análisis de los datos cinéticos. Las razones para omitir este complejo son: primera, porque no se requiere incluir esta especie para hacer los ajustes de otras titulaciones con mayores relaciones metal:ligante aunque éstas han consumido más equivalentes de NaOH por equivalentes del metal, y segunda, porque al realizar esta titulación cerca del 90% del NaOH adicionado se consume en la titulación de Tris, así que resulta probable obtener en este caso un error mayor en la determinación de la estequiometría metal-hidróxido.

Tabla 10.3. Logaritmos de las constantes de estabilidad acumulativas ($\log \beta$)^a determinadas por ajuste de las curvas de titulación potenciométrica a diferentes concentraciones totales de metal y de ligante al modelo del esquema 10.4. La composición de los complejos está escrita como $Y_nH_pTris_q$.

Especies n p q	Tris:Y 10:5	Tris:Y 20:5	Tris:Y 46.6:5
1 0 1	2.06	2.09	2.54
2 -5 2	-29.45	-30.01	-28.73
2 -7 2	- ^b	- ^b	-44.45

^a $[ML(OH)] = [MLH_{.1}] = \beta[M][L][OH]/K_w$, en donde $H_{.1}$ es un protón que puede perderse de una molécula de agua o del ligante.

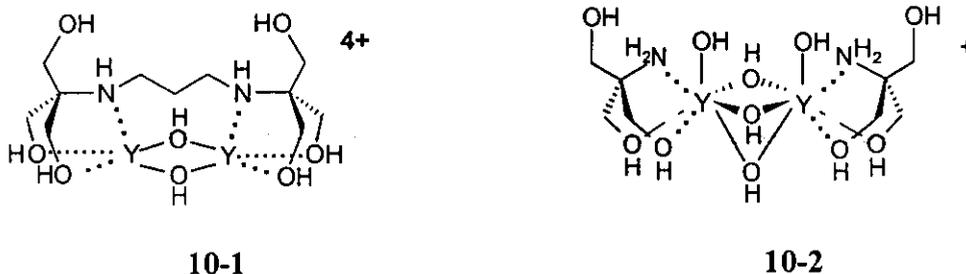
^b El refinamiento con *Hyperquad* dio una constante negativa la cual fue excluida de la curva de ajuste.

La constante de estabilidad para el complejo $Y(Tris)^{3+}$ (Tabla 10.3) es cercana a la reportada para el complejo $Eu(Tris)^{3+}$ ($\log K=2.44$),¹⁸⁷ pero el BTP forma complejos sustancialmente más estables con $Y(III)$ ($\log K=3.29$) indicando la posibilidad de que ambas mitades de su molécula, que son químicamente equivalentes a Tris, se coordinen. Para otro complejo similar, $La(Bis-Tris)^{3+}$, se reportó una constante de estabilidad más alta ($\log K=4.7$),¹³⁵ sin embargo es necesario considerar que este ligante provee dos grupos hidroxietilo adicionales que pueden contribuir significativamente a enlazar al metal.

Se sabe que $Y(III)$ tiene una fuerte tendencia a formar complejos hidroxio poliméricos en agua.⁵⁴ Se han reportado la formación de especies dihidroxio dinucleares $Y_2(OH)_2^{4+}$ y pentahidroxio trinucleares $Y_3(OH)_5^{4+}$ entre los productos de hidrólisis de $Y(III)$.⁵⁴ Estas especies también son típicas para los hidroxocomplejos de lantánidos que son químicamente similares. Así, la unidad $La_2(OH)_2^{4+}$ se forma en complejos macrocíclicos dinucleares⁶² y la titulación potenciométrica de $LaCl_3$ con $NaOH$ revela la formación de especies $La_2(OH)_5^+$ ¹²⁰ que es análoga a los complejos $Y_2(BTP)(OH)_5^+$ e $Y_2(Tris)_2(OH)_5^+$ mostrados en los esquemas 10.3 y 10.4. También se reportó que las especies formadas al realizar la titulación potenciométrica de $Y(III)$ en presencia de 1.25 equivalentes de ácido antranílico incluyen especies polinucleares, como $[Y(OH)_2]_n^{n+}$, que contienen dos equivalentes de OH^- por $Y(III)$.¹⁸³ Es posible decir,

entonces, que la formación de complejos con BTP estabiliza estas especies previniendo la formación de complejos superiores así como la precipitación de los complejos metalhidroxo.

Finalmente con base en la estructura reportada del complejo de La(III) con el ligante neutro BisTris¹³⁵ que tiene un fragmento estructural común a Tris y BTP, puede proponerse una estructura para los complejos $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_n^{6-n}$ ejemplificada por la estructura 10-1 para el complejo $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_2^{4+}$ con los dos aniones OH como puente y proponer especulativamente con la estructura 10-2 para el complejo $Y_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^-$.



11. Comportamiento cinético de los sistemas BTP-Y(III), Tris-Y(III)

Los sustratos que se estudiaron fueron BNPP, MNPP y PNPDP, que son sustratos típicamente usados para estudios de actividad de fosfoesterasas y permiten hacer comparaciones con otros sistemas relevantes.

11.1. Cinética de hidrólisis de BNPP

El orden de la reacción respecto al metal se estudió a pH 8.5 manteniendo al ligante en exceso (Fig.11.1a) y en relación 1:1 respecto a la concentración del metal (Fig.11.1b). En ambos casos las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) en la ruptura de BNPP muestran una dependencia cuadrática respecto a la concentración total del metal:

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Y(III)}]_{\text{T}}^2 \quad (11.1)$$

Se observa que las constantes obtenidas en presencia de exceso de ligante son ligeramente menores que cuando se mantiene una relación metal:ligante 1:1, esta disminución probablemente sea efecto de la diferencia en la fuerza iónica para ambas disoluciones. La dependencia cuadrática

puede deberse, en principio, a la participación de especies diméricas cuya fracción se aumenta conforme aumento en la concentración total de Y(III) o a la participación de 2 complejos diméricos.

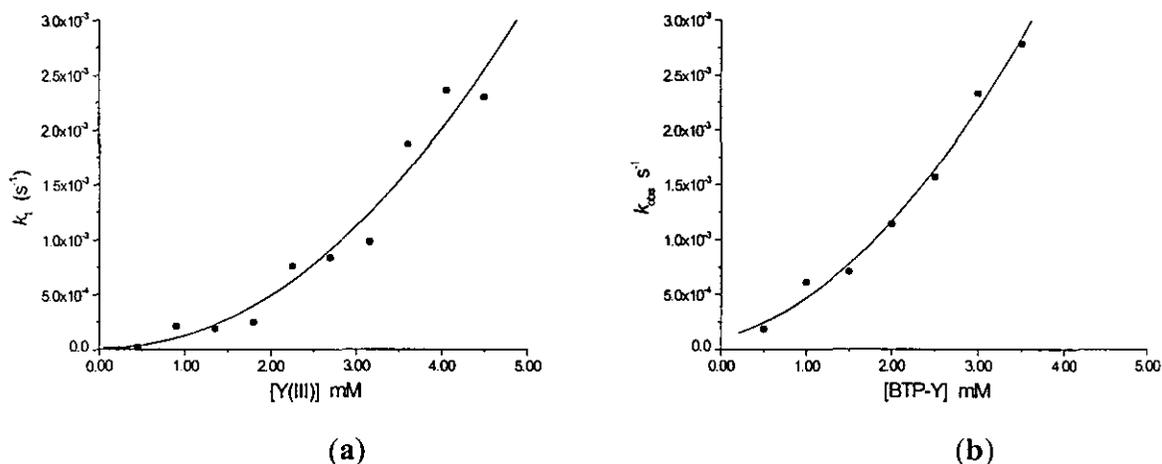


Fig. 11.1. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP en función de la concentración de Y(III) en presencia de (a) BTP 20 mM y (b) [BTP]=[Y(III)] 0-4 mM, ambas a pH 8.5 y 25°C. La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo a la ecuación 11.1: $k_{\text{obs}} = k_3[\text{Y(III)}]_T^2$

Por otra parte, se encontró que la velocidad de la reacción sigue una dependencia sigmoideal respecto al pH: crece rápidamente al incrementar el pH arriba de 7 y tiende a nivelarse por encima de pH 9, como se ilustra en la Fig.11.2. En principio, este tipo de dependencia sigmoideal suele asignarse a la desprotonación de la especie nucleofílica, que en este caso tendría un $\text{p}K_a \sim 8.3$. El ajuste formal de estos datos considerando sólo una especie desprotonada cinéticamente activa se muestra en la figura 11.2. Sin embargo para analizar en una forma correcta tanto la dependencia del pH como la dependencia de concentración del Y(III) de las constantes de velocidad observadas, fue necesario generar las curvas de distribución de especies a las condiciones bajo las que se trabajó en cinética con las constantes de estabilidad obtenidas del estudio de equilibrios en disolución (Fig.11.3) y el diagrama de distribución de especies BTP-Y(III) en el intervalo de concentraciones empleado para el metal.

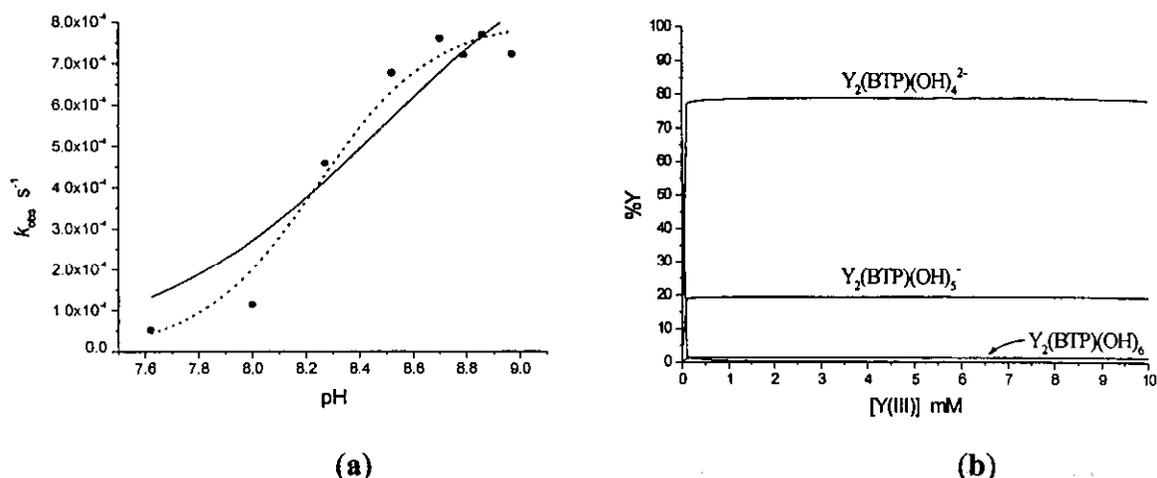


Fig.11.2. (a) Dependencia de la constante de velocidad observada para la hidrólisis de BNPP en función del pH. BTP 20 mM, Y(III) 2 mM, BNPP 0.04 mM, 25°C. Los círculos rellenos son los datos experimentales, la línea punteada indica la tendencia de los datos y la línea sólida es el ajuste considerando una especie monodesprotonada. (b) Diagrama de predominio de especies respecto a la concentración de Y(III) a pH 8.5 en presencia de BTP 20 mM.

El diagrama de predominio de especies (Fig.11.2b) calculado para las condiciones de la Fig.11.1 indica que las especies predominantes en todo el intervalo de concentración de Y(III) empleado son dos hidroxocomplejos: $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ y $Y_2(BTP)(OH)_5^+$, los cuales contribuyen respectivamente con cerca del 79% y 19% a la concentración total de Y(III) aun a la menor concentración de Y(III) empleada. Este hecho indica que la cinética de segundo orden en Y(III) total no puede ser relacionada a la dimerización de Y(III) a altas concentraciones, pero indica la participación de dos complejos diméricos en la reacción con un ion BNPP. Esto no resulta demasiado sorprendente ya que incluso ha sido reportado un tercer orden cinético respecto al metal para la reacción de BNPP con un complejo macrocíclico dimérico de lantano (III).⁶²

Debido a que la distribución de las especies permanece prácticamente inalterada al variar la concentración de Y(III) bajo las condiciones de la Fig.11.1, no es posible determinar directamente cuál par de especies está participando en la reacción con el sustrato: dos complejos $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ o dos $Y_2(BTP)(OH)_5^+$ o su combinación. Más información viene del estudio de la dependencia del pH de la velocidad de reacción la cual provee una amplia variación en las concentraciones de todos los hidroxocomplejos.

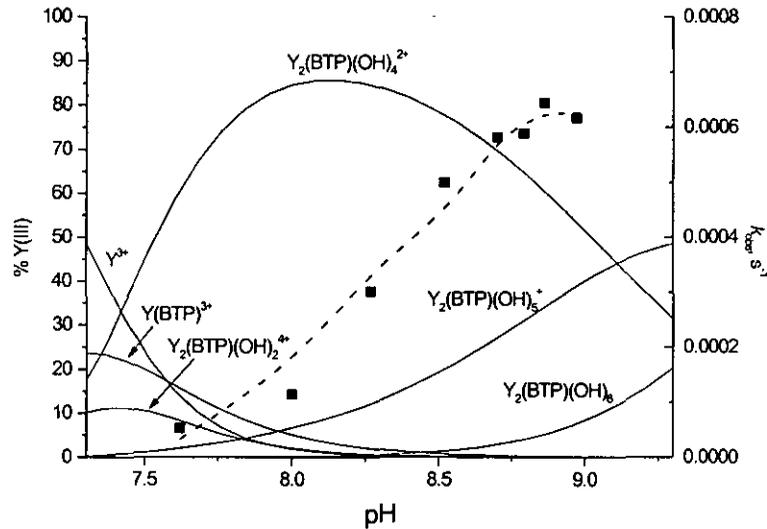


Fig.11.3. Constantes de velocidad de primer orden para la hidrólisis de BNPP 25°C (cuadrados sólidos) y diagramas de distribución de especies para hidroxocomplejos (*Esquema 10.3*) de Y(III) 1.8 mM y BTP 20 mM en función del pH. La línea punteada es el ajuste teórico del perfil de k_{obs} en función del pH calculado de acuerdo a la ecuación 11.2 (*vide infra*).

Tomando en cuenta el hecho de que la reacción es de segundo orden con respecto al metal, y conociendo las especies predominantes a las condiciones de reacción, los valores de k_{obs} obtenidos a diferentes pH fueron graficados contra los productos de las concentraciones de estas especies, es decir $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}]^2$, $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+]^2$ o bien $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}][Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+]$, Fig.11.4. Evidentemente, k_{obs} correlaciona solamente con la última de las funciones.

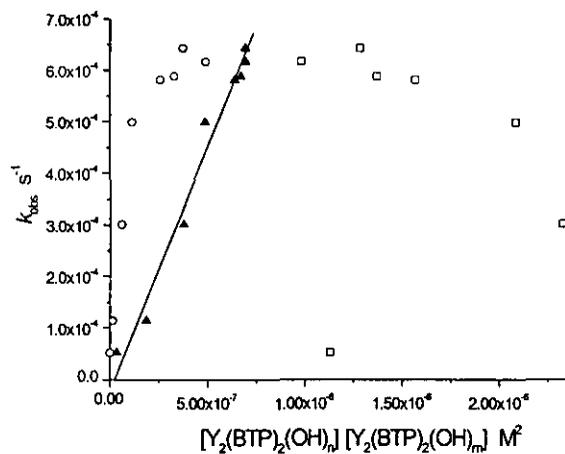


Fig.11.4. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP, (datos de la Fig.11.2a y Fig.11.3) contra $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}]^2$ (cuadrados vacíos), $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+]^2$ (círculos vacíos), y $[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}][Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+]$ (triángulos rellenos).

De esta correlación se puede proponer entonces que la ley de velocidad que sigue la ruptura de BNPP es:

$$k_{\text{obs}} = k_3[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}][Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+] \quad (11.2)$$

Esta constante, k_3 , puede calcularse a partir de la dependencia de k_{obs} respecto a la concentración del metal o de pH dado que las concentraciones de cada especie en cada punto se pueden obtener multiplicando la concentración total del metal por la fracción de cada especie a esa concentración del metal y pH (Fig.11.2b, 11.3) como se ilustra en Fig.11.5a,b.

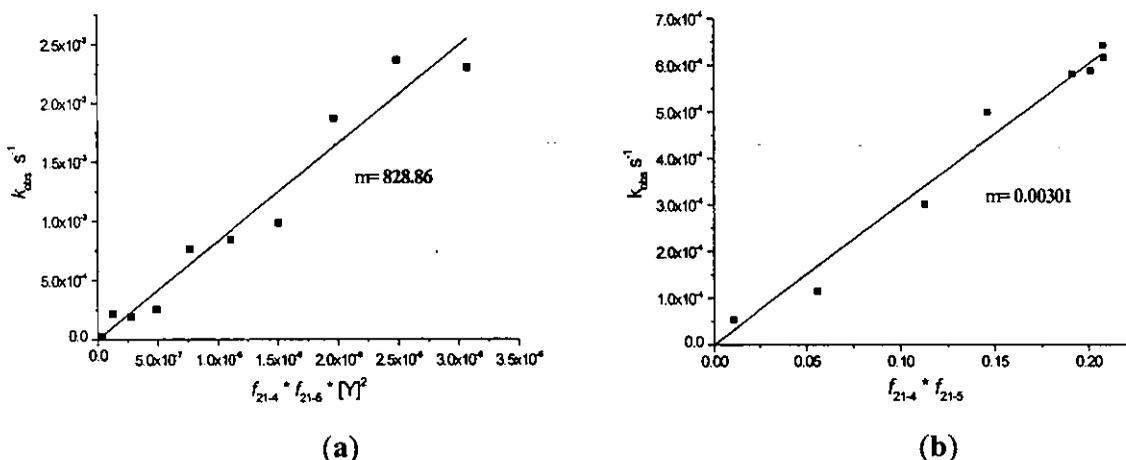


Fig.11.5. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP. (a) Obtenidas de la dependencia de la concentración del metal a pH 8.5 en función del producto de las fracciones de $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}$ (f_{21-4}) e $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+$ (f_{21-5}) y la $[Y(\text{III})]^2$. (b) Obtenidas de la dependencia del pH en función del producto de las fracciones de $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_4^{2+}$ (f_{21-4}) e $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+$ (f_{21-5}).

Los resultados de ambas dependencias, del pH a una concentración fija de Y(III) y la dependencia de la $[Y(\text{III})]$ a pH fijo se muestran graficados en las coordenadas de la ecuación 11.2 en una gráfica combinada (Fig.11.6). Como es claro de la ecuación 11.2, la pendiente de la recta obtenida en esta gráfica es el valor de k_3 , que es igual a $k_3 = 830 \pm 40 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$. Por lo tanto existe una buena concordancia entre ambas series de experimentos.

Esta constante de tercer orden, $830 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$, es muy alta, aun considerando que depende en M^{-2} de la concentración de los complejos ($k_{\text{OH}} 5.8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a las mismas condiciones), y por lo tanto es posible pensar en un efecto de activación adicional a la participación de estos dos complejos como especies nucleofílicas. En este sentido, probablemente el complejo tetrahidroxo que tiene mayor carga positiva provee una asistencia electrofílica al oxígeno fosforilo y uno de los aniones OH^- del complejo pentahidroxo, cuyos OH^- son más básicos, actúa como un nucleófilo contra el fósforo (V).

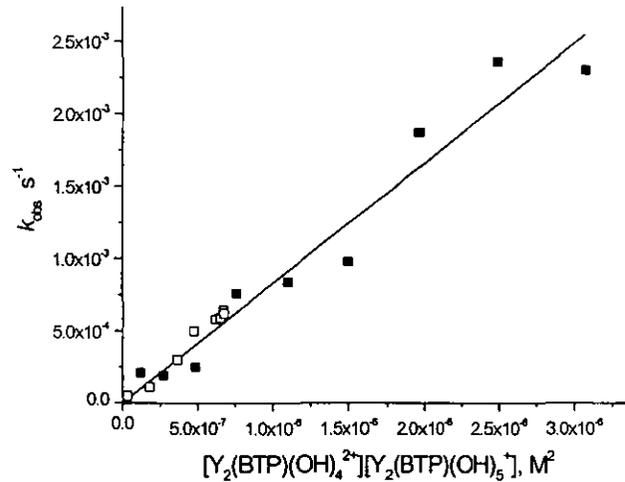


Fig. 11.6. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP. Datos de la Fig. 11.2a (cuadrados vacíos) y datos de la Fig. 11.1a (cuadrados rellenos) contra el producto de las concentraciones $[Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}][Y_2(BTP)(OH)_5^+]$.

En el sistema Y(III)/Tris la cinética de hidrólisis de BNPP también mostró un orden mayor que uno para la dependencia de la concentración de metal, Fig. 11.7 (cuadrados rellenos). Debido a que en este caso hay un único hidroxocomplejo, el ajuste de estos resultados se intentó primero con la función:

$$k_{\text{obs}} = k_3[Y_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^+]^2 \quad (11.3)$$

Sin embargo se obtuvo un mejor ajuste cuando se consideró una contribución adicional de una ruta de reacción de primer orden respecto al metal:

$$k_{\text{obs}} = k_2[Y_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^+] + k_3[Y_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^+]^2 \quad (11.4)$$

La aplicación de esta última ecuación 11.4 al perfil de k_{obs} vs $[Y(\text{III})]$ (Fig. 11.7) para BNPP da las constantes de velocidad $k_2 = 0.012 \pm 0.007 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_3 = 97 \pm 15 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El perfil de pH de las constantes de velocidad observado se muestra superpuesto al diagrama de distribución de especies en la Fig. 11.8 (cuadrados rellenos). Estos resultados concuerdan bien con los de la dependencia de la concentración: la línea punteada en la Fig. 11.8 muestra el ajuste a la ecuación 11.4 con valores de $k_2 = 0.125 \pm 0.05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_3 = 110 \pm 35 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los valores de k_3 concuerdan dentro de los límites del error experimental, pero los valores de k_2 son muy diferentes. Esto es debido, parcialmente, a la mucho menor precisión en k_2 respecto a k_3 , pero también refleja cierta incertidumbre en el diagrama de distribución de especies para los complejos de Tris.

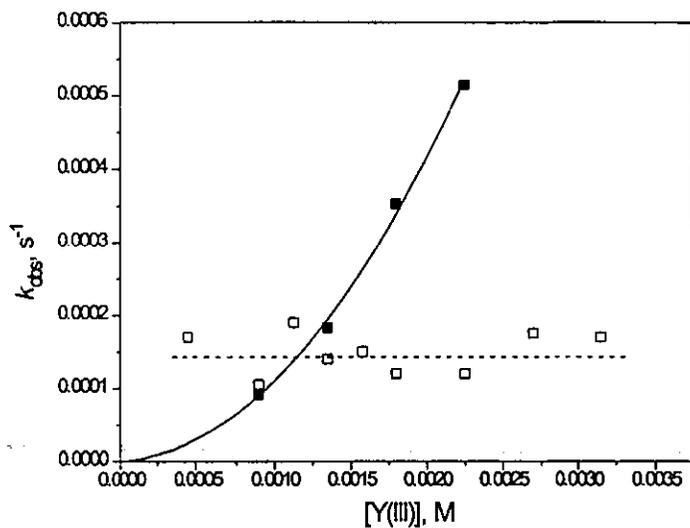


Fig.11.7. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la ruptura de BNPP (cuadrados rellenos) y MNPP (cuadrados vacíos) en función de la concentración de Y(III) en presencia de Tris 20 mM a pH 8.5 y 25°C. La línea sólida es la curva de ajuste de acuerdo a la ecuación (11.4)

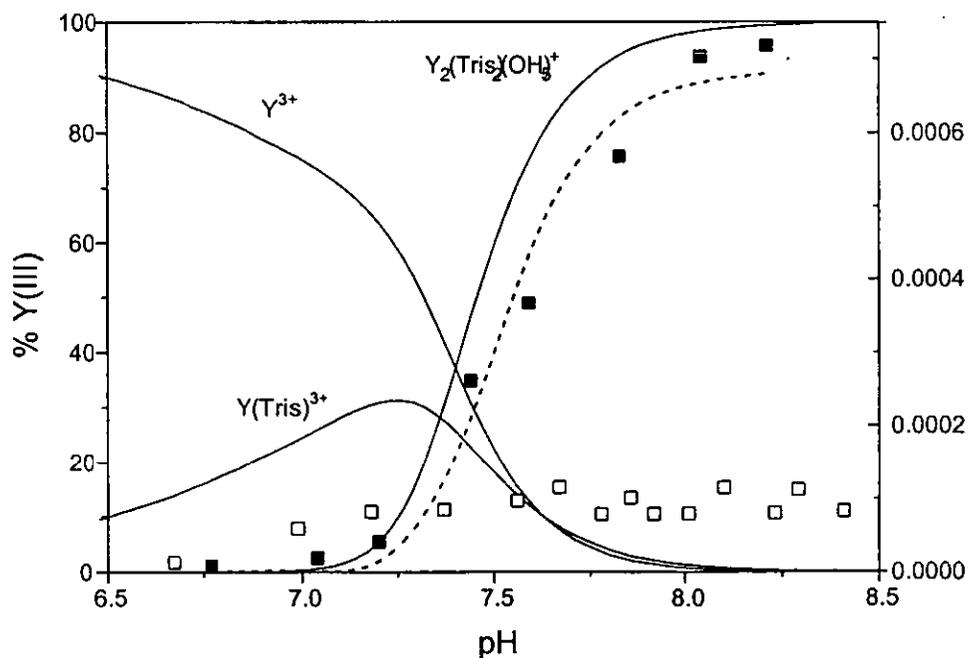


Fig.11.8. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP (cuadrados rellenos) y MNPP (cuadrados vacíos) a 25°C y diagrama de distribución de especies para los hidroxocomplejos en presencia de Tris 20 mM e Y(III) 2 mM. La línea punteada es el ajuste teórico del perfil de k_{obs} vs. pH calculado de acuerdo a la ecuación 11.4.

11.2. Cinética de hidrólisis de MNPP y PNPDP.

La hidrólisis del sustrato MNPP es de orden cero respecto a la concentración del ion metálico en ambos sistemas BTP-Y(III) (Fig.11.7, cuadrados vacíos) y Tris-Y(III) (Fig.11.9, cuadrados vacíos). Para este sustrato la hidrólisis procede más rápido que para BNPP a bajas concentraciones de Y(III) pero es más lenta a concentraciones más altas. Lo más probable es que el orden de reacción cero observado refleje una cinética de "saturación" tipo Michaelis-Menten con una constante de estabilidad mayor para el complejo intermediario MNPP-Y(III). El hecho de que para el fosfoéster MNPP se observe una cinética de saturación y para el fosfodiéster BNPP no, indica que la interacción entre el sustrato dianiónico MNPP y el complejo metálico cinéticamente activo es mayor. Esto concuerda con que el dianión MNPP tiene mejores propiedades como quelante respecto al monoanión BNPP.^{9,69,102,188}

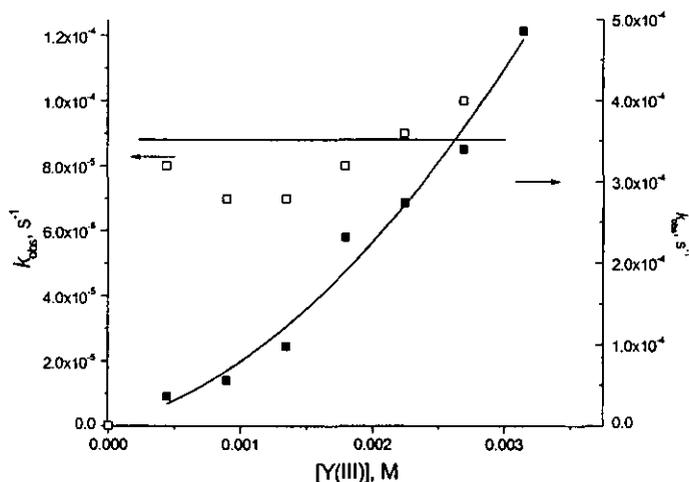


Fig.11.9. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de PNPDP (cuadrados rellenos) y MNPP (cuadrados vacíos) en función de la concentración de Y(III) en presencia de BTP 20 mM a pH 8.5 y 25°C.

Los perfiles de k_{obs} vs. pH para la hidrólisis de MNPP muestran un incremento en k_{obs} al ir a valores de pH mayores, como en el caso de BNPP, pero se hacen independientes del pH a valores mayores que 7, figuras 11.7 y 11.9 (cuadrados vacíos). Cualitativamente este comportamiento concuerda con la cinética de hidrólisis de orden cero observado. Más aun, bajo las condiciones de las figuras 11.8 y 11.10 a valores de pH por encima de 7, la concentración de los hidroxocomplejos alcanza el nivel de 5×10^{-4} M al cual la velocidad de reacción es ya independiente de la concentración del metal (ver figuras 11.7 y 11.9)

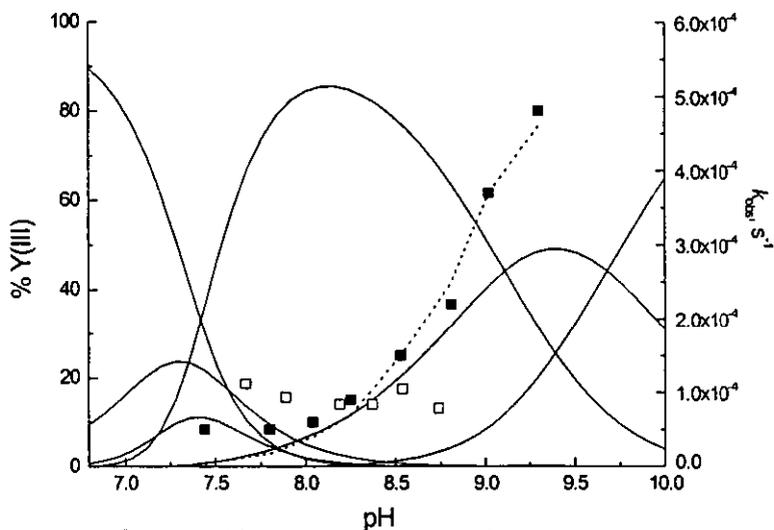


Fig.11.10. Constantes de velocidad observadas de primero orden para la hidrólisis de PNPDP (cuadrados rellenos) y MNPP (cuadrados vacíos) y diagrama de distribución de especies para los hidroxocomplejos del sistema Y(III) 1.8 mM y BTP 20 mM como función del pH (*Esquema 10.3*). La línea punteada es el perfil teórico de k_{obs} vs. pH calculado de acuerdo a la ecuación (11.2) y el recuadro ampliado a la derecha muestra el ajuste a valores de pH menores que 8.

La cinética de hidrólisis de PNPDP se estudió solamente con el sistema BTP-Y(III). Su comportamiento es muy parecido al de la cinética de hidrólisis de BNPP: el orden cinético respecto a Y(III) es mayor que 1 (Fig.11.9, cuadrados sólidos) y el perfil de k_{obs} en función del pH se muestra una tendencia a aumentar rápidamente al ir hacia valores de pH mayores (Fig.11.10).

Se probó la correlación de k_{obs} con la distribución de las diferentes especies hidroxio, siguiendo el procedimiento descrito para la hidrólisis de BNPP, y para PNPDP se encontró que ambos resultados, los de la dependencia de la concentración y la dependencia del pH de k_{obs} a $\text{pH} > 8$ pueden ser ajustados de forma satisfactoria a una ecuación similar a la ecuación 11.4, pero involucrando los complejos pentahidroxio de BTP en lugar de los complejos pentahidroxio de Tris:

$$k_{obs} = k_2[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+] + k_3[Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_5^+]^2 \quad (11.5)$$

con $k_2 = 0.28 \pm 0.09 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_3 = 295 \pm 50 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$. La línea punteada en la Fig.11.10 es el ajuste teórico calculado de acuerdo a la ecuación (11.5). Este ajuste se desvía significativamente de los puntos experimentales por debajo de pH 8 donde existen otras especies que aparentemente contribuyen a la velocidad de reacción en este intervalo de pH, como los dihidroxocomplejos $Y_2(\text{BTP})(\text{OH})_2^{4+}$.

12. Discusión general de los sistemas con Y(III) y comparación con sistemas relacionados

Uno de los resultados más importantes del sistema BTP-Y(III) es que se encontró una cinética de hidrólisis de BNPP de segundo orden con respecto a la concentración de Y(III). Esta dependencia de segundo orden no ha sido reportada en sistemas hidrolíticos de fosfodiésteres catalizados por lantánidos. Para estos sistemas basados en Ln(III) se han reportado leyes de velocidad que involucran: 1) cinéticas con “saturación” tipo Michaelis-Menten con acuoiones y algunos complejos macrocíclicos de lantánidos (III),^{123,128,130,137} 2) cinéticas simples de primer orden con criptatos de lantánidos (III)¹⁸⁶ y 3) cinéticas de tercer orden con un macrociclo dinuclear de lantano (III).⁶² Esta dependencia de segundo orden respecto al metal solamente ha sido reportada como una de las rutas en la hidrólisis de ésteres fosfonatos que tienen grupos de coordinación para el ion metálico, para los que se proponen rutas de reacción de primer, segundo y tercer orden respecto a La(III).¹³⁷ Adicionalmente, vale la pena resaltar que se han reportado órdenes de reacción mayores para especies mononucleares y dinucleares de lantánidos (III), pero hasta el momento no es claro cuáles factores determinan el tipo de cinética.

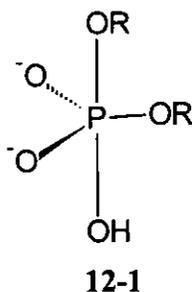
La diversidad en leyes de velocidad dificulta la comparación de la reactividad de diferentes catalizadores en términos de las constantes de velocidad independientes de la concentración del ion metálico debido a que tienen diferentes dimensiones ($M^{-1}s^{-1}$, $M^{-2}s^{-1}$, $M^{-3}s^{-1}$, etc.) y por lo tanto sólo es posible comparar las constantes de velocidad observadas de primer orden (s^{-1}) a las condiciones particulares de cada sistema.

Comparando nuestro sistema BTP-Y(III) en términos de k_{obs} (s^{-1}) con los sistemas reportados en la literatura, encontramos que la reactividad fosfodiesterolítica de Y(III) en presencia de BTP es sustancialmente más alta que para la mayoría de los sistemas fosfoesterolíticos que emplean lantánidos. Por ejemplo a $[Y(III)]=4.5$ mM la k_{obs} para la hidrólisis de BNPP alcanza un valor de $0.0025 s^{-1}$ a $25^{\circ}C$ y pH 8.5 (Fig.9.1a), la cual corresponde a un tiempo de vida media de solamente 4.6 minutos. En contraste el acuoión más reactivo de los lantánidos, Er^{3+} , tiene, a “saturación”, una $k_{obs} = 0.00053 s^{-1}$ a $50^{\circ}C$,¹²³ y los valores de k_{obs} para la hidrólisis de BNPP logradas con complejos macrocíclicos de lantánidos (III)^{64,134,186} alcanzan valores de $0.001 s^{-1}$ pero también a temperaturas elevadas.

Las constantes de velocidad observadas para la hidrólisis del triéster PNPDPDP son del mismo orden de magnitud que las de BNPP (Figuras 11.1a y 11.9, Figuras 11.3 y 11.10). Sin embargo, PNPDPDP es mucho más reactivo que BNPP: la constante de velocidad de primer orden reportada para la hidrólisis espontánea de PNPDPDP a 25°C es 9.7×10^{-6} y 4.2×10^{-5} a pH 8 y 9 respectivamente,³⁹ mientras que la constante para la reacción de hidrólisis no catalizada de BNPP a 25°C es $1.1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$.¹⁰ Por lo tanto, el factor de incremento en la velocidad de hidrólisis de PNPDPDP a las concentraciones más altas de Y(III) empleadas en el intervalo de 3-5 mM es de cerca de 20 veces, pero del orden de 2×10^8 para BNPP.

También es posible comparar las velocidades fosfoesterolíticas de nuestro sistema con Y(III) con el complejo de Cu(II) tetrametil etilendiamina como catalizador:¹⁸⁹ bajo condiciones similares el complejo de Cu(II) incrementa la velocidad de hidrólisis cerca de 10^2 veces para NPDPP y de 10^5 veces para BNPP. Por lo tanto, se puede decir que Y(III) tiene una preferencia mucho mayor hacia el fosfodiéster.

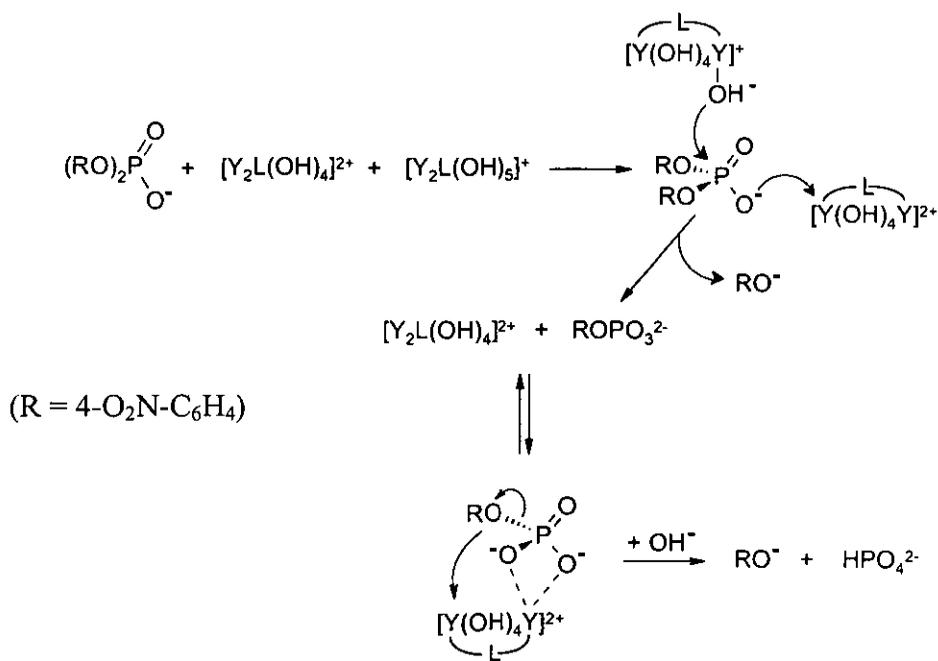
El ataque nucleofílico del OH^- coordinado hacia el grupo fosforilo asistido por el catión metálico, debe pasar por la formación, generalmente desfavorable, de un intermediario cíclico de 4 miembros. Contrariamente a lo que podría esperarse, los ciclos pequeños son relativamente más estables con los cationes grandes⁶¹ y esta puede ser una de las razones para que se observen actividades fosfoesterolíticas más altas para cationes metálicos como Y(III) respecto a cationes de transición que son más pequeños como Cu(II). Además, el estado de transición en la hidrólisis de los fosfodiésteres (12-1) provee una posibilidad adicional de quelación en anillos de 4 miembros vía los dos oxígenos aniónicos de los fosfatos. Esto puede explicar la mayor especificidad de Y(III) hacia el fosfodiéster respecto al fosfotriéster.



El segundo orden en la cinética respecto al metal puede deberse a que por algunas razones, probablemente estéricas, el ataque intramolecular del M-OH⁻ hacia el grupo fosforilo coordinado sea lento. Por otro lado, resulta lógico suponer que en esta reacción de segundo orden, un hidroxocomplejo metálico provee la asistencia electrofílica necesaria y el otro actúa como nucleófilo.

Dentro de la serie de complejos $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$, los complejos con menor número de OH⁻ coordinados (con menores valores de n) deben tener un centro metálico más electrofílico (porque el catión metálico conserva más carga positiva), mientras que aquellos con valores de n mayores, deben tener OH⁻ coordinados más nucleofílicos (porque el ion OH⁻ conserva más densidad electrónica). De hecho, la ecuación cinética (11.4) indica la participación simultánea de un hidroxocomplejo más electrofílico $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ y uno más nucleofílico $Y_2(BTP)(OH)_5^+$.

Finalmente, en el esquema 12.1 se presenta el mecanismo unificado de la hidrólisis de BNPP y MNPP.



Esquema 12.1

Los datos cinéticos para MNPP no nos permiten identificar la especie activa ya que la velocidad no depende de la concentración de Y(III) y casi no depende del pH. Sin embargo, una ligera disminución de k_{obs} a mayores valores de pH (Fig.11.10) indica que las especies activas más probables son los hidroxocomplejos con un menor número de OH⁻ coordinados, por ejemplo $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$.

La ruptura de fosfomonoésteres no necesariamente incluye un ataque nucleofílico y se sabe que típicamente transcurre a través de un mecanismo monomolecular tipo S_N1 .³⁶ En este caso el efecto catalítico del complejo metálico se debe a su capacidad de estabilizar el grupo saliente (ver Introducción). Evidentemente, la estructura dinuclear del complejo resulta muy bien organizada para este tipo de activación del sustrato: un catión de Y(III) del dímero compleja al sustrato, transformando un proceso intermolecular en un proceso intramolecular que es mucho más eficiente (ver Introducción), mientras que otro catión de Y(III) estabiliza el grupo saliente, como se ilustra en el esquema 12.1.

De los resultados obtenidos con Tris como ligante, es claro que esta combinación de especies reactivas no existe ya que solamente uno de los dos complejos está presente en disolución, sin embargo, es posible decir que los complejos con Tris tienen una menor reactividad fosfodiesterolítica. Si comparamos los valores de k_3 para la reacción de tercer orden de BNPP con complejos de Tris-Y(III) con k_3 para la reacción con los complejos de BTP-Y(III), encontramos que es *ca.* 10 veces más pequeña (110 y 830 $M^{-2}s^{-1}$ respectivamente, *vide supra*).

La ruta de reacción para PNPDP involucra dos hidroxocomplejos más altos, $Y_2(BTP)(OH)_5^+$, ecuación (11.5), o bien una combinación de $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ y $Y_2(BTP)(OH)_6$, ya que debido a la labilidad cinética de los complejos de Y(III) estas rutas de reacción son indistinguibles entre sí. Por otro lado, hay que recordar que la reactividad de los hidroxocomplejos metálicos hacia triésteres correlaciona bien con su basicidad¹²⁴ y esto puede explicar la participación de dos complejos pentahidroxo que son más básicos.

13. Comportamiento en disolución acuosa del sistema BTP-Ln(III)

Los resultados encontrados con Y(III) y BTP indican que este aminoalcohol es capaz de estabilizar especies metalohidroxio reactivas mostrando una alta reactividad en la hidrólisis de fosfoésteres en disolución acuosa a valores de pH débilmente básicos y a temperatura ambiente. Con este sistema se observó una mayor especificidad hacia el sustrato fosfodiéster BNPP comparado con los otros fosfoésteres estudiados. Por lo tanto vale la pena probar este sistema con otros cationes trivalentes que no presentan reactividad redox en estas condiciones, tales como los lantánidos, e incluir un éster de ácido carboxílico como sustrato con el fin de poder hacer comparaciones.

13.1. Equilibrios en disolución BTP-Ln(III)

Al iniciar esta parte del trabajo, se probaron nuevamente ligantes sencillos (etilendiamina, 1,3-diaminopropano, poliaminas, y aminoalcoholes análogos a Tris) para prevenir la precipitación de disoluciones acuosas de cationes de lantánidos ($\text{Ln(III)} = \text{La, Nd, Pr, Eu, Gd y Dy}$) en el intervalo de concentraciones de 0.5-10 mM y de pH 7 a 9. De forma similar a lo observado con Y(III), los mejores resultados se obtuvieron con BTP, encontrándose que la concentración mínima de BTP suficiente para prevenir la precipitación de los Ln(III) en este intervalo es de 10 mM.

Las curvas de titulación de BTP 10 mM en presencia de 1 equivalente de la sal del metal muestran el consumo de más de 2 equivalentes de NaOH por un equivalente de metal además de los 2 equivalentes de NaOH que son consumidos para la titulación del ligante (Fig.13.1). En el caso de La(III) la precipitación ocurre a valores de pH por encima de 9, pero la titulación con exceso de BTP (2:1 BTP a metal) nos permite alcanzar valores de pH de 10 sin precipitación y observar el consumo de cerca de 2.5 equivalentes de NaOH por un equivalente de La(III), comportamiento que también se observa con los otros metales. (Los datos numéricos de las titulaciones se encuentran en el Anexo 2).

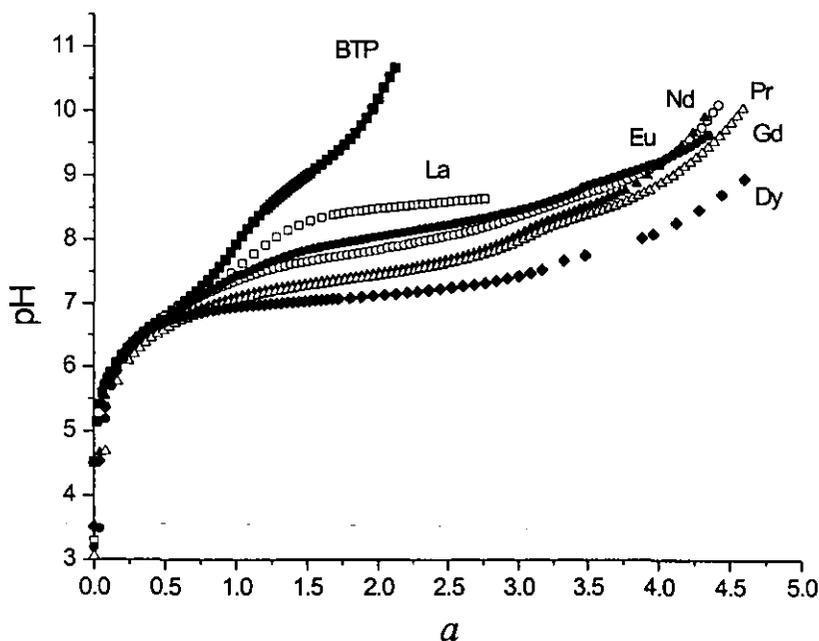


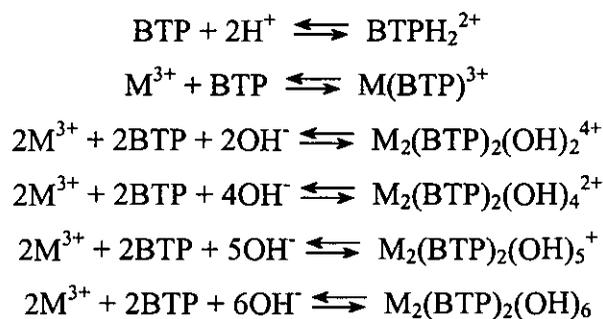
Fig.13.1. Curvas de titulación para BTP 10 mM y para una mezcla de BTP 10 mM en relación 1:1 con percloratos de lantánidos(III) en NaClO_4 0.1 M. Al inicio de cada titulación se añadieron dos equivalentes de HClO_4 . a es el número de equivalentes de NaOH añadidos.

Los resultados de las titulaciones en presencia de Ln(III) indican ya sea la formación de hidroxocomplejos del metal estabilizados por BTP o la formación de los respectivos alcoxo complejos por desprotonación de los grupos hidroximetilo de BTP; sin embargo mediante esta técnica es imposible distinguirlos. De hecho, al realizar los ajustes de las curvas de titulación se considera que un complejo ML(OH) es un complejo MLH_{-1} , porque en el balance de masa para la $[\text{H}^+]$ un ion OH^- consume protones para dar agua, y $[\text{MLH}_{-1}] = \beta[\text{M}][\text{L}][\text{OH}]/K_w$, por lo tanto H_{-1} es un protón que pierde una molécula de agua coordinada al metal o bien el ligante. Para algunos casos similares reportados en la literatura, ha sido posible resolver este problema haciendo un análisis de los productos obtenidos después de la reacción de ruptura de BNPP, ya que se ha encontrado que se forma el ligante alcohol fosforilado, lo cual indica la posible desprotonación del alcohol,⁶⁴ pero en nuestro caso el análisis de los productos mostró que se liberan dos equivalentes de nitrofenolato y un equivalente de fosfato inorgánico en la reacción con BNPP (ver sección 7.2). Por lo tanto, tomando como un primer criterio esta evidencia, lo más probable es que se formen hidroxocomplejos en disolución.

El análisis de los datos obtenidos de las titulaciones potenciométricas con lantánidos es, en general, similar al descrito anteriormente para el sistema Y(III)/BTP.

El esquema de reacción más simple que puede plantearse, en congruencia con las titulaciones potenciométricas, involucra la formación de un único complejo en disolución, sin embargo es imposible ajustar los datos con modelos de este tipo (ver Anexo 2). Un siguiente paso es considerar la formación de series de hidroxocomplejos mononucleares de composición general $M(\text{BTP})(\text{OH})_n^{3-n}$ en donde n va de 1 a 3 y posteriormente considerar la formación de sus especies superiores, es decir, especies de composición general $M_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_{2n}^{6-2n}$, pero en ningún caso los resultados fueron del todo satisfactorios después de un cuidadoso análisis de los valores obtenidos para las constantes de formación (ver Anexo 2 con la comparación entre los modelos probados).

Finalmente se obtuvo un ajuste satisfactorio para un esquema de reacción, parecido al esquema 10.3, que involucra la formación de hidroxocomplejos dinucleares presentados por el grupo de equilibrios mostrados en el esquema 13.1. Los ajustes de los datos experimentales con este modelo para Ln(III) y BTP en relación 1:1 a concentración 10 mM se muestran en la Fig.13.2 y el resumen de las constantes de estabilidad obtenidas se muestran en la Tabla 13.2.



Esquema 13.1

Con el fin de analizar la validez del modelo planteado en el esquema 13.1 se hicieron además titulaciones variando la concentración total del metal y del ligante en el intervalo de 5-20 mM para ambos. Estas curvas se ajustaron con los modelos planteados (ver Anexo 2). Como ejemplo, en la tabla 13.1 se muestran los logaritmos de las constantes de formación acumulativas ($\log \beta$) obtenidas de curvas de titulación a diferentes concentraciones para lantano(III).

Tabla 13.1. Constantes de formación acumulativas ($\log \beta$)^a para el sistema BTP-La(III).

BTP	Especie en disolución		BTP-La(III) 20.0-14.8 mM	BTP-La(III) 20.0-10.0 mM	BTP-La(III) 10.0-10.0 mM	BTP-La(III) 5.0-5.0 mM
	H	La(III)	$\log \beta \pm sd$	$\log \beta \pm sd$	$\log \beta \pm sd$	$\log \beta \pm sd$
1	0	1	1.69 ± 0.04	2.49 ± 0.03	2.46 ± 0.02	2.29 ± 0.03
2	-2	2	-10.17 ± 0.03	-9.89 ± 0.03	-10.46 ± 0.05	-9.94 ± 0.04
2	-4	2	-27.33 ± 0.05	-27.29 ± 0.03	-27.62 ± 0.02	-27.73 ± 0.03
2	-5	2	-37.23 ± 0.10	-36.39 ± 0.02	-36.0	-- no --
	χ^2		20.43	18.11	10.54	13.53

^a $[ML(OH)] = [MLH_{-1}] = \beta[M][L][OH]/K_w$, en donde H_{-1} es un protón que puede perderse de una molécula de agua o del ligante.

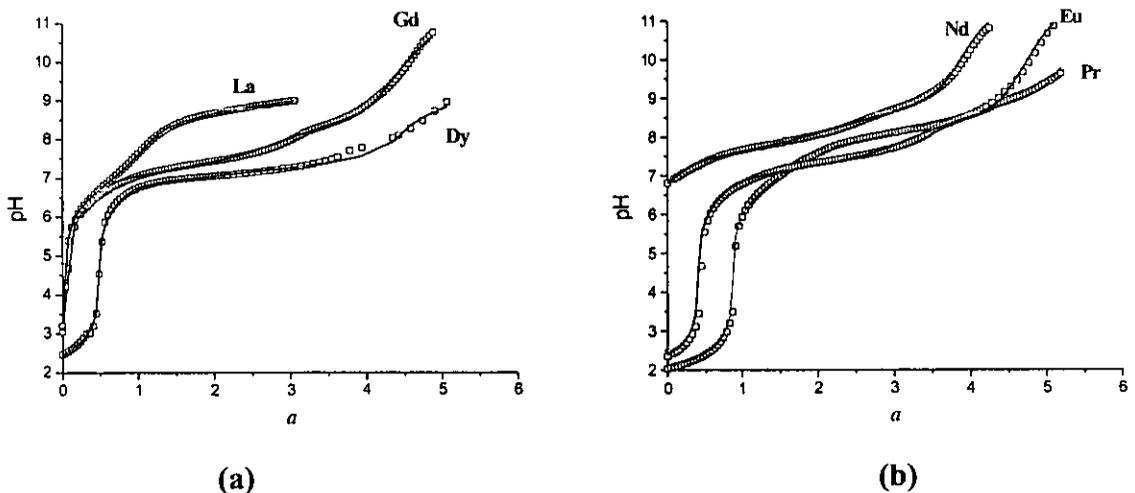


Fig.13.2. Curvas de titulación de disoluciones 10 mM de BTP y percloratos de lantánidos (III) en relación 1:1 en medio 0.1 M de $NaClO_4$. Al inicio de cada titulación se añadieron dos equivalentes de $HClO_4$. a es el número de equivalentes de $NaOH$ añadidos. Los cuadrados vacíos son los datos experimentales y las líneas continuas son los perfiles teóricos de pH calculados de acuerdo al esquema 13.1 y las constantes de estabilidad dadas en la tabla 13.2. (a) Perfiles para La (III), Gd(III) y Dy (III), (b) perfiles para Nd(III), Eu(III) y Pr(III). Las disoluciones patrón de Dy(III), Eu(III), y Pr(III) contienen cantidades significativas de $HClO_4$ que se titula por debajo de pH 7.0.

Los logaritmos de las constantes de equilibrio para cada etapa se reúnen en la Tabla 13.2. Estos valores son los valores promedio de las constantes obtenidas para titulaciones de mezclas de lantánidos (III) y BTP a diferentes concentraciones totales, las cuales concuerdan razonablemente entre sí.

Tabla 13.2. Constantes de estabilidad para la formación de complejos de Lantánidos (III) con BTP (25°C, 0.1 M NaClO₄).

Equilibrio	Log K ^a					
	M= La ³⁺	Pr ³⁺	Nd ³⁺	Eu ³⁺	Gd ³⁺	Dy ³⁺
[BTP-M]/[BTP][M]	2.30					
[2BTP-2M-2OH]/[BTP] ² [M] ² [OH] ²	18.11	20.80	21.71	23.62	23.44	23.86
[2BTP-2M-4OH]/[BTP] ² [M] ² [OH] ⁴	28.96	31.66	32.77	34.95	34.90	38.12
[2BTP-2M-5OH]/[BTP] ² [M] ² [OH] ⁵	33.62	36.14	37.20	39.29	33.39	
[2BTP-2M-6OH]/[BTP] ² [M] ² [OH] ⁶					42.73	48.73
[M-OH]/[M][OH] ^b	4.67	5.18	5.30	5.42	5.38	5.63

^a El error está dentro de ±(0.02-0.08).

^b Constantes de formación para los complejos monohidroxo a 25°C y fuerza iónica 0.3 M.⁵⁴

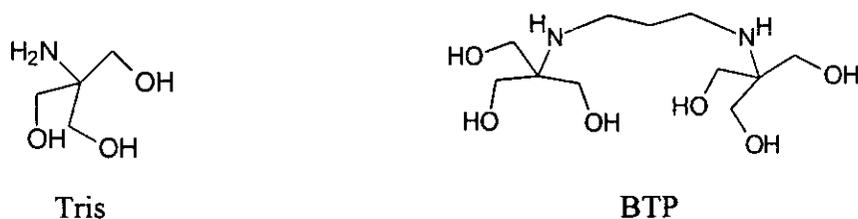
Llama la atención que sólo en el caso de lantano(III) el complejo simple 1:1 metal a BTP contribuye lo suficiente para permitirnos la determinación de su constante de estabilidad. Para todos los otros cationes, la estabilidad de sus hidroxocomplejos es tan alta que a valores de pH cercanos a 8 y mayores, donde se esperaría que los complejos M(BTP)³⁺ contribuyeran significativamente a la concentración total del metal (esto asumiendo que las constantes de estabilidad para complejos 1:1 con los otros metales tienen valores similares), los primeros hidroxocomplejos M₂(BTP)₂(OH)₂⁴⁺ ya son las especies dominantes, y para los cationes más ácidos como Gd(III) y Dy(III) aparecen incluso hidroxocomplejos M₂(BTP)₂(OH)₄²⁺ (ver las curvas de distribución de especies en la Fig. 14.3 a-d).

La constante de estabilidad del complejo La(BTP)³⁺ (logK=2.30, Tabla 13.2) es menor que la encontrada para el complejo Y(BTP)³⁺ (logK=3.29, Tabla 10.2). Esto concuerda con la mayor estabilidad de los complejos de Y(III) que los correspondientes de La(III) debido a su mayor acidez. Por ejemplo, el logaritmo de la constante de estabilidad (log K) con EDTA es de

18.08 para el complejo con Y(III) y de 15.46 para el complejo con La(III); con picrato es de 4.03 para Y(III) y de 3.51 para La(III).⁵⁴

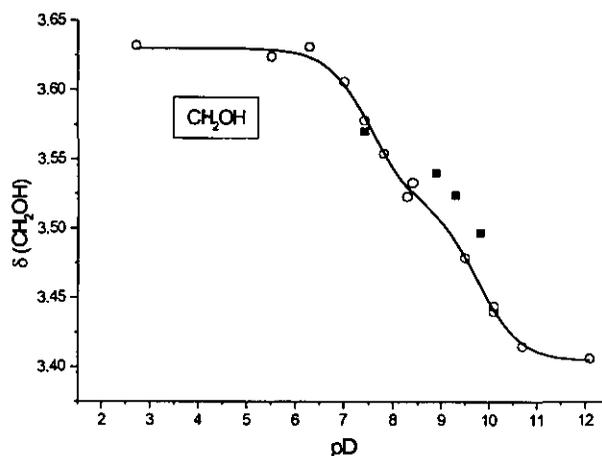
Por otro lado, es bien sabido que los lantánidos tienen una tendencia muy fuerte a formar complejos polinucleares en agua.⁶² Así, se sabe que todos los lantánidos (III) empleados en este trabajo forman especies dihidroxo dinucleares $M_2(OH)_2^{4+}$ en disolución acuosa.⁵⁴ Además, se ha reportado que al realizar la titulación potenciométrica de $LaCl_3$ con álcali se forma la especie $La_2(OH)_5^{+119}$ que es análoga a los complejos $M_2(BTP)_2(OH)_5^+$ mostrados en el esquema 13.1. Por esto resulta razonable suponer que la coordinación con BTP estabiliza estas hidroxocomplejos previniendo la formación de complejos polinucleares y la precipitación de los hidróxidos metálicos. Vale la pena hacer notar que se ha reportado que la especie $La_2(OH)_2^{4+}$ se forma también con complejos macrocíclicos dinucleares de lantano.⁶²

Se hicieron titulaciones de disoluciones con Tris y cationes Ln(III), ya que resulta lógico pensar que debido a la similitud que existe con BTP, pudiera comportarse de manera parecida como ligante, pero siempre se observó la precipitación del hidróxido del metal a pH por encima de 8. Por lo tanto, es de esperarse que exista al menos cierto enlace adicional de la segunda mitad del ligante entre la molécula de BTP y el catión metálico en los hidroxocomplejos, y que éste sea el responsable de la diferencia observada en el comportamiento de Tris y BTP como ligantes.

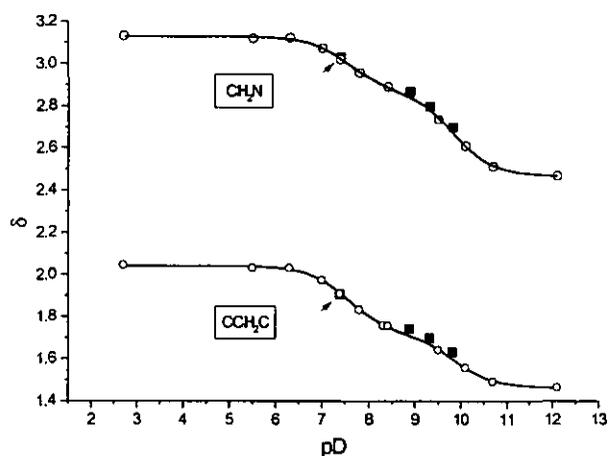


La evidencia de las titulaciones junto con el análisis de los productos apoya el hecho de que las especies nucleofílicas son los hidroxocomplejos de lantánidos y no los alcóxocomplejos. Para obtener más información al respecto se realizaron las titulaciones potenciométricas de BTP en presencia y ausencia de $La(ClO_4)_3$ en D_2O registrando el espectro de 1H NMR a cada valor de pD. De acuerdo con lo reportado en la literatura, y como se mencionó para los complejos BTP-Y(III), la desprotonación de un grupo alcohol por coordinación con un catión metálico da lugar a un desplazamiento en las señales de los protones metilénicos en el grupo $-CH_2OH$ hacia campo alto (*ca.* 0.3 ppm)¹⁸⁵, por lo que cabe esperar un efecto cualitativamente similar para el La(III) coordinado con los grupos alcohol de BTP. La figura 12.2 muestra los perfiles de los desplazamientos químicos, δ , en función del pD en D_2O correspondientes al singulete de los

protones metilénicos en posición α respecto al grupo OH (Fig.13.3a), y a la señal central de los multipletes de los protones metilénicos de la cadena propilénica en posiciones α - y β - al átomo de nitrógeno de BTP (Fig.13.2b) en ausencia y presencia de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$.



(a)



(b)

Fig.13.3. Titulación potenciométrica de BTP 20 mM en D_2O por ^1H NMR. Los círculos vacíos y los cuadrados rellenos muestran las mediciones en ausencia y presencia de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ 5 mM respectivamente (Tabla 13.3). Las líneas sólidas son las curvas de ajuste a la ecuación (10.1).

Los puntos obtenidos para las disoluciones que contienen perclorato de $\text{La}(\text{III})$ se desvían de las curvas de titulación del ligante libre en el mismo intervalo de pH en el que se observa esta desviación en las curvas de titulación potenciométrica (Fig.13.1). Los resultados obtenidos son muy similares a los encontrados para el sistema BTP- $\text{Y}(\text{III})$: hay un desplazamiento considerable hacia campo bajo en lugar de hacia campo alto para los protones metilénicos en posición α - a los grupos OH, concordando con la estructura de un complejo en la que los grupos OH están unidos

al ion metálico sin desprotonarse y el pequeño desplazamiento de las señales de los protones de la cadena propilénica indican que el átomo de nitrógeno también está involucrado en la coordinación entre el catión metálico y el ligante.

13.2. Especies en disolución acuosa. ESI-MS.

Con el fin de obtener alguna información adicional sobre el tipo de especies presentes en las mezclas de BTP-lantano en disoluciones básicas, se obtuvieron espectros de masas con ionización por electrospray de disoluciones con 20 mM de BTP y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 1 mM a pH 9.2. En varios casos la técnica de ESI-MS ha permitido obtener información para la caracterización de complejos metálicos.¹⁶⁹ Particularmente esta técnica de ionización (electrospray) permite que los iones contenidos en la muestra pasen a fase gas directamente de una disolución acuosa con poca o nula fragmentación y por tanto provee valiosa información cualitativa de la naturaleza de las especies cargadas en disolución.

Desde luego, al emplear esta técnica, hay que considerar que entre las especies químicas en fase gas pueden existir interacciones que no se presentan en disolución acuosa. La presencia de estos procesos adicionales, es decir, especies que solamente se forman bajo las condiciones de fase gas y que no existen en disolución, pueden dar lugar a los llamados “falsos positivos”.¹⁹⁰

La tabla 13.4 reúne los datos obtenidos de los espectros de masas. El espectro de masas de la disolución del ligante puro a pH 9.2, consiste de una serie de picos correspondientes a los oligómeros de BTP protonados $(\text{BTP})_n\text{H}^+$ en donde $1 \leq n \leq 4$ y un pico que incluye el BTP cationizado por Na^+ con $m/z=305.1$ (Tabla 13.4, renglones 1-5). Ciertamente, solamente el catión BTPH^+ realmente existe en disolución mientras que el aducto de sodio y los oligómeros se forman en fase gas.

En presencia de nitrato de lantano se observaron otros 8 picos adicionales identificados como se muestra en la tabla 13.4 (renglones 6-13). Adicionalmente se observaron dos picos no identificados con $m/z=365.1$ y 409.2 , que probablemente correspondan a impurezas de la muestra. Los picos con $m/z=351.1$, 419.1 y 482.0 por su estructura isotópica pertenecen a especies dicatiónicas. También se observaron tres picos que corresponden a los complejos diméricos y a otras especies monoméricas (renglones 7, 8 y 11), y que contienen al ligante BTP sencilla o doblemente desprotonado.

Tabla 13.4. Valores calculados y observados de m/z para el sistema BTP + $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ a pH 9.2.

	Especie	fórmula	m/z	
			Calculado	Observado
1	BTP H^+	$\text{C}_{11}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$	283.192	283.2
2	BTP Na^+	$\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$	305.174	305.1
3	BTP ₂ H^+	$\text{C}_{22}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_6$	565.376	565.4
4	BTP ₃ H^+	$\text{C}_{33}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_6$	847.560	847.5
5	BTP ₄ H^+	$\text{C}_{44}\text{H}_{105}\text{N}_2\text{O}_6$	1129.744	1129.7
6	$\text{La}(\text{BTP H}_{.1})(\text{BTP})^{2+}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{La}$	351.133	351.1
7	$\text{La}_2(\text{BTP H}_{.2})_2^{2+}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{La}_2$	419.074	419.1
8	$\text{La}_2(\text{BTP H}_{.1})_2(\text{NO}_3)_2^{2+}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{La}_2$	482.070	482.0
9	$\text{La}(\text{BTP H}_{.2})(\text{BTP})^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{La}$	701.258	701.2
10	$\text{La}(\text{BTP H}_{.1})(\text{BTP})(\text{NO}_3)^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{La}$	764.254	764.3
11	$\text{La}_2(\text{BTP H}_{.2})_2(\text{NO}_3)^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{La}_2$	900.156	900.1
12	$\text{La}(\text{BTP H}_{.2})(\text{BTP})_2^+$	$\text{C}_{33}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{La}$	983.442	983.4
13	$\text{La}(\text{BTP H}_{.1})(\text{BTP})_2(\text{NO}_3)^+$	$\text{C}_{33}\text{H}_{77}\text{N}_7\text{O}_{21}\text{La}$	1046.438	1046.4

Una conclusión *a priori* de estos datos es que en disolución ocurre la desprotonación de los grupos alcohol del ligante en lugar de la formación de hidroxocomplejos en disolución. Sin embargo es altamente probable que las condiciones de fase gas favorezcan la deshidratación de los complejos convirtiendo un fragmento $\text{M}(\text{OH})(\text{ROH})$ en $\text{M}(\text{RO}) + \text{H}_2\text{O}$. De hecho, en contraste con lo que sucede en fase acuosa, la basicidad en fase gas del ion OH^- es mucho más alta que la del ion RO^- ; la reacción de transferencia de protón $\text{OH}^-_{\text{gas}} + \text{EtOH}_{\text{gas}} \rightarrow \text{EtO}^-_{\text{gas}} + \text{H}_2\text{O}_{\text{gas}}$ es muy exotérmica, con un ΔH de -56 kJ/mol .¹⁹¹ Por lo tanto la ruta más probable para la formación de estas especies en fase gas es la deshidratación de complejos hidroxocomplejos.

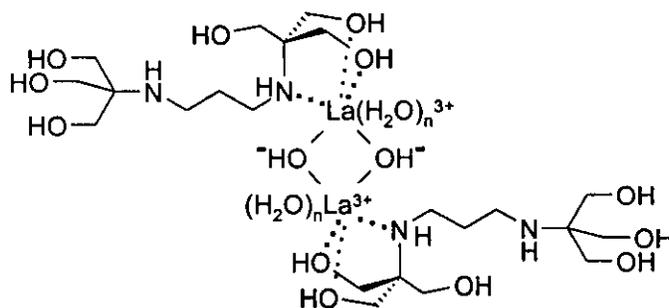
Así, la especie más abundante en disolución, de acuerdo a las mediciones realizadas en ESI-MS es $\text{La}_2(\text{OH})_4(\text{BTP})_2^{2+}$ (ver el diagrama de distribución de especies en la Fig.14.3a) que después de deshidratarse produce $\text{La}_2(\text{BTPH}_{.2})_2^{2+}$ (Tabla 13.4, renglón 7). También se detectó un aducto de este catión con nitrato (Tabla 13.4, renglón 11). Otra especie dimérica

$\text{La}_2(\text{BTPH}_1)_2(\text{NO}_3)_2^{2+}$ (Tabla 13.4, renglón 8) es probablemente formada por la deshidratación y la captura de nitrato subsecuente del dihidroxocomplejo $\text{La}_2(\text{OH})_2(\text{BTP})_2^{4+}$. La cantidad de complejos mononucleares de lantano $\text{La}(\text{BTP})^{3+}$ y $\text{La}(\text{OH})^+$ en disolución es todavía significativa a las condiciones empleadas, por lo tanto, la forma monomérica de los iones en fase gas puede ser producida por reacciones de intercambio y deshidratación entre estas especies monoméricas en disolución.

Por otro lado, con un gran exceso de BTP sobre La(III), los iones dinucleares en fase gas pueden dar lugar a los monómeros. La repulsión electrostática mutua de iones La^{3+} altamente cargados dentro de los complejos dinucleares puede ser mucho más fuerte en fase gas que en agua y la estabilidad relativa de los complejos dinucleares puede ser menor. Por esto los cationes $\text{La}(\text{BTP H}_2)(\text{BTP})^+$ y $\text{La}(\text{BTP H}_1)(\text{BTP})(\text{NO}_3)^+$ pueden formarse respectivamente a partir de la ruptura de $\text{La}_2(\text{BTP H}_2)_2^{2+}$ y $\text{La}_2(\text{BTP H}_1)_2(\text{NO}_3)_2^{2+}$ por BTP y la formación de otros cationes monoméricos es fácilmente explicable por la captura o pérdida subsecuente de BTP y nitrato.

En general, los datos obtenidos por ESI-MS del sistema lantano-BTP muestran un patrón complicado, pero apoyan la presencia de complejos dinucleares en disolución con relaciones metal ligante 2:2 que antes se propusieron con base en las titulaciones potenciométricas.

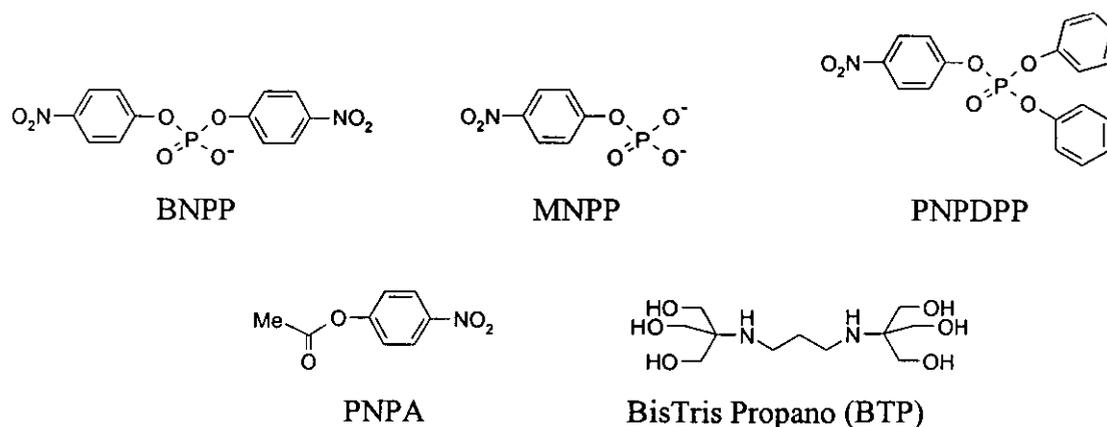
Finalmente, tomando en cuenta lo discutido en esta sección respecto a la forma de coordinación de BTP, se propone la estructura hipotética 13-1 para los complejos $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$. Es casi seguro que los primeros aniones OH^- son grupos puente, como se muestra en la estructura 13-1, mientras que para complejos con mayor número de OH^- parte de estos aniones pueden ser puente y parte terminales.



13-1

14. Comportamiento cinético del sistema BTP-Ln(III)

Junto con los sustratos empleados con el sistema BTP-Y(III), BNPP, MNPP y PNPDP, en este estudio se empleó además un sustrato mucho más activado PNPA (*Esquema 14.1*).



Esquema 14.1

Vale la pena hacer notar que debido a que BTP tiene dos valores de pK_a alrededor de 7 y 9 respectivamente, permite tener un amplio intervalo de pH amortiguado: 6.5 a 9.5. Para mantener una capacidad amortiguadora suficientemente alta en la disolución y una buena estabilidad respecto a la precipitación de hidróxidos metálicos en un intervalo amplio de pH, el estudio cinético del sistema se realizó manteniendo un exceso de BTP respecto al perclorato del lantánido (III).

14.1. Cinética de hidrólisis de BNPP

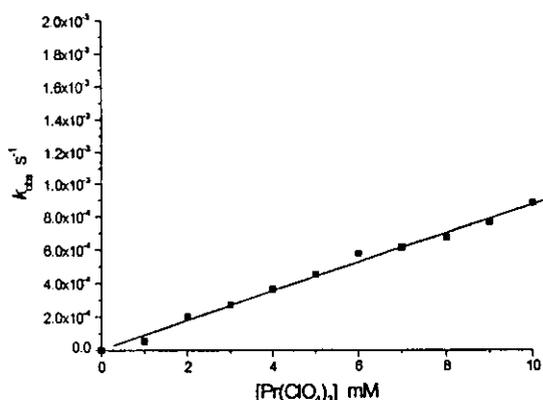
Se mostró previamente que los productos de la hidrólisis de BNPP en el sistema BTP-Ln(III) son un equivalente de fosfato inorgánico y dos equivalentes de 4-nitrofenol (ver sección 7.2). Dependiendo de las condiciones de reacción los perfiles de absorbancia (A) vs. tiempo (t), registrados en el valor máximo de absorción de anión 4-nitrofenolato, siguieron curvas cinéticas simples de primer orden cuando la hidrólisis del intermediario MNPP fue rápida o una ecuación biexponencial más compleja (Ecuación 7.1) cuando las constantes de velocidad de primer k_1 y k_2 de la hidrólisis de BNPP y MNPP fueron de magnitud similar.

$$A = \varepsilon_{\text{NF}^-} [\text{NF}^-] = A_{\infty} \left(2 + \frac{(2k_2 - k_1)e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_1 - k_2} \right) \quad (7.1)$$

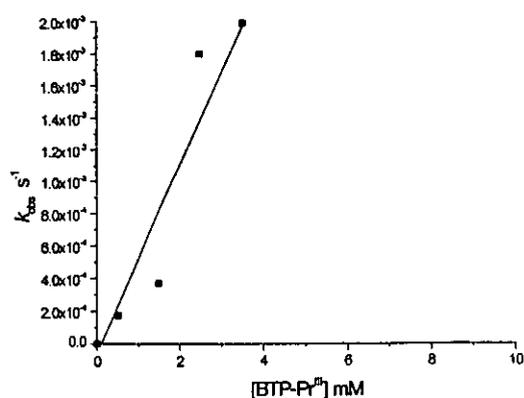
Para la siguiente discusión las constantes observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP se refieren a los valores de k_1 de esta ecuación.

El orden de reacción para el metal fue estudiado en el intervalo de pH 8.5-9 debido a que la velocidad de reacción se incrementa rápidamente al aumentar el pH por encima de 7 y tiende a nivelarse a pH 9. Las constantes observadas de primer orden (k_{obs}) en la hidrólisis de BNPP para todos los lantánidos empleados en exceso de ligante a pH 8.5 muestran una dependencia estricta de primer orden respecto a la concentración del metal (Fig.14.1a, c, e) excepto para La(III) y Nd(III) para los que se observa una contribución cuadrática a bajas concentraciones del metal. Dependiendo del metal es posible incrementar la concentración de los Ln(III) hasta 10 mM o mayores sin observar precipitación.

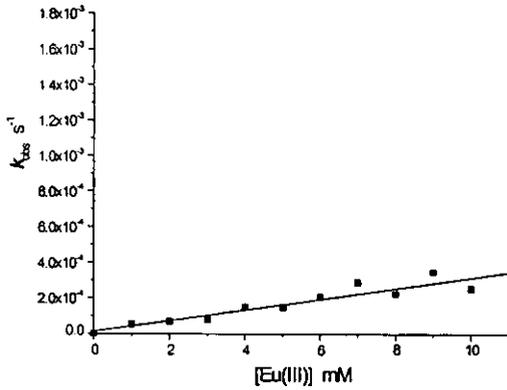
Por otro lado, si se mantiene una relación metal:ligante 1:1 en todo el intervalo, el valor de estas constantes es mayor que en exceso de ligante y la dependencia de [BTP-Ln(III)] es aproximadamente lineal en el intervalo de 2-5 mM a pH 8.5. Las constantes de velocidad observadas son muy altas, del orden de 10^{-3} s^{-1} , lo cual da un incremento de 10^8 veces respecto a la hidrólisis de BNPP no catalizada y 10^5 veces respecto a la hidrólisis alcalina (Fig.14.1b, d, f). Sin embargo, aunque en estas condiciones las constantes observadas son entre 5 y 10 veces mayores, las disoluciones no son completamente estables.



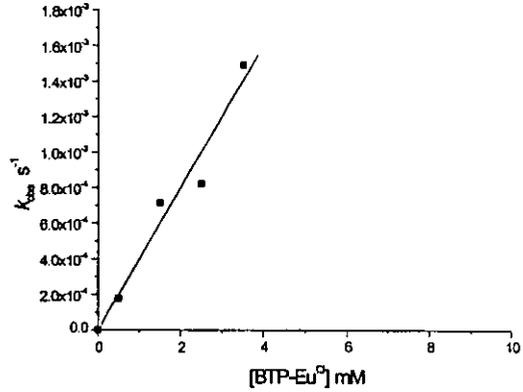
(Fig.14.1a)



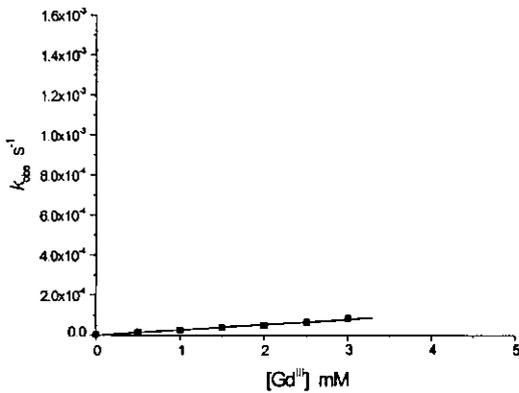
(Fig.14.1b)



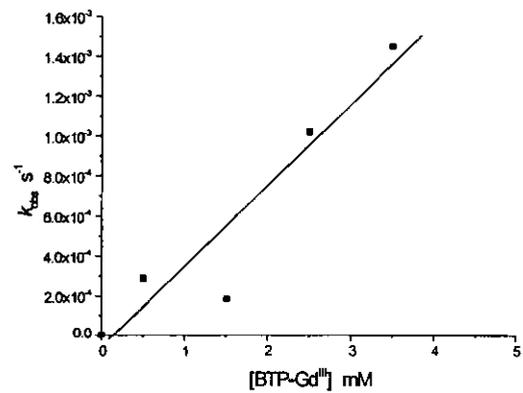
(Fig.14.1c)



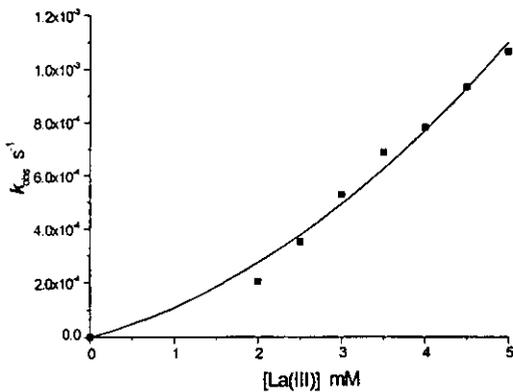
(Fig.14.1d)



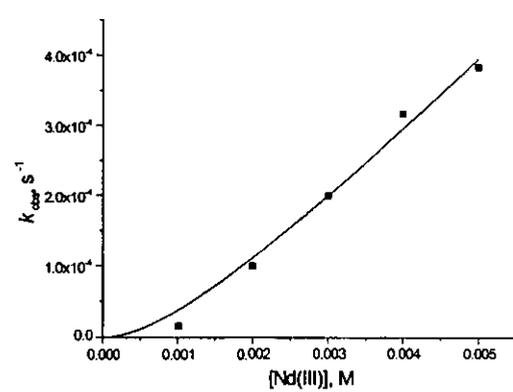
(Fig.14.1e)



(Fig.14.1f)



(Fig.14.1g)

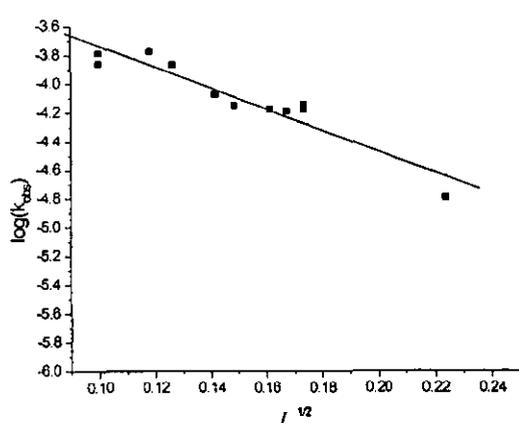


(Fig.14.1h)

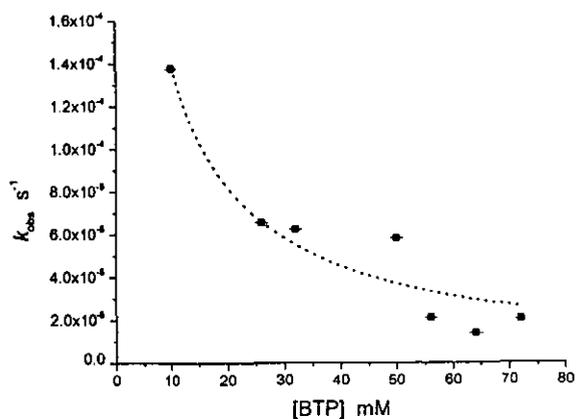
Fig.14.1. Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP a pH 8.5 en función de la concentración del metal: (a) Pr(III), (c) Eu(III), (e) Gd(III), (g) La(III) y (h) Nd(III) en presencia de BTP 20 mM a pH 8.5; (b) Pr(III), (d) Eu(III) y (f) Gd(III) en relación 1:1 con BTP a pH 8.5. Las líneas continuas son los ajustes a ecuaciones lineales o cuadráticas respectivamente. Las escalas son iguales para gráficas correspondientes a un mismo metal.

De acuerdo al comportamiento en disolución observado para estos sistemas, resulta lógico pensar que esta mayor reactividad es la suma de varias contribuciones. Una de ellas es la diferencia en la fuerza iónica, que inhibe fuertemente reacción (*vide infra*), y bajo estas condiciones su contribución negativa es menor. Otra parte seguramente se debe a que las fracciones de las especies cinéticamente activas son diferentes a estas condiciones y algunos complejos con muy alta reactividad, como los complejos $\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$, pueden estar presentes en mayor proporción. Esto concuerda con la tendencia observada en la reactividad al comparar entre diferentes metales: $\text{Pr}(\text{III}) > \text{Eu}(\text{III}) > \text{Gd}(\text{III})$ que es el mismo orden que el $\text{p}K_a$ de los acuocaciones.

La reacción es inhibida por NaClO_4 : el incremento en la concentración total de perclorato (disolución del perclorato de $\text{Ln}(\text{III})$ más perclorato de sodio adicionado) al ir de 0.01 a 0.1 M conlleva un decremento en la velocidad de la reacción de cerca de 10 veces (Fig.14.2a). La adición de NaCl o NaNO_3 causa un efecto menor indicando la posible formación específica de pares iónicos entre el anión perclorato y las especies reactivas de los lantánidos cargadas positivamente. Este efecto es responsable de una fuerte inhibición de la reacción al incrementar las concentraciones de BTP a pH constante ajustado con HClO_4 sin electrolito soporte de NaClO_4 (Fig.14.2b).



(a)



(b)

Fig.14.2.(a) Dependencia del logaritmo de la constante de velocidad observada de primer orden para la hidrólisis de BNPP en función de la raíz cuadrada de la fuerza iónica, $I^{1/2}$, a pH 8.5, BTP 20 mM y $\text{La}(\text{III})$ 2 mM. (b) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP en presencia de $\text{La}(\text{III})$ 2 mM a pH 8.5 en función de la concentración de BTP. La línea punteada muestra el ajuste de los datos.

Para analizar la dependencia de la constante de velocidad k_{obs} respecto al pH se calcularon los diagramas de distribución de especies para las condiciones de los experimentos cinéticos de acuerdo con las constantes dadas en la Tabla 13.2 y los valores experimentales de k_{obs} fueron graficados en estos diagramas como se muestra en la Fig.14.3a-f.

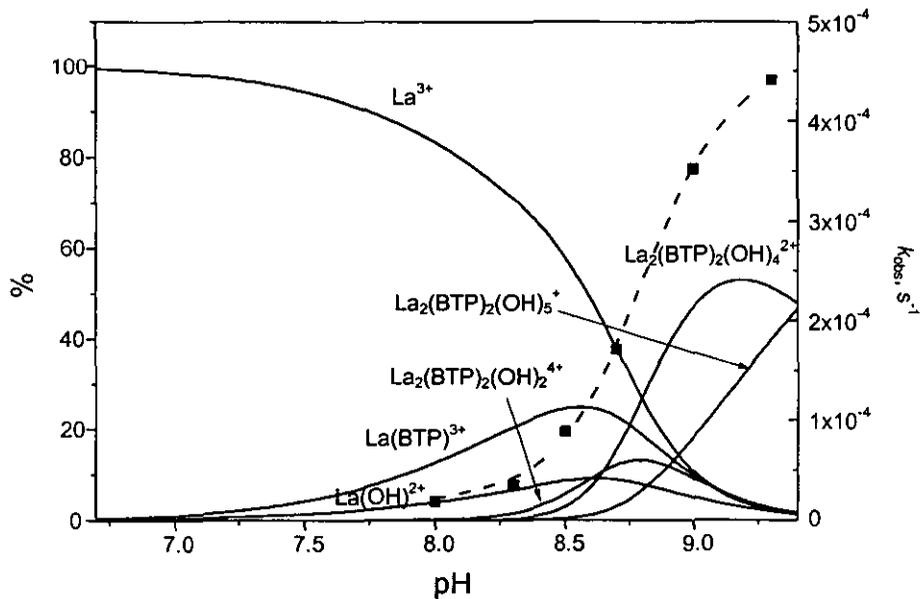


Fig.14.3a. La(III)

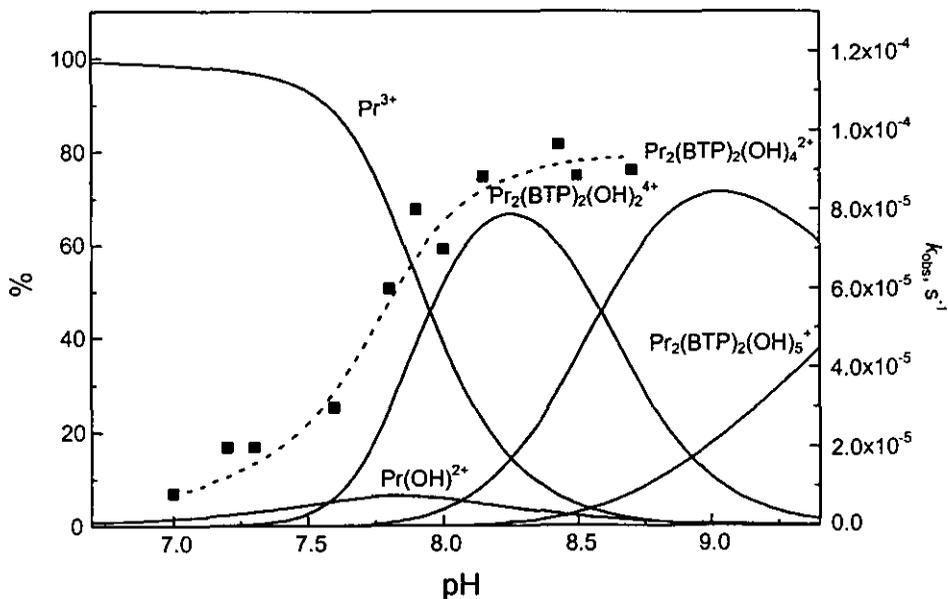


Fig.14.3b. Pr(III)

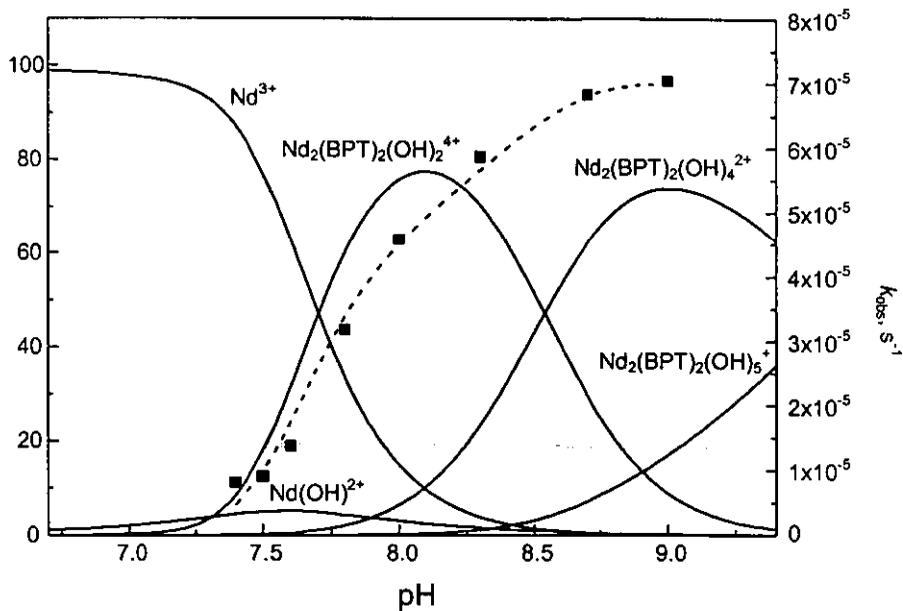


Fig.14.3c. Nd(III)

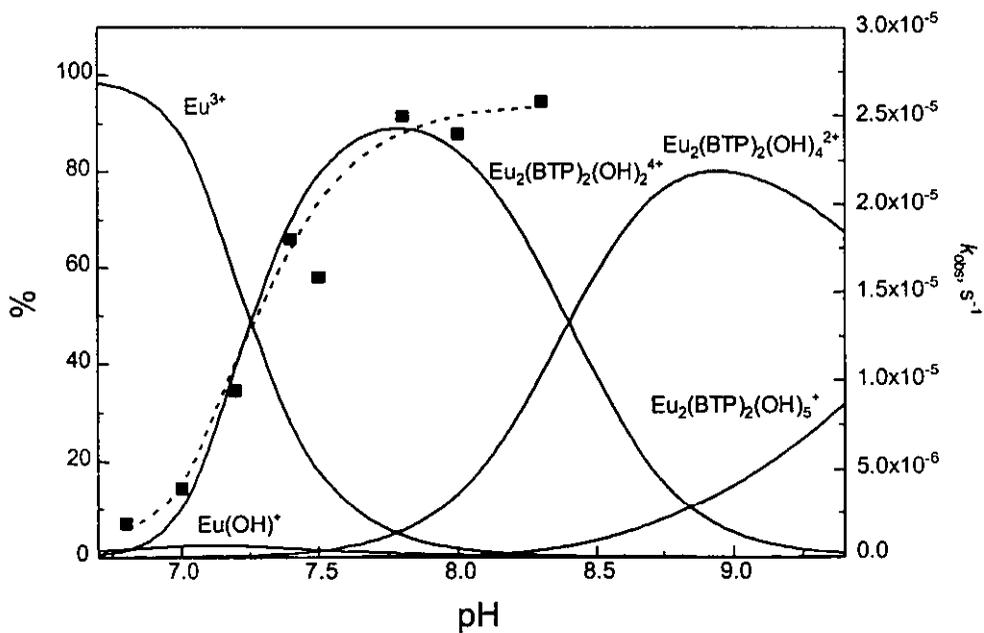


Fig.14.3d. Eu(III)

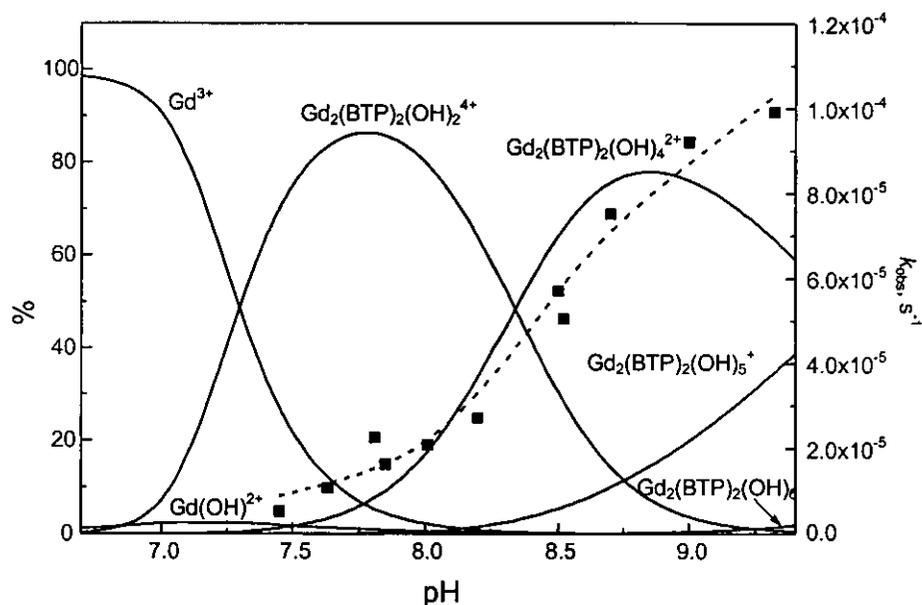


Fig.14.3e. Gd(III)

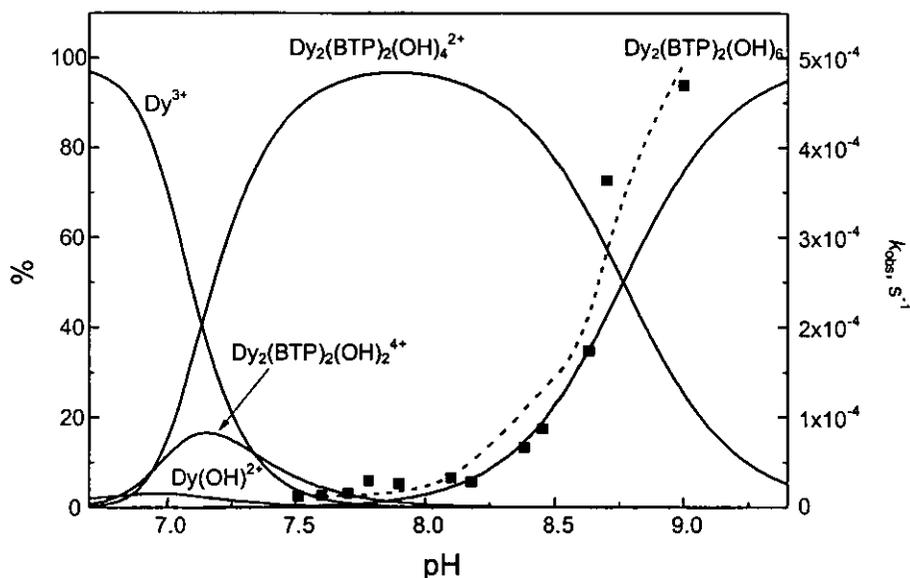


Fig.14.3f. Dy(III)

Fig.14.3. Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP a 25°C (cuadrados sólidos) y diagrama de distribución de especies para los hidroxocomplejos del esquema (13.1) para lantánidos (III) 2mM y BTP 20 mM. Las líneas punteadas son los ajustes teóricos de los perfiles de k_{obs} vs. pH calculados de acuerdo a la ecuación (14.1) y las constantes de velocidad para los hidroxocomplejos individuales dados en la Tabla 14.1.

La reactividad en la hidrólisis de BNPP, como puede verse en la Fig.14.3 se incrementa al ir de los acuoiones de Ln(III) hacia los hidroxocomplejos, como se ha observado en otros sistemas relacionados.^{62,64,66,91,104,120,127,128,135,185,192,193} También es notorio que para un metal dado la constante de velocidad observada no correlaciona con la concentración de especies únicas, pero hay algunas especies que dan una mayor contribución a la reactividad observada.

Al ir hacia los cationes más pesados de La(III) a Dy(III), se observa que, progresivamente, los complejos hidroxido dinucleares con mayor número de OH⁻ coordinado tienen una contribución mayor a la reactividad. Por tanto, el perfil de k_{obs} vs. pH para Pr(III) es muy cercano a la curva de distribución para la especie $M_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$ (Fig.14.3b) mientras que para Dy(III) este perfil se desplazó hacia la curva de distribución para la especie $M_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_6$ (Fig.14.3f). También llama la atención que hay una contribución de los complejos mononucleares monohidroxido, que se ve más claramente para las curvas Fig.14.3a,b para La(III) y Pr(III), que probablemente sean las únicas especies reactivas en los estudios reportados con acuoiones de lantánidos (III) en disoluciones neutras.¹²³

El análisis de las curvas de distribución de especies calculadas a diferentes concentraciones de metal muestra que a valores de pH entre 8.5 y 9 los complejos dinucleares constituyen más del 90% de la concentración total del metal para todos los metales cuando está por encima de 2 mM concordando con las dependencias cinéticas de primer orden para la concentración del metal observadas bajo estas condiciones. Al mismo tiempo, para La(III), Pr(III) y Nd(III) hay una contribución considerable de especies mononucleares por debajo de concentraciones 1 mM. Esto también concuerda con el cambio a segundo orden de reacción para La(III) y Nd(III) a bajas concentraciones de metal (*vide supra*), ya que están presentes las especies $M(\text{OH})^{2+}$ sin una gran contribución de hidroxocomplejos más altos. En contraste, para Pr(III), aunque la fracción de $\text{Pr}(\text{OH})^{2+}$ es casi igual que para La(III), la mayor contribución a la constante de velocidad se debe a las especies $\text{Pr}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}$ y $\text{Pr}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$.

Las constantes de segundo orden para la hidrólisis de BNPP por especies individuales fueron estimadas haciendo una regresión múltiple de la dependencia del pH de las k_{obs} de acuerdo a la ecuación (14.1):

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{M}(\text{OH})^{2+}] + k_2[\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}] + k_3[\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}] + k_4[\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_5^+] + k_5[\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_6] \quad (14.1)$$

Para ello se calcularon las concentraciones de los hidroxocomplejos a partir de las concentraciones totales conocidas del metal y BTP a cada valor de pH y estas últimas fueron empleadas como variables independientes en la ecuación (14.1).

Los valores de las constantes de velocidad resultantes k_1 - k_5 se dan en la Tabla 14.1. Las constantes de velocidad faltantes para algunas especies se omitieron porque las contribuciones de estas especies a la constante de velocidad observada, a las condiciones empleadas para los experimentos de cinética, fueron insignificantes respecto a las que se encuentran tabuladas. En algunos casos, por ejemplo, para los valores de k_1 para Eu(III) y Dy(III), las desviaciones estándar de los valores promedios calculados de las regresiones múltiples fueron muy grandes, sin embargo, la exclusión de este término estableciendo el valor de $k_1=0$ da un decremento considerable en la calidad del ajuste. Por lo tanto estos y otros valores con desviaciones estándar similares fueron incluidos en la Tabla 14.1 considerándolos como estimaciones aproximadas.

Tabla 14.1. Constantes de velocidad de segundo orden ($M^{-1}s^{-1}$) para la hidrólisis de BNPP con diferentes complejos de lantánidos (III) y BTP a 25°C.

	La(III)	Pr(III)	Nd(III)	Eu(III)	Gd(III)	Dy(III)
k_1	0.26±0.07	0.26±0.09		0.038 ^a		0.81 ^a
k_2	0.140±0.075	(3.7±1.2)×10 ⁻²	(2.5±0.2)×10 ⁻²	(1.1±0.1)×10 ⁻²	(5.6±3.0)×10 ⁻³	
k_3	0.195±0.030	(5.4±1.8)×10 ⁻²	(4.4±0.4)×10 ⁻²	(1.7±0.2)×10 ⁻²	(3.5±0.3)×10 ⁻²	2.5×10 ⁻³ ^a
k_4	0.275±0.040		3.4×10 ⁻³ ^a		(8.5±1.1)×10 ⁻²	
k_5						0.33±0.03

^a El error relativo en esta constante es de cerca del 100%, pero su exclusión lleva a un decremento sustancial en la calidad del ajuste.

La comparación de los valores k_1 - k_5 para cualquier metal muestra que entre los complejos dinucleares la reactividad se incrementa al incrementarse el número de aniones OH⁻ enlazados, aunque las especies más reactivas sean los complejos monohidroxo mononucleares. La contribución de estas especies mononucleares a la k_{obs} es pequeña, sin embargo, esto se debe a que la fracción que existe de estas especies en disolución es pequeña (ver Fig.14.3).

El incremento de la reactividad de los complejos dinucleares que tienen un gran número de aniones OH^- enlazados es una situación paralela a la observada para complejos dinucleares de Zn(II) ^{185,192} e hidroxocomplejos de La(III) con ligantes macrocíclicos:⁶² para ambos metales las especies $\text{M}_2(\text{OH})_2$ son más reactivas que los complejos $\text{M}_2(\text{OH})$. De manera similar a lo observado con el sistema BTP-Y(III), los aniones OH^- en los complejos superiores son más básicos y funcionan como nucleófilos más fuertes hacia fósforo (V).

Cuando se comparan entre sí complejos de la misma composición, pero de diferentes metales, sus reactividades decrecen al ir de La(III) a Dy(III) (ver la tendencia en los valores de k_2 , k_3 y k_4 en la Tabla 14.1, los cuales se refieren a los complejos $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}$ y $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_5^+$ respectivamente).

En esta serie el tamaño de los cationes de lantánidos decrece con un consecuente incremento en la densidad de carga y la electrofilia para los cationes más pesados. Esta situación debe verse reflejada en un decremento en la basicidad de los aniones hidróxido unidos al metal. Por tanto los complejos de los cationes más electrofílicos y aniones OH^- menos básicos poseen menor reactividad. Así para los complejos dinucleares de esta serie de metales, la basicidad de los OH^- coordinados parece ser más importante que la electrofilia de los cationes más pesados, aunque el efecto es bastante moderado.

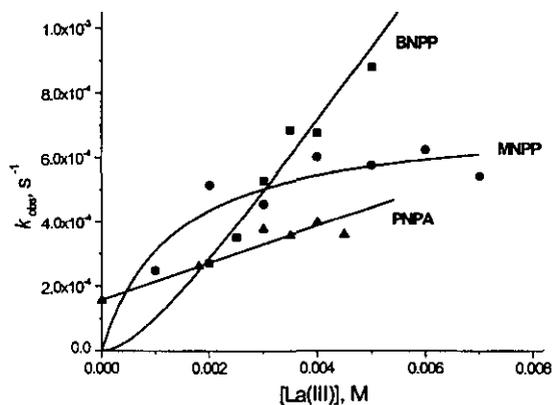
Mientras que las reactividades para los complejos $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$ y $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}$ decrecen al ir de La(III) a Dy(III) , la constante de velocidad observada de primer orden a una concentración dada y a pH cercano a 9 sigue un orden diferente: $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} < \text{Gd} < \text{Dy}$.

Esto sucede debido a que a este pH los lantánidos más pesados generan fracciones mayores de hidroxocomplejos más altos y más reactivos. Por tanto, los cationes metálicos más electrofílicos desactivan el OH^- coordinado reduciendo fuertemente su basicidad, pero este efecto de desactivación se ve compensado por la habilidad de estos cationes para formar hidroxocomplejos con mayor número de aniones OH^- coordinados al mismo centro metálico, permitiendo que cada OH^- no pierda excesivamente su basicidad.

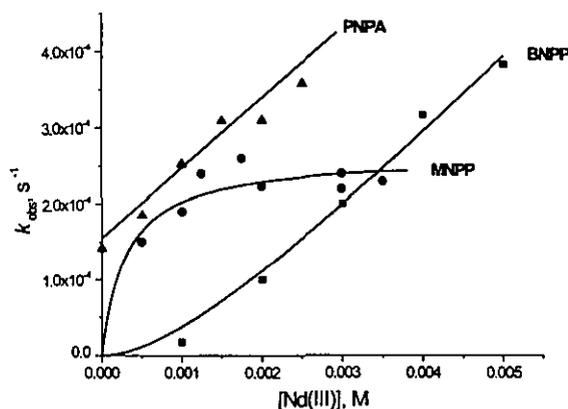
14.2. Cinética de hidrólisis de MNPP y PNPA

La hidrólisis de ambos sustratos sigue curvas cinéticas simples de primer orden en presencia de exceso de metal con respecto al sustrato. Los resultados obtenidos indican que las constantes de velocidad observadas de primer orden encontradas para la hidrólisis de MNPP, k_{obs} , concuerdan razonablemente con los valores de k_2 obtenidas del ajuste de las curvas cinéticas de hidrólisis de BNPP de acuerdo a la ecuación 7.1. (k_2 es la constante de velocidad de hidrólisis del intermediario MNPP)

Generalmente las reactividades de los hidroxocomplejos de lantánidos hacia MNPP son similares a las reactividades hacia BNPP, pero en contraste con lo encontrado para BNPP, las dependencias de k_{obs} respecto a la concentración del metal muestran en este caso un comportamiento con “saturación” ejemplificado en la Fig.14.4 para La(III) y Nd(III).



(a)



(b)

Fig.14.4. Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP, MNPP y PNPA en función de la concentración del metal: (a) La(III) en presencia de BTP 20 mM a pH 9.0; (b) Nd(III) en presencia de BTP 20 mM a pH 8.5. El ajuste mostrado para BNPP corresponde a una ecuación de segundo grado respecto al metal $k_{obs} = a [Ln(III)] + b [Ln(III)]^2$, para MNPP a la ecuación 14.2, y para PNPA a una línea recta.

Los resultados para todos los metales fueron ajustados a una ecuación tipo Michaelis-Menten, ecuación 14.2:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{C}}K_{\text{S}}[\text{M}]/(1+K_{\text{S}}[\text{M}]) \quad (14.2)$$

en donde K_{S} es la constante de formación de un intermediario complejo lantánido-sustrato, k_{C} es la constante de primer orden para la hidrólisis de MNPP dentro de este complejo (constante catalítica) y $[\text{M}]$ es la concentración total para el metal. Los valores de k_{C} y K_{S} para diferentes lantánidos a pH 9 se dan en la Tabla 14.2.

Tabla 14.2. Parámetros para la ecuación de velocidad (14.2) para la hidrólisis de MNPP por complejos de lantánidos con BTP a pH 9.0 y 25°C. ^a

	La(III)	Pr(III)	Nd(III)	Eu(III)	Gd(III)	Dy(III)	Dy(III) ^b	Dy(III) ^c
$k_{\text{C}}, \text{s}^{-1}$	7.3×10^{-4}	2.5×10^{-4}	2.9×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1.5×10^{-3}	2.6×10^{-4}	1.6×10^{-4}
$K_{\text{S}}, \text{M}^{-1}$	750	>5000	1690	1760	3500	220	530	830

^a Los errores relativos en k_{C} y en K_{S} están dentro del 20-30%.

^b pH 8.5

^c pH 8.0

Analizando tanto la constante catalítica (k_{C}) como la constante de formación del complejo intermediario (K_{S}) es claro que no muestran una tendencia regular dentro de la serie de los lantánidos. Este hecho no es del todo inesperado porque para diferentes metales existen especies diferentes que participan en la reacción a un valor de pH dado. De hecho, los parámetros de la ecuación 14.2 determinados a distintos valores de pH son significativamente diferentes. En la figura 14.5 se muestran las gráficas de k_{obs} vs. la concentración del metal para Dy(III) a diferentes valores de pH y los parámetros cinéticos del ajuste de estos resultados con la ecuación 14.2 se dan en la tabla 14.2.

Si se comparan los valores de k_{C} y K_{S} para un mismo metal a diferentes valores de pH, se observa que la constante de formación del intermediario decrece y la constante catalítica se incrementa al ir de valores de pH más bajos donde las especies más altamente cargadas predominan (Fig.14.3f). Ambas tendencias son de esperarse: la primera debido a que el dianión MNPP debe interactuar más fuertemente con las especies que exhiben una carga positiva más alta, y la segunda porque la reactividad debe ser mayor para las especies con mayor número de aniones hidroxilo coordinados por analogía con lo observado en la hidrólisis de BNPP.

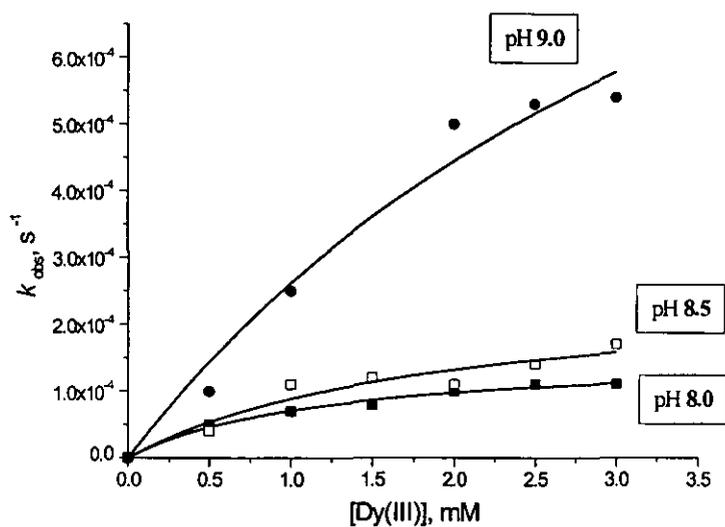


Fig.14.5. Constantes de velocidad observadas de primer orden para la hidrólisis de MNPP en función de la concentración de Dy(III) en presencia de BTP 20 mM a diferentes valores de pH.

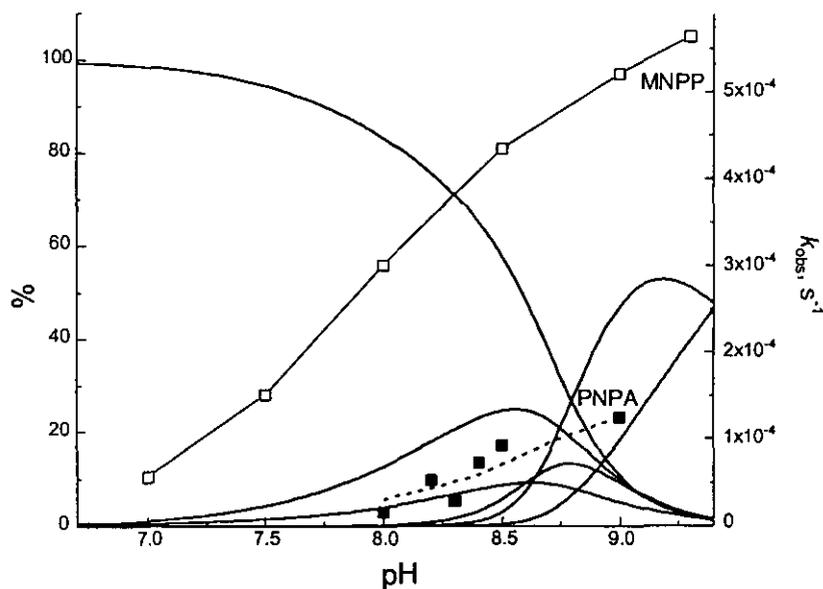


Fig.14.6. Constantes de velocidad observada de primer orden para la hidrólisis de MNPP (cuadrados vacíos) y de PNPA (cuadrados rellenos) en presencia de La(III) 2 mM y BTP 20 mM en función del pH. Las líneas sólidas son las curvas de distribución de especies (ver Fig.14.3a). La línea punteada es el perfil teórico calculado de acuerdo a la ecuación (14.1) con las constantes de velocidad para las especies individuales dadas en el texto.

Los perfiles de k_{obs} vs. pH para la hidrólisis de MNPP muestran un incremento en la k_{obs} al incrementarse el pH, como en el caso de BNPP, pero con una menor pendiente. Como ilustración de esto, se muestra la gráfica de k_{obs} vs. pH para La(III) en la figura 14.6 junto con el diagrama de distribución de especies.

Estas curvas y las curvas análogas obtenidas para los otros lantánidos no pueden ser interpretadas en términos de la ecuación (14.1) la cual implica una cinética de primer orden respecto a los complejos metálicos. Sin embargo, es posible decir que los complejos con mayor número de aniones hidroxilo unidos son más reactivos hacia MNPP, tal y como sucede en el caso de BNPP.

La observación de una cinética de saturación con MNPP para la dependencia de la concentración del metal, y de una dependencia de primer orden con BNPP con las mismas especies reactivas refleja las mejores propiedades de MNPP como ligante: siendo un dianión tiene mejores posibilidades de formar un quelato con cationes metálicos, a diferencia de la especie monoaniónica BNPP.⁶⁹ La baja afinidad de los diésteres fosfato hacia los cationes metálicos así como la mayor afinidad de los ésteres monofosfato está bien documentada.^{9,62,69,188} Por ejemplo, las constantes de estabilidad para la complejación de BNPP y $(\text{PhO})_2\text{PO}_2^-$ al complejo $\text{Cu}(\text{terpiridina})^{2+}$ tienen valores de 15.8 M^{-1} y 316 M^{-1} respectivamente.⁶²

Sin embargo, estos valores fueron determinados en un disolvente que contenía 75% EtOH, lo cual favorece la asociación iónica. Para el complejo $\text{Zn}([\text{12}]\text{aneN}_3)^{2+}$ en agua, el $\log K < 0.5$ con BNPP, en contraste con el valor de $\log K = 3.1$ con MNPP.⁶⁹ En nuestro caso, el hecho de observar una dependencia de primer orden estricto respecto a la concentración del metal para BNPP como sustrato a concentraciones de Ln(III) inferiores a 10 mM, significa que la constante de complejación debe ser alrededor de 10 M^{-1} o menor.

En la literatura se ha observado un comportamiento sin "saturación" al variar la concentración del metal para concentraciones mayores que 4 mM en la hidrólisis de BNPP en presencia de criptatos de lantánidos (III).¹⁹⁴ Sin embargo, en varios sistemas se han observado cinéticas de saturación para la ruptura de BNPP con valores de K_S reportadas en el intervalo de $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}$ ^{123,128,130,137} que son similares a las observadas en nuestro sistema con MNPP como sustrato.

Las razones por las que se observa esta afinidad inusualmente alta de los diésteres fosfato hacia los centros metálicos en estos sistemas no son claras. Sin embargo debe tomarse en cuenta que los valores calculados de la ecuación 14.2 o sus modificaciones a partir de datos cinéticos pueden ser o no iguales a las verdaderas constantes de equilibrio, ya que esta equivalencia depende de los valores de las constantes de velocidad de las transformaciones subsecuentes del sustrato unido al complejo.¹⁹⁵ Otra posible interpretación de este efecto es que, en las condiciones empleadas, pueda existir cierta autoagregación de las especies de lantánidos al incrementar la concentración total, con la formación de complejos polinucleares no reactivos y esto se refleje en un comportamiento aparente de “saturación”.

La constante observada de primer orden para la hidrólisis del éster de ácido carboxílico PNPA es una función lineal de la concentración de lantánido (III), como se ilustra en la Fig.14.4a, b para La(III) y Nd(III). Este sustrato es 10^6 veces más reactivo que BNPP frente a la hidrólisis alcalina: los valores de las constantes de velocidad de segundo orden para la hidrólisis alcalina (k_{OH}) a 25°C son $9.5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para PNPA²⁶ y $5.8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para BNPP³⁸ (ver Antecedentes). Debido a la mayor rapidez en la hidrólisis alcalina para PNPA, la contribución de la reacción espontánea a pH alrededor de 9 es muy grande para este sustrato en contraste con la hidrólisis de BNPP y MNPP para los que la hidrólisis espontánea no contribuye a la constante de velocidad observada en presencia de lantánidos, Fig.14.3a, b.

Sorprendentemente, la velocidad de hidrólisis de PNPA catalizada por lantánidos es similar a la de BNPP y MNPP. Por esto se hizo un estudio más detallado de la reacción catalizada en presencia de La(III). La figura 14.6 muestra la dependencia de la constante de velocidad observada de primer orden para la hidrólisis de PNPA en presencia de La(III) 2 mM y BTP 20 mM corregida por la velocidad de la reacción espontánea. El perfil de pH con PNPA como sustrato es similar al observado para BNPP (Fig.14.3a) y el ajuste de estos datos a la ecuación (14.1) muestra que en el intervalo de pH trabajado la mayor contribución a la velocidad observada se debe a las especies $\text{La}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{La}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_4^{2+}$ con constantes de velocidad de segundo orden de $k_1=0.37 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_3=0.092 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

De estos resultados podemos ver que en la hidrólisis de BNPP el OH^- coordinado a La(III) tiene una reactividad más alta que la hidrólisis del OH^- libre ($k(\text{LaOH})/k(\text{OH})=4.4 \times 10^4$), pero para PNPA como sustrato, la coordinación con La(III) solamente desactiva al OH^- ($k(\text{LaOH})/k(\text{OH})=0.039$). Esta comparación muestra claramente que el efecto catalítico de los lantánidos en la hidrólisis de un éster de ácido carboxílico es el resultado solamente del decremento del pK_a de las moléculas de agua coordinadas, que hace que los iones hidróxido estén disponibles a bajo pH aunque con una reactividad reducida intrínseca. En contraste, la catálisis de la hidrólisis de ésteres fosfato, involucra cierta activación del sustrato por el catión metálico.

15. Análisis del mecanismo de reacción en términos de correlaciones de Brønsted y estabilización de estado de transición.

El papel de los iones metálicos en el mecanismo de la hidrólisis de ésteres fosfato puede ser discutido en términos de tres efectos, los cuales tienen lugar en la primera esfera de coordinación del metal (activación directa):³¹

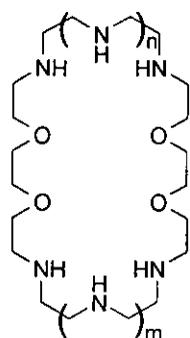
- (1) activación del sustrato como ácido de Lewis vía la coordinación de los oxígenos fosforilo al metal
- (2) activación del nucleófilo (OH^- o RO^-) vía coordinación con el metal, lo cual lleva al nucleófilo a la proximidad del grupo fosforilo
- (3) activación del grupo saliente, que involucra un decremento en el pK_a del alcohol como grupo saliente.

Los efectos primero y tercero requieren posiblemente una alta acidez de Lewis del catión metálico, lo que concuerda con el hecho de que generalmente los complejos más activos son los de los cationes metálicos con carga más alta (ver secciones 5.10 y 5.11). Sin embargo, el segundo efecto requiere que el nucleófilo conserve su reactividad, que para los sitios de reacción “duros” como lo son el carbonilo y fosforilo, generalmente correlaciona con la basicidad de Brønsted del nucleófilo. Por lo tanto, un decremento demasiado fuerte en el pK_a del ácido conjugado del nucleófilo coordinado, puede desactivarlo considerablemente y por tanto debe existir un óptimo para la actividad catalítica.

La basicidad del nucleófilo coordinado ha sido considerada como un factor importante en la reactividad de los hidroxocomplejos,^{71,128} y los resultados de este trabajo demuestran que existe una reactividad más alta de los complejos de lantánidos con hidróxidos más básicos. Por otro lado, ha sido demostrado que dentro de series de complejos de Co(III) con diferentes aminas como ligantes la reactividad en la hidrólisis de BNPP varía dependiendo de la estructura del ligante por varios órdenes de magnitud, mientras que el pK_a de la molécula de agua coordinada permanece constante.^{10,113} Por esto, la basicidad del hidróxido coordinado no puede ser el único factor que modula la reactividad, aunque tampoco puede ser ignorado.

Tabla 15.1. Constantes de velocidad de segundo orden (k) para la hidrólisis de BNPP y PNPA por hidroxocomplejos metálicos y valores de pK_a de sus ácidos conjugados. (Fig.15.1a, b)

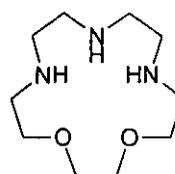
	Complejo	pK_a	Substrato	k ($M^{-1}s^{-1}$)	T, °C	Ref.
1	$[Zn(Cyclen)OH]^+$	7.9	BNPP	2.1×10^{-5}	35	104
2	$[Zn(Cyclen)OH]^+$	7.9	PNPA	0.1	25	69
3	$[Zn(N-MeCyclen)OH]^+$	7.68	BNPP	5.2×10^{-6}	35	104
4	$[Zn(N-MeCyclen)OH]^+$	7.68	PNPA	0.047	25	69
5	$[Zn([12]aneN_3)OH]^+$	7.3	BNPP	8.5×10^{-5}	35	104
6	$[Zn([12]aneN_3)OH]^+$	7.3	PNPA	0.036	25	69
7	$[Zn_2L1(OH)_2]^{2+}$	9.1	BNPP	1.15×10^{-4}	35	192
8	$[Zn_2L1(OH)_2]^{2+}$	8.64	PNPA	1.3	25	192
9	$[Zn_2L1(OH)]^{3+}$	7.08	PNPA	0.094	25	192
10	$[Zn_2L2(OH)_2]^{2+}$	9.38	BNPP	9.08×10^{-5}	35	192
11	$[Zn_2L2(OH)_2]^{2+}$	9.07	PNPA	2.0	25	192
12	$[Zn_2L2(OH)]^{3+}$	7.52	PNPA	1.16	25	192
13	$[Zn_2L3(OH)_2]^{2+}$	9.88	BNPP	5.4×10^{-5}	35	192
14	$[Zn_2L3(OH)_2]^{2+}$	9.36	PNPA	3.5	25	192
15	$[Zn_2L3(OH)]^{3+}$	7.85	PNPA	0.35	25	192
16	$[ZnL4(OH)]^+$	8.8	BNPP	1.31×10^{-5}	35	192
17	$[ZnL5(OH)]^+$	9.06	BNPP	5×10^{-5}	35	201
18	$[Zn_2L5(OH)]^{3+}$	6.94	BNPP	6×10^{-6}	35	201
19	$[Co([15]aneN_5)(OH)]^{2+}$	6.3	PNPA	9.3×10^{-3}	25	197
20	$[Co(NH_3)_5OH]^{2+}$	6.4	PNPA	1.52×10^{-3}	25	197
21	$[Cu(GlyGly)OH]^-$	9.37	PNPA	0.21	25	200
22	$[La(OH)]^{2+}$	9.33	BNPP	0.26	25	este trabajo
23	$[La(OH)]^{2+}$	9.33	PNPA	0.37	25	este trabajo
24	$[Pr(OH)]^{2+}$	8.82	BNPP	0.26	25	este trabajo
25	$[Eu(OH)]^{2+}$	8.58	BNPP	0.038	25	este trabajo
26	$[Dy(OH)]^{2+}$	8.33	BNPP	0.81	25	este trabajo
27	OH^-	15.7	BNPP	1.6×10^{-5}	37	38
28	OH^-	15.7	BNPP	2.4×10^{-5}	35	104
29	OH^-	15.7	PNPA	9.5	25	69



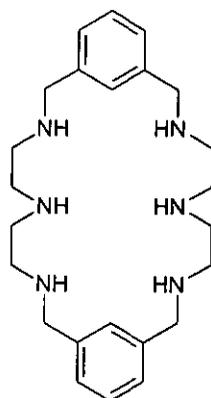
L1: $n=1, m=1$

L2: $n=1, m=2$

L3: $n=2, m=2$



L4



L5

Comúnmente, la búsqueda de una interrelación entre la basicidad y la reactividad está basada en el análisis de la correlación de Brønsted entre los logaritmos de las constantes de velocidad y los valores de pK_a de los ácidos conjugados de los nucleófilo. Estas correlaciones para las hidrólisis de PNPA y BNPP catalizadas por Zn(II) han sido discutidas en términos cualitativos.⁶⁹ En esta sección se presenta un tratamiento cuantitativo para esta serie de datos extendida en datos para Zn(II) y se incluyeron a los lantánidos (III). Los datos empleados se muestran en la Tabla 15.1.

Se ha demostrado la correlación de Brønsted con pendiente cercana a 1 para la ruptura de PNPA por nucleófilos orgánicos de diferentes tipos.²⁶ Los puntos de esta correlación general son un poco dispersos, pero cuando se consideran los nucleófilos solamente de un tipo, la correlación pasa a ser bastante buena. En particular, para los nucleófilos con oxígeno RO^- la correlación de Brønsted está dada por la ecuación (15.1).¹⁹⁶

$$\log k(RO^-) = 0.75pK_a(ROH) - 7.28 \quad (15.1)$$

Un hecho interesante es que la constante de velocidad para la ruptura de PNPA mediante complejos $[\text{Co}([\text{15}] \text{aneN}_5) (\text{OH})]^{2+}$ y $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OH}]^{2+}$ está cualitativamente en esta línea de correlación para los nucleófilos orgánicos.¹⁹⁷ La Fig.15.1a muestra los resultados para la ruptura de PNPA con 13 hidroxocomplejos de Co(III), Zn(II), Cu(II) y La(III), los cuales siguen la ecuación (15.2).

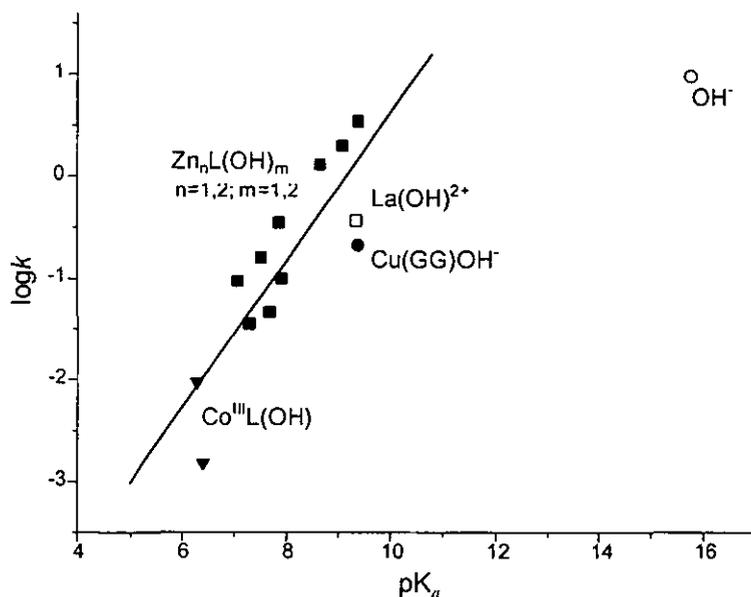
$$\log k_{(\text{M-OH}^-)} = 0.73\text{p}K_a(\text{M-OH}_2) - 6.68 \quad (15.2)$$

Los parámetros de la ecuación (15.1) son muy cercanos a los de la ecuación (15.2) y en ambos casos, el punto para el nucleófilo OH^- se desvía fuertemente en sentido negativo de la línea de los nucleófilos RO^- o M-OH^- .

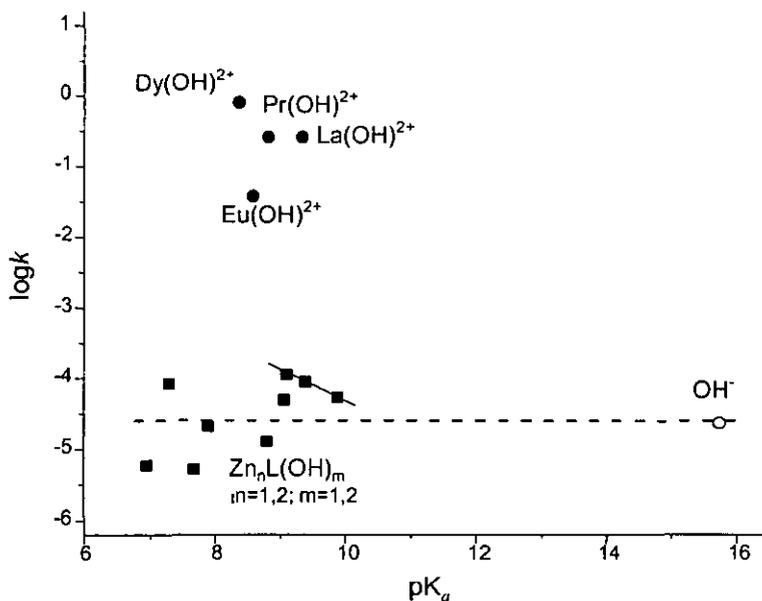
El punto para $\text{La}(\text{OH})^{2+}$ ajusta muy bien para la dependencia de los hidroxocomplejos de otros metales. Por lo tanto vemos que respecto a la hidrólisis de PNPA el La(III) se comporta como otros cationes, los cuales solamente contribuyen a reducir el $\text{p}K_a$ de las moléculas de agua coordinadas haciendo del OH^- un nucleófilo similar a los nucleófilos orgánicos con oxígeno sin ninguna activación del sustrato por el catión metálico.

Los resultados para BNPP se muestran en la Fig.15.1b. Las constantes para tres complejos dinucleares de Zn(II) con ligantes macrocíclicos de estructuras similares muestran una pendiente positiva¹⁹² (estos puntos están conectados entre sí por la línea continua en la Fig.15.1b), pero considerando todos los datos disponibles para complejos de Zn(II) uno puede ver que las constantes de velocidad para los hidroxocomplejos de Zn(II) son similares a los de OH^- indicando que la pendiente de Brønsted es cercana a cero.

Esto significa que la pérdida en reactividad de OH^- al coordinarse al metal es compensada en este caso por la activación sobre el sustrato como ácido de Lewis. Los resultados para lantánidos tienden a formar otra línea horizontal, pero a un nivel cerca de 10^4 veces mayor (nótese que las constantes de velocidad para lantánidos están a 25°C pero las constantes para los complejos de Zn(II) están a 35°C). Parece, por lo tanto, que los cationes lantánidos producen un efecto adicional, comparados con Zn(II), aunque las variaciones en la acidez de Lewis de estos cationes es relativamente insignificante.



(a)



(b)

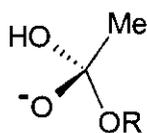
Fig.15.1. Constantes de velocidad de segundo orden para la ruptura de (a) PNPA y (b) BNPP por los complejos metal hidroxido en función del pK_a de sus ácidos conjugados. Los datos para PNPA son de las referencias 54 (complejos de Co(III)), 1a y 30 (complejos mononucleares y dinucleares de Zn(II) con ligantes macrocíclicos), 58 (Cu(GlyGly)OH⁻), este trabajo (La(OH)²⁺), y 50 (OH⁻), todos a 25°C. Los datos para BNPP son de las referencias 30, 31, 33, y 59 (para los complejos de Zn(II) y OH⁻ a 35°C) y este trabajo (Ln(OH)²⁺ a 25°C).

Una discusión de la naturaleza del efecto de activación de los lantánidos en términos de las contribuciones de activación directa arriba descritas es difícil porque requiere del conocimiento detallado de los mecanismos de las etapas elementales de la reacción catalítica. Un enfoque mecanísticamente menos demandante, ampliamente usado en la interpretación de las reacciones enzimáticas y modelos de estas reacciones,¹⁹⁸ está basado en la estimación de las constantes de estabilidad de los complejos en el estado de transición.

Las estructuras simplificadas **15-1** y **15-2** (R=4-nitrofenil) de los estados de transición para la hidrólisis alcalina de PNPA y BNPP se muestran en el esquema 15.1. Como una aproximación a la estructura real del estado de transición aquí se usan las estructuras de los aductos tetra- y pentacoordinados respectivamente, los cuales son intermediarios de alta energía en las reacciones de hidrólisis alcalina de estos sustratos.

Las constantes de velocidad conocidas para la hidrólisis alcalina y neutra de estos ésteres ($k_0 = 5.5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ para PNPA²⁶ y $1.1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ para BNPP¹⁰ a 25°C) permiten estimar los valores de pK_a de los ácidos conjugados en los estados de transición **15-1** y **15-2** (pK_a^*) de acuerdo con la ecuación (15.3):¹⁹⁹

$$\text{pK}_a^* = \log(k_0/k_{\text{OH}}) + 14 \quad (15.3)$$

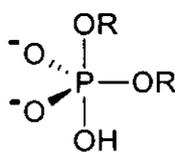


15-1

$$\text{pK}_a(\mathbf{15-1H}) = 6.8$$

$$\log K(\text{La}\mathbf{15-1}^{2+}) = 3.26$$

$$\log K(\text{Zn}_2\text{L}\mathbf{15-1}^+) = 4.50$$



15-2

$$\text{pK}_a(\mathbf{15-2H}) = 8.3$$

$$\log K(\text{La}\mathbf{15-2}^+) = 9.32$$

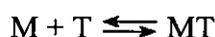
$$\log K(\text{Zn}_2\text{L}\mathbf{15-2}) = 5.58$$

$$\log K(\text{LaOH}^{2+}) = 4.67$$

$$\log K(\text{Zn}_2\text{L}\text{1OH}) = 5.36$$

Esquema 15.1

Los valores resultantes de pK_a^* dados en el esquema 15.1 muestran que los estados de transición para estas reacciones tienen basicidades semejantes. Siguiendo el mismo enfoque que para la derivación de la ecuación (15.3),¹⁹⁹ es posible obtener fácilmente la expresión para la constante de estabilidad del complejo (K_{MT}^*) con el metal (M) en el estado de transición (T), la cual se refiere al equilibrio:



en la forma:

$$\log K_{MT}^* = \log(k_{(M-OH^-)}/k_{OH}) + 14 - pK_a(M-OH_2) \quad (15.4)$$

Usando el valor de k_1 , equivalente a $k_{(M-OH^-)}$ en la ecuación (15.4) para La(III) de la Tabla 15.1 para BNPP y $k_1=0.37 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para PNPA junto con el valor dado de k_{OH} para estos sustratos uno obtiene la constante de estabilidad para los complejos de La(III) en el estado de transición con los sustratos 15-1 y 15-2 dados en el esquema 15.1. Este esquema muestra además las constantes de asociación para 15-1 y 15-2 con el complejo dinuclear de Zn(II) $[Zn_2L1(OH)]^{3+}$ (en donde L1 es un éter azo-corona) las cuales corresponden al complejo $[Zn_2L1(OH)_2]^{2+}$, que es el complejo de Zn(II) que tiene la reactividad más alta en la hidrólisis de BNPP entre todos los complejos reportados para Zn(II) hasta la fecha. (Las constantes de velocidad para la hidrólisis de BNPP y PNPA para $[Zn_2L1(OH)_2]^{2+}$ son iguales a 1.15×10^{-4} y $1.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 35°C y 25°C respectivamente, los valores de pK_a de los ácidos conjugados son de 9.1 y 8.64 a 35°C y 25°C respectivamente).¹⁹²

En términos de la ecuación (15.4) para este sistema se considera $[Zn_2L1(OH)_2]^{2+} = M-OH$ y $[Zn_2L1(OH)]^{3+} = M-OH_2$. Para comparación, en el esquema 15.1 se incluyen también las constantes de asociación de La(III) y $[Zn_2L1(OH)]^{3+}$ con OH^- a 25°C . La constante para el estado de transición de 15-1 con el complejo de Zn(II) es mayor que para La(III) en concordancia con la mayor afinidad del primero hacia el OH^- . Como era de esperarse, para ambos metales, la afinidad para la estructura menos básica 15-1 es menor que para OH^- . Con el estado de transición dianiónico 15-2 para ambos metales las constantes de estabilidad llegan a ser mayores que con el monoanión 15-1, pero para Zn(II) el incremento en K_{MT}^* es solamente de 10 veces mientras que para La(III) es del orden de 10^6 veces. Una razón posible para esta diferencia es que el dianión 15-2 en contraste con el monoanión 15-1 puede interactuar como un ligante bidentado, pero con un tamaño de anillo quelato muy pequeño, lo cual favorece a los metales de mayor tamaño.⁶¹

A diferencia de la reactividad esterolítica y fosfoesterolítica de los hidroxocomplejos metálicos, para los que el ion metálico tiene un papel fundamental en la activación del sustrato, la contribución principal del incremento en la reactividad esterolítica frente a PNPA observada para iones oximato como nucleófilos, proviene del decremento del pK_a de la oxima inducido por coordinación con iones metálicos: la fracción del nucleófilo coordinado es mayor a valores de pH cercanos a la neutralidad respecto a la reactividad de las oximas libres.

El análisis en términos de Brønsted de la reactividad de iones oximato en la ruptura de PNPA muestra que para los iones oximato libres y coordinados (Fig.15.2) cuyos valores de pK_a son menores a 8, es similar: existe una fuerte relación entre su basicidad y su nucleofilia denotada por una pendiente cercana a 1 en estas coordenadas. Esto se debe a que el pK_a de las oximas libres disminuye fuertemente por coordinación y desplaza al ion oximato libre de la zona de nivelación en reactividad, hacia la zona dependiente del pH.

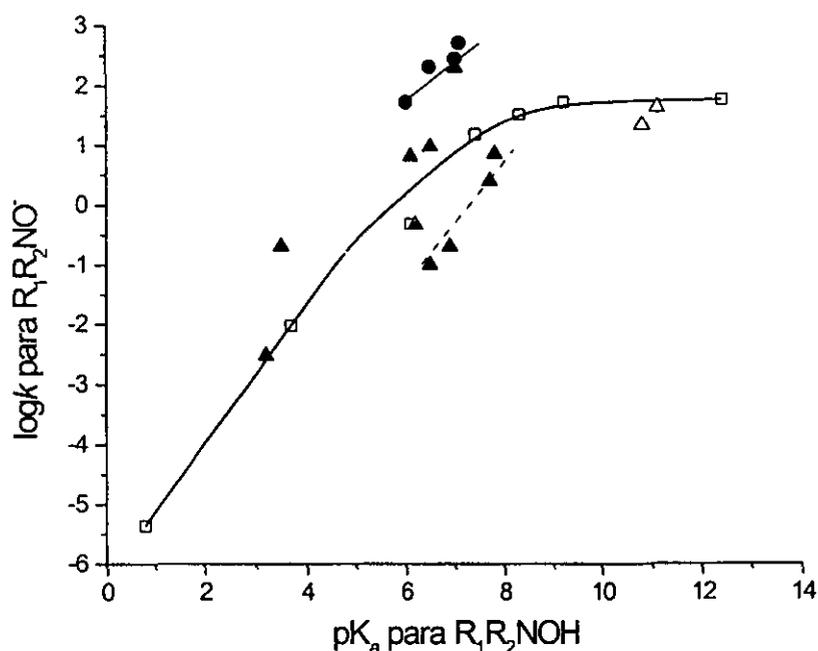


Fig.15.2. Constantes de velocidad de segundo orden de la ruptura de PNPA por aniones oximato libres y coordinados en función del pK_a de sus ácidos conjugados. Los cuadrados vacíos son los datos para oximatos libres de la figura 3.1 y la línea continua muestra la tendencia de estos valores. Los datos de los complejos oximato son de la tabla 15.2: los triángulos rellenos son los complejos de Cu(II) y Zn(II) con los ligantes 15-3 a 15-6, los triángulos vacíos son los ligantes 15-3 y 15-4, y los círculos rellenos son los complejos con el ligante 15-7.

Es importante mencionar que para nucleófilos coordinados pertenecientes a una misma familia de oximas también se observa una contribución adicional a la reactividad, de 1-2 órdenes de magnitud, que no se deben a la disminución del pK_a de la oxima. La naturaleza de esta reactividad, superior a la del oximato libre, posiblemente es la suma de una contribución debida al ligante (efectos electrónicos y restricciones geométricas)⁸⁴ y a la interacción del ion metálico con el sustrato en el estado de transición (*Esquema 9.2*).¹⁸³ En la figura 15.2 se muestran estos efectos como desviaciones positivas de la reactividad de los iones oximato no coordinados (puntos conectados por la línea continua). Hay que mencionar que la suma de estas contribuciones también puede dar lugar a un efecto negativo (puntos conectados por línea discontinua) respecto a la reactividad de oximatos libres.

Tabla 15.2. Constantes de velocidad de segundo orden (k) para la hidrólisis de PNPA por aniones oximato libres y coordinados y valores de pK_a de sus ácidos conjugados de Ref.84. (Fig.15.2)

Complejo oximato ^a	pK_a	$k_2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Cu 15-6	3.2	0.003
Cu 15-3	3.5	0.2
Ni 15-3	6.1	6.5
Ni 15-4	6.2	0.46
Ni 15-6	6.5	0.1
Zn 15-4	6.5	9.4
Ni 15-5	6.9	0.2
Zn 15-3	7.0	200
Zn 15-6	7.7	2.5
Zn 15-5	7.8	7.1
15-3	10.8	22
15-4	11.1	45.2
Zn 15-7 ^b	6	53.5
Pb 15-7 ^b	6.5	207
Mn 15-7 ^b	7.0	283
Cd 15-7 ^b	7.1	518

^a Ver estructuras 15-3 a 15-7 en la página siguiente

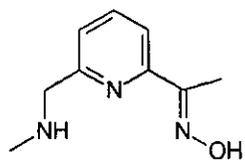
^b Ref.183, Tabla 9.1

Estructuras de la tabla 15.2

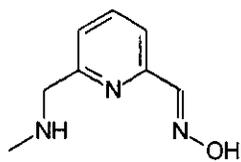


15-3

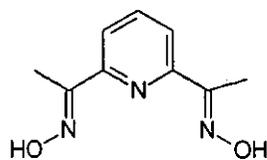
15-4



15-5



15-6

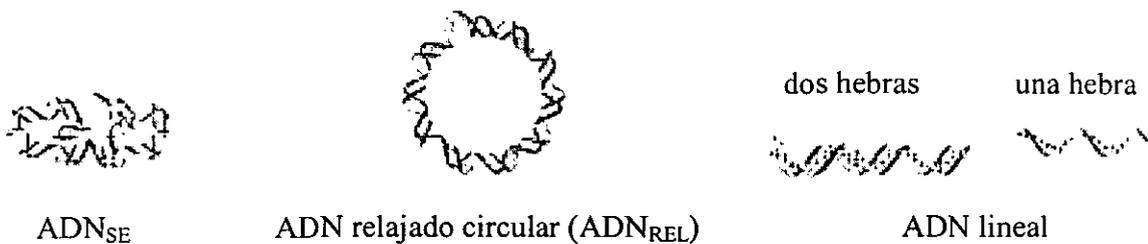


15-3

16. Ruptura de ADN superenrollado

Como se expuso en las secciones 9 y 14, se encontró que los sistemas OXDAP/M(II) y el sistema BTP-Ln(III) tienen una gran reactividad fosfodiesterolítica, por lo tanto se consideró que podían ser aplicados en la ruptura de uno de los fosfodiestéres más estables que se conocen, el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Se trabajó con el plásmido pcDNA-3 que funciona como vector de expresión en células eucariontes y que es un ADN circular de alrededor de 5.4 Kb para el que aproximadamente el 70% se encuentra en forma superenrollada y el restante 30% está repartido entre sus formas lineal y circular (esquema 16.1). La ruptura de una hebra del ADN superenrollado (ADN_{SE}), permite que la molécula de ADN pase a una forma más relajada circular (ADN_{REL}); la ruptura de dos hebras del ADN_{REL} lo lleva a la forma lineal de dos hebras. Estas tres formas de dos hebras tienen diferente velocidad de desplazamiento electroforético en los geles de agarosa: la forma superenrollada se desplaza más rápidamente seguida de la lineal y finalmente la forma relajada circular, lo cual permite su separación, identificación y cuantificación. La ruptura de ADN lineal de dos hebras produce fragmentos (también lineales de una y dos hebras) que tienen pesos moleculares mucho menores y su desplazamiento puede ser tan rápido a través de los geles, que raramente siempre es posible observar estas bandas mediante una electroforesis simple.



Esquema 16.1

Para obtener el plásmido pcDNA-3, se rompieron bacterias transformantes de *Escherichia coli* clonadas en donde se había multiplicado este plásmido, se separó la fracción de ácidos nucleicos y ésta última se purificó mediante procedimientos estandarizados (QUIAGEN Plasmid Purification System, cromatografía en columna). Se obtuvieron aproximadamente 150 μ L de ADN purificado que constituyó la muestra patrón a partir de la cual se realizaron todos los experimentos.

El ADN de la muestra patrón se cuantificó mediante espectroscopía UV-visible midiendo, en una muestra diluida ~1:400 de la disolución original, la relación de la intensidad de absorción de dos diferentes bandas para proteínas: una a 260 nm en donde predominantemente se observan ácidos nucleicos y otra a 280 nm donde aparecen varias clases de proteínas; de esta forma, se puede saber qué proporción de la fracción purificada contiene ácidos nucleicos. La relación que se emplea para cuantificar el ADN es:²⁰²

$$Abs_{260} \left(\frac{factor\ dilucion}{20} \right) = \frac{\mu g \cdot ADN}{\mu L}$$

De acuerdo a la purificación lograda, se considera que el ADN obtenido tiene una excelente pureza si:²⁰²

$$\frac{Abs_{260} ADN}{Abs_{280} proteínas} \geq 1.8$$

Los resultados obtenidos de este análisis para la muestra patrón de ADN fueron $A_{260} = 0.0929$, $A_{280} = 0.0682$, lo que permite estimar una concentración de $1.86 \mu g/\mu L$ de ADN con una relación de pureza media (1.36).

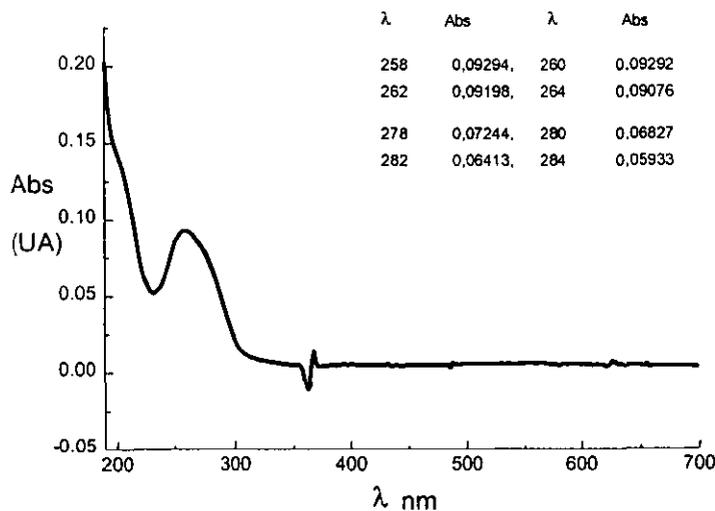
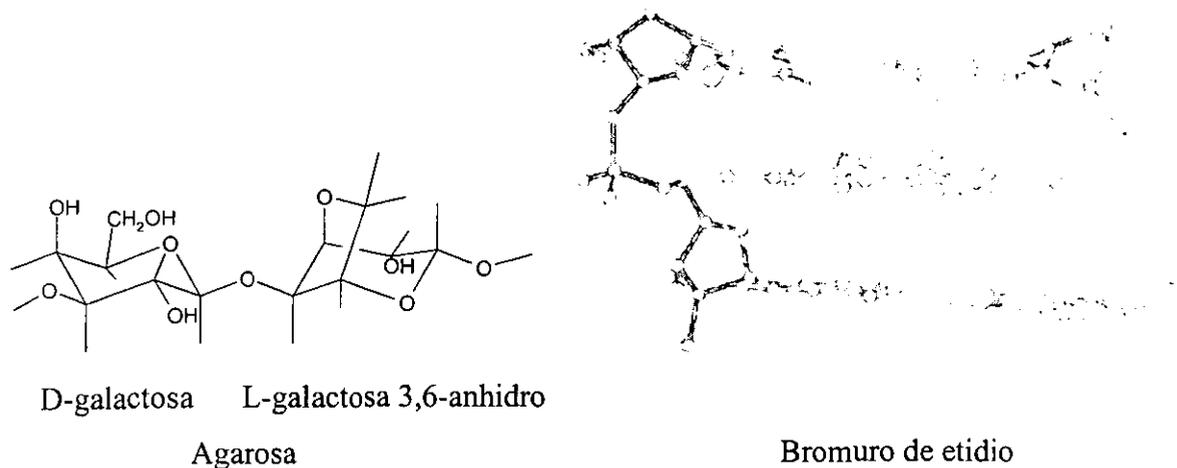


Fig. 16.1. Cuantificación de pcDNA-3 patrón: Concentración = $1.86 \mu g/\mu L$, Pureza = 1.36, $A_{260} = 0.0929$, $A_{280} = 0.0682$.

Los experimentos para medir la hidrólisis de ADN se realizaron en exceso de metal y ligante respecto a la concentración del sustrato. Una muestra típica se preparó de la siguiente forma. Se colocaron 20 μL de disoluciones con pH ajustado que contenían OXDAP/M(II) (10 y 10 mM respectivamente, Tris como amortiguador) o BTP/Ln(III) (18.6 y 1 a 12 mM respectivamente) en tubos eppendorf y al iniciar una corrida, se les adicionó 1.5 μL del pcDNA3 diluido de forma que la concentración de plásmido en cada muestra fue de *ca.* 2×10^{-4} mM. Se incubaron series de ocho muestras a temperatura constante, y a diferentes tiempos (0, 20, 40, 60, 120 y 150 min) fueron congeladas (-20°C) para inhibir su hidrólisis. En estas series se incluyeron dos muestras control (20 μL de amortiguador al mismo pH con 1.5 μL de ADN diluido) que se incubaron 0 y 150 min para comprobar que en ausencia de complejos el ADN no sufre deterioro por efecto de la temperatura.

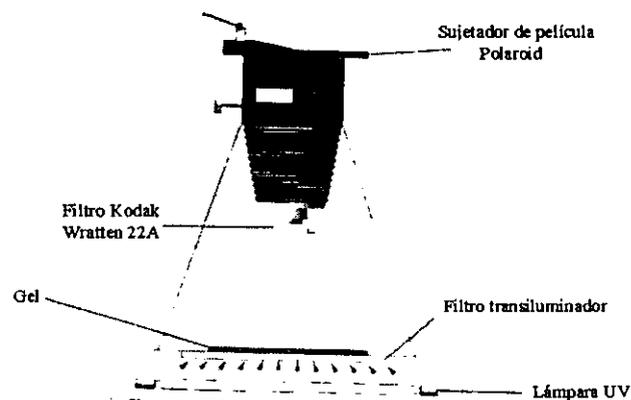
Las diferentes formas de ADN se separaron mediante electroforesis para cuantificarlas. La separación electroforética se hizo en una minicámara horizontal (Horizon 58 de GIBCO, BRL para geles de aproximadamente 8×5 cm) con una fuente de voltaje Bio-RAD Power/PAC 3000. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1% (las cadenas de agarosa forman fibras helicoidales y como geles pueden emplearse como mallas moleculares tridimensionales cuyos diámetros varían entre 50-200 nm); la agarosa al 1% permite separar fragmentos de ADN de 250 a 12,000 pares de bases. Los geles contenían 0.5 $\mu\text{L}/100$ mL de una disolución de bromuro de etidio 10 mg/mL como indicador fluorescente. El bromuro de etidio se intercala en la molécula de ADN y permite determinar mediante fluorescencia el ADN (*Esquema 16.2*).



Esquema 16.2

Al depositar las muestras de ADN en los pozos del gel se usó el indicador azul de bromofenol al 0.25% para teñir el ADN. Este último indicador cumple dos funciones importantes: por un lado simplifica el proceso de cargado del gel, ya que es notoriamente visible si la muestra de ADN permanece en el pozo del gel o se disuelve en el amortiguador, y por otro lado incrementa la densidad de la muestra de ADN para asegurar que sea depositada en el pozo del gel. Además, el azul de bromofenol no interfiere con el desplazamiento del ADN ya que migra en los geles de agarosa en amortiguador TBE (Tris, ácido bórico, EDTA) aproximadamente a la misma velocidad que el DNA lineal de doble cadena de ~ 300 bp;²⁰² esto implica que generalmente ha recorrido todo el gel y se ha incorporado a la disolución del amortiguador para cuando aparece como banda el ADN que se desea observar.

Para preparar los geles de agarosa y como disolución amortiguadora en electroforesis se empleó amortiguador TBE 1X (Tris 100 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 1 mM). Las corridas de electroforesis se realizaron a pH 8.4. Los geles obtenidos se fotografiaron (Película Polaroid Polapan 667 ISO 3000) sobre un transiluminador de luz ultravioleta (254 o 366 nm) para registrar la fluorescencia del ADN, esquema 16.3. Posteriormente las fotografías de los geles se digitalizaron con un equipo AMBIS/Fotodyne con el fin de cuantificar las bandas de los diferentes tipos de ADN.



Esquema 16.3

Las condiciones de concentraciones de agarosa, bromuro de etidio, concentración de sustrato pcDNA, amortiguador para el gel de electroforesis, así como los factores de intensidad de corriente y tiempo de corrido electroforético, fueron optimizadas al inicio de este estudio, de forma que se obtuvieran bandas definidas en tiempos de ~ 2 horas, con el nivel adecuado de fluorescencia necesario para lograr buenas fotografías y cuantificación de los fragmentos de ADN en los geles.

Los geles muestran cambios en la intensidad de las bandas de ADN en función del tiempo, en particular la banda de ADN_{SE} (banda inferior Fig. 16.2) experimenta una disminución en la intensidad de fluorescencia de inicial, y la banda de ADN_{REL} un incremento, mientras que la banda del ADN control permanece inalterada. Esto muestra que existe una ruptura de la forma superenrollada en función del tiempo.

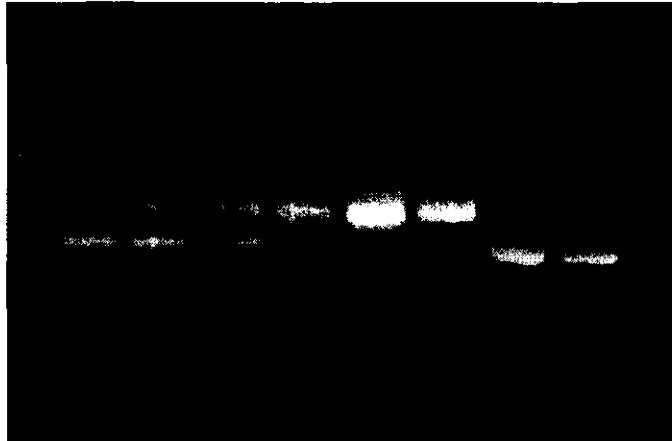


Fig.16.2. Fotografía de gel de electroforesis. Cada carril vertical muestra dos tipos de ADN: en la banda superior la forma relajada (ADN_{REL}) y en la banda inferior la forma superenrollada (ADN_{SE}). En secuencia horizontal se observa la misma muestra de DNA a diferentes tiempos de incubación en presencia de BTP 18.6 mM, La^{III} 4.65 mM. De izquierda a derecha: 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min y 150 min, y en la extrema derecha los controles de ADN en H₂O y en amortiguador incubados por 150 min a 37°C.

La digitalización de esta disminución en la intensidad de fluorescencia para una misma banda de ADN permite su cuantificación en forma de histograma, Fig.16.3, empleando en el equipo AMBIS el programa RFLPscan® 1994 de *Scanalytics*. Es importante mencionar que el empleo de esta forma de cuantificación de ADN requiere de bandas muy claras y bien separadas en los geles.

La ruptura de ADN_{SE} en presencia de los complejos de iones metálicos con OXDAP se estudió a 37°C en presencia de la mezcla 1:1 de 10 mM de sal metálica y del ligante a pH 7.0. Para Ni(II), Co(II), Zn(II) y Cd(II) las constantes de velocidad fueron $<1 \times 10^{-6}$, $<1 \times 10^{-6}$, 1.5×10^{-6} , $8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. En el caso de Cu(II) se observó la ruptura muy rápida ($k_{\text{obs}} > 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), sin embargo la ausencia de actividad catalítica del complejo Cu(II)-OXDAP en la hidrólisis de BNPP indica que en este caso la ruptura es del tipo oxidativo. Así, la actividad de los complejos de OXDAP es del orden observado para algunos complejos de Cu(II) y Co(III) menos activos, ver Tabla 16.2.

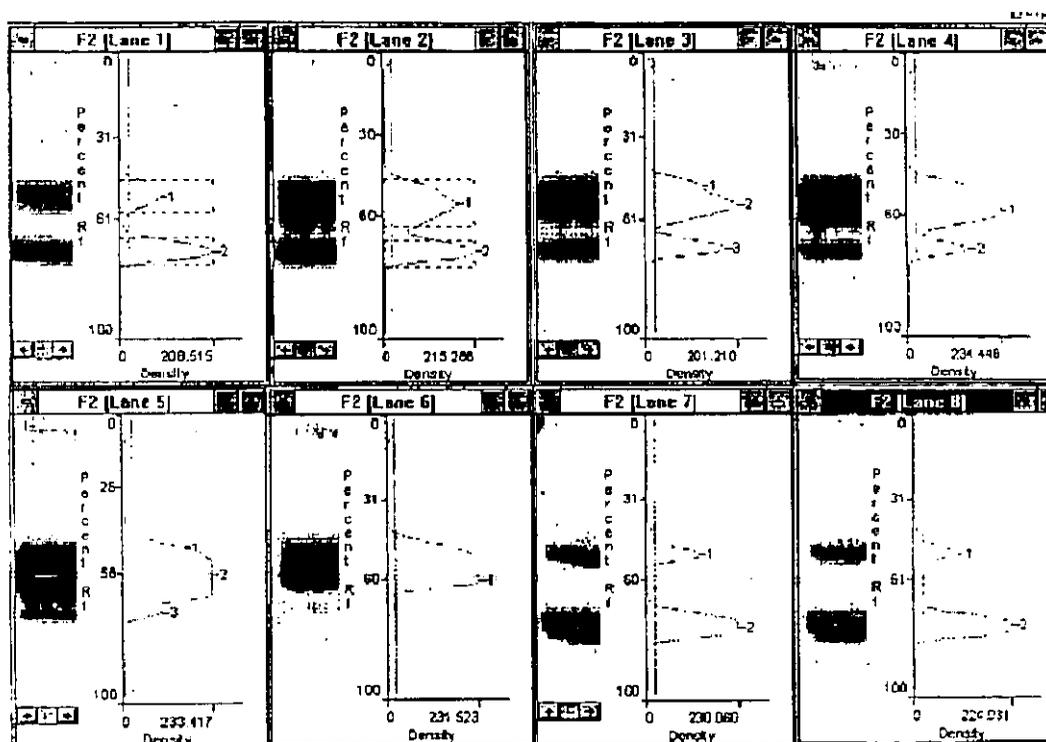


Fig. 16.3. Ejemplo de digitalización de las fotografías de los geles. Las bandas del ADN_{SE} y ADN_{REL} fueron cuantificadas a partir de imágenes fotográficas generándose curvas del % de densidad de cada una de las bandas.

Para el sistema BTP/Ln(III) fue posible obtener las constantes de velocidad observadas a partir de los porcentajes de ADN_{SE} y ADN_{REL} circular en función del tiempo. Los datos de las curvas cinéticas obtenidas para ADN_{SE} se ajustaron a ecuaciones integrales de primer orden (Fig. 16.4).

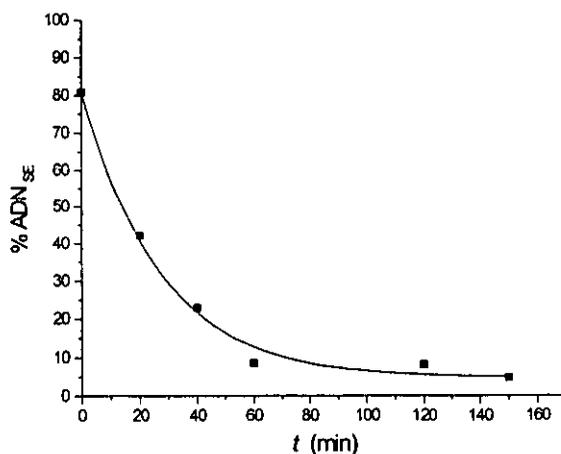


Fig. 16.4. Hidrólisis de ADN_{SE} en presencia de La(III) 9.3 mM, BTP 18 mM, 37°C.

Se estudió la dependencia de la concentración de La(III) en presencia de BTP a pH 8.5. Las constantes de velocidad observadas de primer orden se resumen en la tabla 16.1.

Tabla 16.1. Hidrólisis de ADN en presencia de BTP-La(III), (BTP 18.6 mM, T= 37° C y pH=8.5)

[La ³⁺] mM	k_{obs} (s ⁻¹)
1.86	3.25×10^{-4}
4.65	3.20×10^{-4}
6.5	3.37×10^{-4}
7.9	3.32×10^{-4}

De los experimentos anteriores resulta claro que existe una ruptura del ADN_{SE} por los complejos de BTP/Ln(III). Sin embargo, no se observa una dependencia del metal en el rango de 2-8 mM, por lo que puede suponerse que se satura rápidamente (Fig.16.5, cuadrados vacíos). Otro aspecto que llama la atención es que como la ruptura no es específica, se esperaría que se formaran fragmentos de varios tamaños. Sin embargo, en estas condiciones solamente se observa la desaparición de la banda del ADN_{SE} y la aparición de una forma más relajada, ADN_{REL} en función del tiempo.

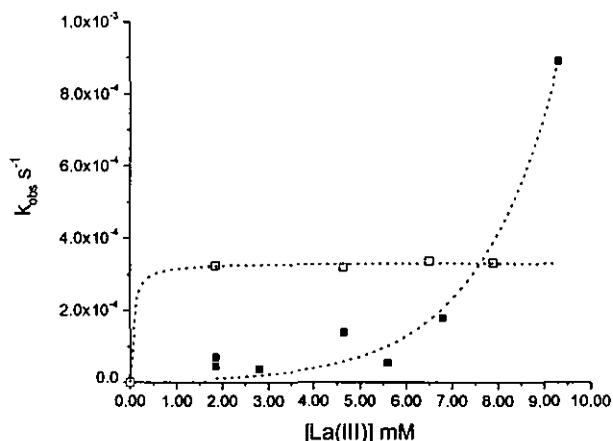


Fig.16.5. Dependencia de la concentración de La(III) en la hidrólisis de ADN en presencia de BTP (BTP 18.6 mM, pH=8.5, 37°C). Electroforesis con EDTA 1 mM (cuadrados abiertos), EDTA 10 mM (cuadrados rellenos). Las líneas punteadas representan la tendencia de los datos. Las constantes son promedios de 4 valores y la desviación estándar es $\leq 10\%$.

Debido a que el ADN es un polianión de fosfatos, hay altas probabilidades de que los cationes metálicos empleados para su ruptura se coordinen a la molécula. Como los fragmentos

más grandes de ADN tienen más grupos fosfato, resulta lógico pensar que la coordinación de algunos iones metálicos no afecta sus propiedades de carga mediante la cual se desplaza a través del gel, sin embargo, por la misma razón esta situación afectaría en mayor proporción a los fragmentos pequeños de ADN lineal que pudieran formarse de la hidrólisis neutralizándolos parcialmente e impidiéndoles desplazarse a través del gel.

Por esto, para tratar de observar la presencia de ADN lineal, y comprobar el grado de ruptura que se logra con el sistema BTP/Ln(III), se incrementó la concentración de EDTA del amortiguador hasta 10 mM con el fin de acomplejar los cationes metálicos adicionados, y se cambió el voltaje al correr el gel para permitir que el ADN lineal apareciera en el gel. Se comprobó que la adición de EDTA al amortiguador TBE 1X empleado no le confiere ninguna actividad hidrolítica ni afecta la separación de las bandas antes observadas en los geles a valores de pH entre 8.3-8.5.

Este cambio permite la separación de la tercera forma de ADN y en consecuencia, se aprecian más claramente las otras dos bandas de ADN: superenrollado y circular. (Fig.16.5, cuadrados rellenos, Fig.16.6).

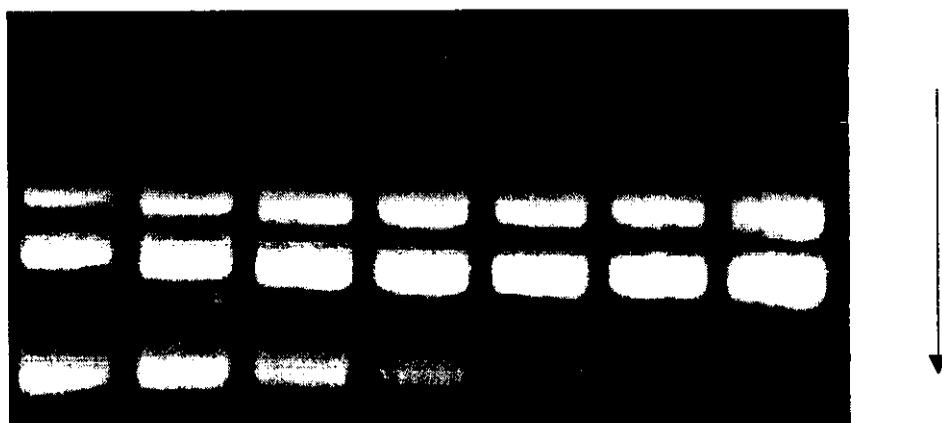


Fig.16.6. Gel de electroforesis corrido en amortiguador TBE 1X con EDTA 10 mM. Cada carril vertical muestra tres tipos de ADN: en la banda superior el circular, en la banda de en medio el lineal y en la banda inferior el ADN superenrollado. En secuencia horizontal se observa la misma muestra de ADN a diferentes tiempos de incubación en presencia de BTP 18.6 mM, La(III) 7.9 mM. De izquierda a derecha: control, 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min y 150 min.

Los resultados de la dependencia de la concentración de La(III) realizados bajo estas condiciones muestran resultados muy diferentes (37°C, pH 8.5, 18.65 mM BTP, 10 mM EDTA). La tendencia observada en la curva, pese a la dispersión de los datos, muestra un orden mayor a 1 respecto al metal. Se observó un comportamiento similar con Y(III) en la cinética de hidrólisis de

BNPP (sección 11.1). Debido a que las muestras de ADN se incubaron de la misma forma que las anteriores, y la diferencia encontrada se debe a la forma de realizar las electroforesis de las muestras, es posible que este efecto se deba a que el ADN lineal estaba migrando a la misma velocidad que el ADN_{SE} y no permitía una separación adecuada de las bandas, y por lo tanto una cuantificación digital correcta ya que esta última considera el total de la intensidad de banda inicial como 100% de ADN_{SE}.

Los valores de las constantes de velocidad observadas de primer orden de este trabajo, $\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, son comparables con las de los mejores sistemas reportados para ruptura de este tipo de ADN en sistemas con complejos (Tabla 16.2), por lo que podemos decir que nuestro sistema tiene una muy buena reactividad frente a ADN_{SE}.

Tabla 16.2. Hidrólisis de ADN superenrollado catalizada por complejos.^a

Sistema	Hidrólisis de ADN _{SE} k_{obs} (s^{-1})	Condiciones	Ref.
sin catálisis	$\leq 10^{-11}$		44
$[(\text{en})_2\text{Co}(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$	$\ll 10^{-6}$	pUC9 23 μM , complejo 1 mM, 37°C, pH 7.6	206
$[(\text{ciclen})\text{Co}(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$	1×10^{-5}	pUC9 23 μM , complejo 1 mM, 37°C, pH 7.6	206
$[(\text{tamen})\text{Co}(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$	5×10^{-5}	pUC9 23 μM , complejo 1 mM, 37°C, pH 7.6	206
$[\text{Cu}([\text{9}]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2]$	$\sim 1.4 \times 10^{-5}$ ^b	plásmido pBluescript II ks(-), 50°C, pH ~ 7.0	95 207
Eu(III)	7×10^{-5}	ADN plasmídico, Eu(III) 2.5 mM, 37°C, pH 7.0	131
Eu(III)/glicerol	$\sim 2 \times 10^{-4}$	ADN plasmídico, Eu(III) 0.5 mM, glicerol 5 mM, 37°C, pH 7.0	131
BTP-La(III)	3.3×10^{-4}	pcDNA, La(III) 8 mM, BTP 18.6 mM, 37°C, pH 8.5	^c
<i>cis,cis</i> -1,3,5-triamino ciclohexano Cu(II)	1.2×10^{-3} ^d	fago ϕx174 RFI (ADN), pH 8.1, 35°C	207
Neamina-Cu(II)	5.1×10^{-4} ^e	pT7-7 (ADN), complejo 0.2 mM, pH 7.3, 35°C.	208

^a Constantes de velocidad observadas en exceso de complejo sobre el ADN_{SE} como sustrato.

^b Estimada del tiempo de vida media

^c Este trabajo

^d Probablemente hay una contribución notable de la ruta oxidativa ya que el complejo reportado tiene muy baja reactividad catalítica en la hidrólisis de (2,4-dinitrofenil)etil fosfato.

^e Calculada como k_{obs} a saturación (V_{max}) de una curva tipo Michaelis-Menten.

Para obtener evidencia de las especies esterolíticamente activas, presumiblemente los hidroxocomplejos de lantánidos(III) con BTP, se hicieron varios intentos por estudiar la dependencia de la constante de velocidad observada en función del pH (La(III) 1.86 y 4.65 mM, BTP 18.6 mM, pH 8.5, 37°C). Desafortunadamente no fue posible realizar la cuantificación del ADN en geles electroforéticos de los experimentos realizados variando el pH, ya que al cambiar el pH las propiedades eléctricas de la disolución se modifican; esto causa que la migración del ADN en el gel no sea homogénea e impida la resolución de las bandas. En la figura 16.7 se muestra el ejemplo de un gel de electroforesis para el que las muestras se trabajaron a las mismas condiciones de la figura 16.2 pero a pH 9.1.



Fig.16.7. Ejemplo de hidrólisis de ADN en presencia de BTP 18.6 mM y La^{III} 4.65 mM a pH 9.1. De izquierda a derecha: control a 0 min, 0 min (no se observa), 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 150 min y control incubado 150 min (ADN control: BTP 18.6 mM a pH 9.1)

Otro parámetro importante del sistema es la energía de activación observada que nos permite comparar con otros sistemas el proceso de hidrólisis y nos da el comportamiento térmico del sistema. En presencia de lantano (III) y BTP se estudió la dependencia de la constante observada de primer orden respecto a la temperatura (Fig.16.8). Se encontró una tendencia esperada ya que se incrementa conforme aumenta la temperatura: a 25.0 °C $k_{obs} = 8.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, a 37.0°C $k_{obs} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y a 70.0°C $k_{obs} = 4.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (BTP 18.6 mM, La³⁺ 4.65 mM y pH=8.5). Esta dependencia permitió estimar, dentro de un error del $\pm 30\%$, la energía de activación para el proceso en 30 KJ/mol. Este valor es cercano al valor encontrado, con este mismo sistema, para el fosfodiéster BNPP (55 KJ/mol)²⁰⁹ y concuerda con el hecho de que el ADN_{SE} es un sustrato activado.⁶⁷

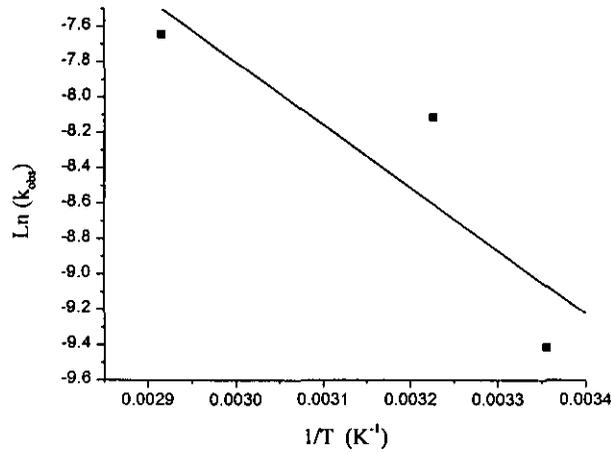


Fig.16.8. Dependencia de la temperatura en la hidrólisis de ADN por el sistema BTP/La(III) (BTP 18.6 mM, La³⁺ 4.65 mM y pH=8.5). La línea sólida representa el ajuste lineal para estos tres puntos. Las constantes son promedios de 4 valores y la desviación estándar es ~30%.

También se observó un efecto catalítico en la hidrólisis de ADN en presencia de otros lantánidos para el sistema BTP/Ln. La comparación para diferentes lantánidos (BTP 18.6 mM, Ln(III) 4.65 mM, 37°C, pH 8.5, Fig.16.9 a–d) muestra la misma tendencia en las constantes de velocidad observadas para el sustrato sintético BNPP. Los valores de las k_{obs} relativas para algunos de estos metales son:

	Eu(III)	Nd(III)	Pr(III)	La(III)
k_{obs} relativa	0.11	0.47	0.83	1

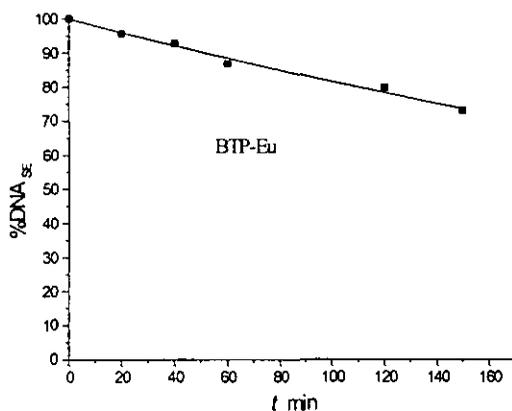


Fig.16.9 (a)

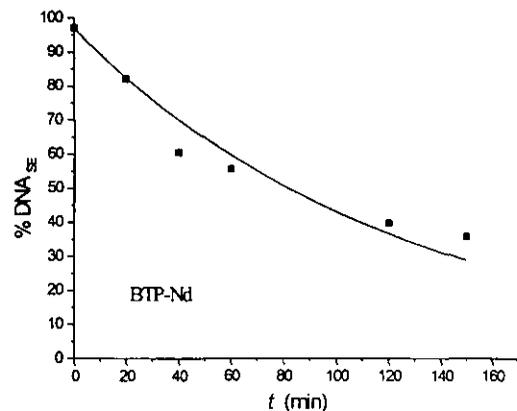


Fig.16.9 (b)

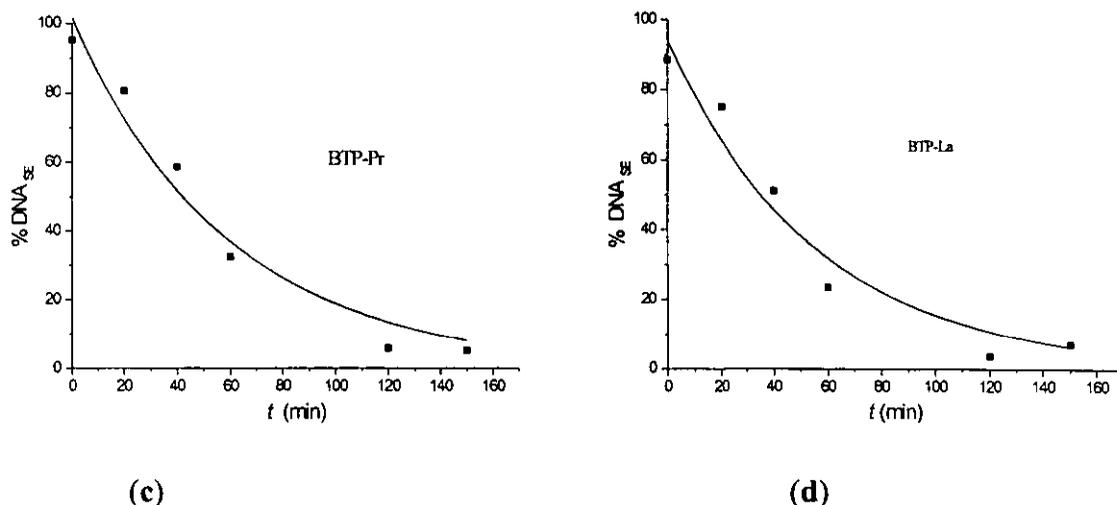


Fig.16.9. Hidrólisis de ADN en presencia de BTP 18.6 mM y Ln(III) 4.65 mM a 37°C, pH 8.5. (a) Eu(III), (b) Nd(III), (c) Pr(III) y (d) La(III).

En estos experimentos, se comprobó que existe una reactividad de los sistemas OXDAP/M(II) y BTP/Ln(III) frente a ADN superenrollado, y que para este sustrato es más efectiva la hidrólisis con el segundo sistema. Vale la pena hacer notar que las reactividades catalíticas logradas son comparables a las mejores encontradas en la literatura. También se observó que el orden respecto al metal es mayor que 1, implicando posiblemente la participación de 2 o más hidroxocomplejos, y fue posible calcular la energía de activación del sustrato a estas condiciones, que es ligeramente inferior a la medida para BNPP.

Finalmente, debido a que la reactividad de los sistemas estudiados en estas tesis es suficientemente alta, vale la pena hacer estudios más detallados empleando dinucleótidos, ya que tienen constantes de hidrólisis más representativas de los enlaces fosfodiéster del ADN.⁶⁷

CONCLUSIONES

1. La hidroxilamina funciona como un α -nucleófilo respecto a la ruptura de fosfodiésteres en su forma aniónica, sin embargo no se logró la cooperación de este nucleófilo con iones metálicos.
2. Los complejos de 2,6-diacetilpiridíndioxima con iones metálicos (Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II), Pr(III)) muestran una alta reactividad esterolítica atribuida a la nucleofilia del grupo oximato coordinado. Se mostró que existe una correlación no-lineal entre la basicidad y la nucleofilia de oximatos coordinados. La ruptura de ésteres carboxílicos transcurre de forma catalítica respecto al complejo oximato. La etapa de acilación determina la rapidez del proceso.
3. En el caso de los complejos de 2,6-diacetilpiridíndioxima con cationes de Cd(II), Mn(II) y Pb(II) hay una notable contribución del catión en la estabilización del estado de transición de acilación del oximato coordinado. La actividad del complejo de Cd(II) en la hidrólisis de 4-nitrofenil acetato es solamente 5 veces menor que la actividad de la quimotripsina (una enzima hidrolítica cuya actividad tradicionalmente se usa como referencia para "esterasas" artificiales): las constantes velocidad de segundo orden son 520 y 2800 $M^{-1}s^{-1}$ para el complejo de Cd(II) y la enzima respectivamente.
4. Los complejos oximato antes mencionados tienen reactividad fosfodiesterolítica, pero únicamente a temperaturas elevadas.
5. De los ligantes aminoalcohólicos con lantánidos(III) se seleccionó BisTris propano (BTP) para estabilizar estos cationes en disoluciones débilmente básicas. Mediante técnicas de titulación potenciométrica, 1H RMN y ESI-MS se estableció que los lantánidos forman con BTP una serie de hidroxocomplejos binucleares de composición general $Ln_2(BTP)_2(OH)_n^{6-n}$, donde $n=2,4,5$ o 6 , y que Y(III) forma una serie de complejos parecidos de estequiometría $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$.

6. La reactividad fosfodiesterolítica de los complejos de BTP con lantánidos (III) e Y(III) se ubica entre las más altas reportadas a la fecha. Estos sistemas permiten hidrolizar sustratos sintéticos y ADN a temperatura ambiente. La cinética de hidrólisis es de primer orden respecto al metal para los sustratos sintéticos y de tipo Michaelis-Menten para ADN. Empleando concentraciones milimolares de los complejos los tiempos de la vida media de los sustratos se reducen de cientos de años a un intervalo entre 5 min y 1 hora. Los estudios cinéticos realizados permitieron determinar las constantes de velocidad de segundo orden para la hidrólisis de BNPP para cada una de las especies que se presentan en disolución.

7. La eficiencia de los complejos de BTP con lantánidos (III) e Y(III) en la hidrólisis de fosfomonoésteres es del mismo orden de magnitud que en la hidrólisis de fosfodiésteres, pero la cinética es de tipo Michaelis-Menten. Con fosfotriésteres y ésteres de ácidos carboxílicos la eficiencia es notablemente más baja aunque estos dos sustratos están más activados. El enorme efecto catalítico sobre los fosfodiésteres se atribuye a la estabilización adicional del estado de transición, probablemente por formación de un quelato entre estos cationes trivalentes y el fragmento O-P-O^- .

Referencias citadas

1. (a) M.L.Bender, Mechanisms of catalysis of nucleophilic reactions of carboxylic acid derivatives, *Chem.Rev.*, **60** (1960) 53-113. (b) S.L.Johnson, General base and nucleophilic catalysis of ester hydrolysis and related reactions, *Adv.Phys.Org.Chem.* **5**, (1967) 237-330.
2. C.Leumann, New developments in the chemistry of catalytic antibodies, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **32** (1993) 1291-1293.
3. E.J.Corey, R.L.Dawson, Metal-ion sensitive protecting groups in synthesis. The carbo-(8-quinoloxo) substituent and its removal by accelerated hydrolysis, *J.Am.Chem.Soc.*, **84** (1962) 4894-4904.
4. D.E.C. Corbridge, "Phosphorous", serie Studies in Inorganic Chemistry. Cuarta Edición, Elsevier, Amsterdam (1990).
5. G.L.Eichhorn y L.G.Marzilli (Editores.) "Advances in Inorganic Biochemistry", Elsevier, Amsterdam (1979) vol.1.
6. R.A.Moss, K.Y.Kim, S.Swarup, Efficient catalytic cleavage of reactive phosphates by an *o*-iodosobenzoate functionalized surfactant, *J.Am.Chem.Soc.*, **108** (1986) 788-793.
7. F.M.Menger, L.H.Gan, E.Johnson and D.H.Durst, Phosphate ester hydrolysis catalyzed by metallomicelles, *J.Am.Chem.Soc.*, **109** (1987) 2800-2803.
8. Y.Xie, B.N.Popov, Catalyzed hydrolysis of nerve gases by metal chelate compounds and potentiometric detection of the byproducts, *Anal.Chem.*, **72** (2000) 2075-2079.
9. J.H.Kim, J.Chin Dimethyl phosphate hydrolysis at neutral pH, *J.Am.Chem.Soc.*, **114** (1992) 9792-9795.
10. J.Chin, B.Banaszczyk, V.Jubian, X.Zou, Co(III) complex promoted hydrolysis of phosphate diesters: comparison in reactivity of rigid *cis*-diaquotetraazacobalt(III) complexes, *J.Am.Chem.Soc.*, **111** (1989) 186-190.
11. F.H.Westheimer, Why nature chose phosphates, *Science*, **235** (1987) 1173-1178.
12. S.A.Strobel, P.B.Dervan, Single-site enzymatic cleavage of yeast genomic DNA mediated by triple helix formation, *Nature*, **350** (1991) 172-174.
13. D.S.Sigman, A.Mazumder, D.M.Perrin, Chemical nucleases, *Chem.Rev.*, **93** (1993) 2295-2316.

14. D.Magda, R.A.Miller, J.L.Sessler, B.L.Iverson, Site-specific hydrolysis of RNA by europium(III) texaphyrin conjugated to a oligodeoxyribonucleotide, *J.Am.Chem.Soc.*, **116** (1994) 7439-7440, y referencias ahí citadas.
15. C.K.Ingold "*Structure and Mechanism in Organic Chemistry*", Cornell, Ithaca, Nueva York, 1953, p.310.
16. R.Wolfenden, C.Ridgway, G.Young, Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts, *J.Am.Chem.Soc.*, **120** (1998) 833-834.
17. J.R.Cox, O.B.Ramsay, Mechanisms of nucleophilic substitution in phosphate esters, *Chem.Rev.*, **64** (1964) 317-352.
18. P.Hendry, A.Sargeson, Metal ion promoted reactions of phosphate derivatives, en "*Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry*", **38** (1990) 201-259.
19. J.P.Guthrie, Hydration and dehydration of phosphoric acid derivatives: free energies of formation of the pentacoordinate intermediates for phosphate ester hydrolysis and of monomeric metaphosphate, *J.Am.Chem.Soc.*, **99** (1977) 3991-4001.
20. A.J.Kirby, M.Younas, The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis, *J.Chem.Soc.(B)* (1970) 510-513.
21. D.M.Brown, D.A.Usher, Hydrolysis of Hydroxyalkyl Phosphate Esters, *J.Chem.Soc.* (1965) 6558-6564.
22. N.Chang, C.Lim, Factors Governing the enhanced reactivity of five-membered cyclic phosphate esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **120** (1998) 2156-2167.
23. W.P.Jencks "*Catalysis in Chemistry and Enzymology*", Dover Publ., Nueva York, 1975.
24. T.C.Bruice, S.Benkovic "*Bioorganic Mechanisms*", Vols.1,2, Benjamin, N.Y., 1966.
25. M.L.Bender "*Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins*", Wiley, N.Y., 1971.
26. (a) W.P.Jencks, J.Carriuolo, Reactivity of nucleophilic reagents toward esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **82** (1960) 1778-1786; (b) D.J.Hupe, W.P. Jencks, Non linear structure-reactivity correlations. Acyl transfer between sulfur and oxygen nucleophiles, *J.Am.Chem.Soc.*, **99** (1977) 451-4641.
27. A.J.Kirby, Effective molarities for intramolecular reactions, *Adv.Phys.Org.Chem.*, **17** (1980) 183-278.

28. J.F.Morrison, E.Heyde, Enzymic phosphoryl group transfer, *Ann.Rev.Biochem.*, **41** (1972) 29-54.
29. A. Fersht, "Enzyme structure and mechanism", Freeman W.H. & Co., Estados Unidos (1977), cap. 2 y 12.
- 30.R.Krämer, Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes, *Coord.Chem.Rev.*, **182** (1999) 243-261.
- 31.N.H.Williams, B.Takasaki, M.Wall, J.Chin, Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: quantitative dissection of the role of metal ions, *Acc.Chem.Res.*, **32** (1999) 485-493.
32. J.O.Edwards, R.G. Pearson, The factors determining nucleophilic reactivities, *J.Am.Chem.Soc.*, **84** (1962) 16-24.
33. P.Gómez-Tagle, A.K.Yatsimirsky, Esterolytic activity of metal complexes of 2,6-diacetylpyridine dioxime, *Polyhedron*, **16**, (1997) 877-879.
34. (a) W.P.Jencks, M.Gilchrist, Reaction of nucleophilic reagents with phosphoramidate, *J.Am.Chem.Soc.*, **87** (1965) 3199-3208; (b) W.P.Jencks, M.Gilchrist, The nucleophilic reactivity of alcoholate toward *p*-nitrophenyl acetate, *J.Am.Chem.Soc.*, **84** (1962) 2910-2913; (c) W.P.Jencks, M.Gilchrist, Nonlinear structure-reactivity correlations. The reactivity of nucleophilic reagent toward esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **90** (1968) 2622-2637.
35. A.J.Kirby, W.P.Jencks, The reactivity of nucleophilic reagents toward the *p*-nitrophenyl phosphate dianion, *J.Am.Chem.Soc.*, **87** (1965) 3209-3216.
36. A.J.Kirby, A.G.Varvoglis, The reactivity of phosphate esters. Monoester hydrolysis, *J.Am.Chem.Soc.*, **89** (1967) 415-423.
37. WW.Butcher, F.H.Westheimer, The lanthanum hydroxide gel promoted hydrolysis of phosphate esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **77** (1967) 2740-2423.
38. J.A.A.Ketelaar, H.R.Gersmann, Chemical studies on insecticides VI. The rate of hydrolysis of some phosphorous acid esters, *Recl.Trav.Chim.*, **27** (1958) 973-992.
- 39.C.A.Bunton, S.J.Farber, E.J.Fendler, The hydrolysis of *p*-nitrophenyl diphenyl phosphate, *J.Org.Chem.*, **33** (1968) 29-33.
40. J.D.Chanley, E.Feageson, A study of the hydrolysis of phosphoramidates. II. Solvolysis of phosphoramidic acid and comparison with phosphate esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **85** (1963) 1181.

41. A.J.Kirby, Hydrolysis and formation of esters of organic acids, en *Compr.Chem.Kinet.*, Editores C.H.Bamford, C.F.H.Tipper, Elsevier, Amsterdam, vol. 10 (1972) 57.
42. J.F.Kirsch, W.P.Jencks, Non linear structure-reactivity correlations. The imidazole-catalyzed hydrolysis of esters, *J.Am.Chem.Soc.*, **86** (1964) 837-846.
43. E.J.Behrman, M.J.Biallas, H.J.Brass, J.O.Edwards, M.Isaks, Reactions of phosphonic acid esters with nucleophiles, *J.Org.Chem.*, **35** (1970) 3069-3075.
44. El valor de k_{obs} para la hidrólisis del ADN_{SE} se estima con base en los datos de la Ref.67.
45. M.Komiyama, Sequence-specific and hydrolytic scision of DNA and RNA by lanthanide complex-oligo DNA hybrids, *J.Biochem.*, **118** (1995) 665-670.
46. A.Radzika, R.Wolfenden, A proficient enzyme, *Science*, **267** (1995) 90-93.
47. J.Kumamoto, J.R.Cox Jr., F.H.Westheimer, Barium ethylene phosphate, *J.Am.Chem.Soc.*, **78** (1956) 4858-4860.
48. (a) P.C.Haake, F.H.Westheimer, Hydrolysis and exchange in esters of phosphoric acid, *J.Am.Chem.Soc.*, **83** (1961), 1102-1109; (b) E.T.Kaiser, M.Panar, F.H. Westheimer, The hydrolysis fo some cyclic esters of phosphoric acid, *J.Am.Chem.Soc.*, **85** (1963) 602-607.
- 49.(a) Covitz, F.H.Westheimer, , The hydrolysis of methyl ethylene phosphate: Steric hindrance in general base catalysis, *J.Am.Chem.Soc.*, **85** (1963) 1773-1777; (b) F.Ramírez, O.P.Madan, N.B.Desai, S.Meyerson, E.M.Banas, The hydrolysis of five-member cyclic phosphotriesters to cyclic phosphotriesters, *J.Am.Chem.Soc.*, **85** (1963) 2681-2682.
50. Y.S.Simanenko, A.F.Popov, T.M.Prokopeva, V.A.Savelova, I.A.Belousova, T.M.Zubareva, Hydroxylamine anion as a strong acceptor of acyl-groups, *Mendeleev Commun.*, (1994) 210-212.
51. F.Terrier, F.Degorre, D.Kiffler, M.Laloi, The effect of solvation on the reactivity of α -nucleophiles in aqueous solution. 1.Oximate anions, *Bull.Soc.Chem.Fr.*, (1988) 415-419.
52. E.I.Baucom, R.S. Drago, Nickel (II) and Nickel (IV) Complexes of 2,6-diacetylpyridine dioxime *J.Am.Chem.Soc.*, **93** (1971) 6469-6475.

53. (a) E.L.Hegg, S.H.Mortimore, C.L.Cheung, J.E.Huyett, D.R.Powell, J.N.Burstyn, Structure-reactivity studies in copper (II)-catalyzed phosphodiester hydrolysis, *Inorg.Chem.*, **38** (1999) 2961-2968; (b) E.H.Hegg, K.A.Deal, L.L.Kiessling, J.N.Burstyn, Hydrolysis of double-stranded and single-stranded RNA in hairpin structures by the Copper(II) macrocycle $\text{Cu}([\text{9}]aneN_3)\text{Cl}_2$, *Inorg.Chem.*, **36** (1997) 1715-1718.
54. (a) R.M.Smith, A.E.Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, Nueva York, 1975, Vol.2, Vol.4; (b) C.F.Baes Jr., R.E.Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, 1976.
55. J.H.Forsberg, T.Moeller, Tris- and tetrakisethylenediamine chelates of tripositive lanthanide ions, *J.Am.Chem.Soc.*, **90** (1968) 1932.
56. R.D.Hancock, G.Jackson, A.Evers, Affinity of lanthanoid(III) ions for nitrogen-donor ligands in aqueous solution, *J.Chem.Soc.Dalton*, (1979) 1385-1387.
57. T.Itoh, H.Hisada, Y.Usui, Y.Fujii, Hydrolysis of phosphate ester catalyzed by copper(II)-triamine complexes. The effect of triamine ligands on the reactivity of the copper(II) catalysts, *Inorg.Chim.Acta*, **283** (1998) 51-60.
58. R.C.Mehotra, Oximes, guanidines and related species, en *Comprehensive Coordination Chemistry*, Editado por G. Wilkinson, Pergamon Press (1987) Vol. 2, cap.13.8.
59. R.Breslow, D.Chipman, Mixed metal complexes as enzyme models. I. Intracomplex nucleophilic catalysis by an oxime anion, *J.Am.Chem.Soc.*, **87** (1965) 4145-4196.
60. ver referencias citadas en Y.Inoue, T.Hakushi, Y.Liu, thermodynamics of cation macrocycle complexation: enthalpy-entropy compensation, en *Cation Binding by Macrocycles. Complexation*, Ed. Dekker, Nueva York, 1990 p.1-110.
61. (a) R.D.Hancock, A.E.Martell, Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution, *Chem.Rev.*, **89** (1989) 1875-1914; (b) A.E.Martell, R.D.Hancock, R.J.Motekaitis, Factors affecting stabilities of chelate, macrocyclic and macrobicyclic complexes in solution, *Coord.Chem.Rev.*, **133** (1994) 39-65.
62. (a) P.E.Jurek, A.M.Jurek, A.E.Martell, Phosphate diester hydrolysis by mono- and dinuclear lanthanum complexes with an unusual third-order dependence, *Inorg.Chem.* **39**, (2000) 1016-1020; (b) P.E.Jurek, A.E.Martell, Dinuclear lanthanum complex catalyzes the hydrolysis of a phosphate diester with unprecedented speed, *Chem.Commun.* (1999) 1609-1610.

63. E.P.Serjeant, B.Dempsey, Ionization constants of organic acids in aqueous solution, *IUPAC Chemical Data Series*, Ed. Pergamon Press, Vol.23 (1979).
64. J.R.Morrow, K.Aures, D.Epstein, Metal ion promoted attack of an alcohol on a phosphate diester: modelling the role of metal ions in RNA self-splicing reactions, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.* (1995) 2431-2432.
65. A.Kajimura, J.Sumakoa, M.Komiyama, DNA hydrolysis by cerium(IV) saccharide complexes, *Carbohydr.Res.*, **309** (1998) 345-351.
66. R.Ott, R.Krämer, Rapid phosphodiester hydrolysis by zirconium(IV), *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **37** (1998) 1957-1960.
67. R.Ott, R.Krämer, DNA hydrolysis by inorganic catalysts, *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, **52** (1999) 761-767.
68. S.J.Franklin, Lanthanide-mediated DNA hydrolysis, *Curr.Op. in Chem.Biol.*, **5** (2001) 201-208.
69. E.Kimura, Macrocyclic polyamine zinc (II) complexes as advanced models for zinc (II) enzymes, en *Progress in Inorganic Chemistry*; Karlin, K.D. Ed.; Wiley, vol.41, (1994) p.443-491.
70. E.Kimura, T.Koike, Intrinsic properties of zinc (II) ion pertinent to zinc enzymes, en *Advances in Inorganic Chemistry*; Sykes, A.G., Ed.; Academic Press, New York, Vol.44, (1997) p.229-261.
71. E.L.Hegg, J.N.Burstyn, Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry, *Coord.Chem. Rev.*, **173** (1998) 133-165.
72. M.Komiyama, N.Takeda, H.Shigekawa, Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: mechanistic studies leading to new applications, *Chem. Commun.*, (1999) 1443-1451.
73. J.M.Smolen, A.T.Stone, Divalent metal ion-catalyzed hydrolysis of phosphorothionate ester pesticides and their corresponding oxonates, *Environ.Sci.Techol.*, **31** (1997) 1664-1673.
74. D.S.Baldwin, J.K.Beattie, L.M.Coleman, D.R.Jones, Hydrolysis of an organophosphate ester by manganese dioxide, *Environ.Sci.Technol.*, **35** (2001) 713-716.
75. J.S.Rosenblum, L.-C.Lo, T.Li, K.D.Janda, R.A.Lerner, Antibody-catalyzed phosphate triester hydrolysis, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **34** (1995) 2275-2277.

76. R.A.Moss, H.Morales-Rojas, Kinetics of cleavage of thiophosphates and phosphonothioates by micellar iodosocarbonylates and copper metallomicelles, *Langmuir*, **16** (2000) 6485-6491; (b) R.A.Moss, K.G.Ragunathan, Metal cation micelle mediated hydrolysis of phosphonic acid esters, *Langmuir*, **15** (1999) 107-110; (c) C.A.Bunton, N.D. Gillitt, H.J.Foroudian, A quantitative treatment of dephosphorilation by an amphiphilic hydroxamate ion. The role of micellar charge, *Langmuir*, **14** (1998) 4415-4421.
77. C.A.Bunton, L.Robinson, Micellar effects upon the reaction of *p*-nitrophenyl diphenyl phosphate with hydroxide and fluoride ions, *J.Org.Chem.*, **34** (1969) 773-780.
78. (a) F.Tafesse, Hydrolysis of 4-nitrophenyl diphenyl phosphate assisted by tetraminecobalt (II) in microemulsion media, *Analyst*, **122** (1997) 293-295; (b) F.Tafesse, Hydrolysis of nerve agent simulants by synergistic effect of tetraminecobalt (III) and microemulsions, *Inorg.Chim.Acta*, **269** (1998) 287-291.
79. D.L.Mohler, D.R.Dain, A.D.Kerekes, W.R.Nadler, T.L.Scott, Organometallic photonucleases: a novel class of DNA-cleaving agents, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **8** (1998) 871-874.
80. L.Y.Kuo, L.A.Barnes, Aqueous phosphoester bond cleavage of dimethyl phosphate by Cp_2MoCl_2 : first reported case of hydrolytic cleavage on an unactivated phosphate diester by an organometallic complex, *Inorg.Chem.*, **38** (1999) 814-817.
81. R.Breslow, B.Zhang, Cleavage of phosphate diesters by a cyclodextrin dimer catalyst that binds the substrates together with La^{3+} and hydrogen peroxide, *J.Am.Chem.Soc.*, **116** (1994) 7893-7894.
82. S.Hashimoto, Y.Nakamura, Characterization of lanthanide-mediated DNA cleavage by intercalator-linked hydroxamic acids: comparison with transition systems, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1*, (1996) 2623-2628.
83. K.Yoshinari, K.Yamakazi, M.Komiyama, Oligoamines as simple and efficient catalysts for RNA hydrolysis, *J.Am.Chem.Soc.*, **113** (1991) 5899-5901.
84. F.Mancin, P.Tecilla, U.Tonellato, Activation of oximic nucleophiles by coordination of transition metal ions, *Eur.J.Org.Chem.*, (2000) 1045-1050.
85. T.Ihara, H.Shimura, K.Ohmori, H.Tsuji, J.Takeuchi, M.Takagi, Hydrolysis of nucleotides using actinoid metal ion, *Chem.Lett.*, (1996) 687-688.

86. V.L.Boisselier, M.Postel, E. Duñach, Bi(III) as new catalyst for the selective hydrolysis of esters, *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 2981-2984.
87. A.K.Yatsimirsky, G.M.Kazankov, A.D.Ryabov, Ester hydrolysis catalyzed by *orto*-palladated aryl oximes, *J.Chem.Soc., PerkinTrans.*, (1992) 1295-1299.
88. J.Yan, R.Breslow, An enzyme mimic that hydrolyzes an unactivated ester with catalytic turnover, *Tetrahedron Lett.*, **41** (2000) 2059-2062.
89. J.A.Connolly, T.H.Kim, M.Banaszczyk, M.Drowin, J.Chin, Factors affecting chelation of carboxylates to cis-diaqua Co(III) complexes - Implications on the reactivity of the metal-complexes for hydrolyzing esters, amides, nitriles, and phosphates, *Inorg.Chem.*, **34** (1995) 1094-1099.
90. (a) R.W.Hay, C.R.Clark, The very rapid Zinc(II) and Copper(II)-promoted hydrolysis of 8-acetoxyquinoline-2-carboxylic acid. A model for the rate of catalysis by carboxypeptidase A, *J.Chem.Soc.Dalton Trans.*, (1977) 1993-1998; (b) R.H.Barca, H.Freiser, Kinetics and mechanism of the metal ion catalyzed hydrolysis of 8-acetoxyquinoline, *J.Am.Chem.Soc.*, **88** (1966) 3744-3748.
91. A.Tsubouchi, T.C.Bruice, Remarkable ($\sim 10^{13}$) rate enhancement in phosphonate ester hydrolysis catalyzed by two metal ions, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 7399-7411.
92. K.A.Deal, J.N.Burstyn, Mechanistic studies of dichloro(1,4,7-triazacyclononane) copper(II)-catalyzed phosphate diester hydrolysis, *Inorg.Chem.*, **35** (1996) 2792-2798.
93. J.N.Burstyn, K.A.Deal, Selective catalytic hydrolysis of a simple phosphodiester by a macrocyclic Copper(II) complex, *Inorg.Chem.*, **32** (1993) 3585-3586.
94. M.J.Young, J.Chin, Dinuclear copper(II) hydrolyzes RNA, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 10577-10578.
95. E.L.Hegg, J.N.Burstyn, Copper (II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions, *Inorg.Chem.*, **35** (1996) 7474-7481.
96. J.R.Morrow, W.C.Trogler, Hydrolysis of phosphate diesters with copper(II) catalysts, *Inorg.Chem.*, **27**, (1988) 3387-3394.
97. S.Viladkar, Kamaluddin, M.Nath, Hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate by (amino acidato) zinc complexes, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **66** (1993) 2922-2626.

98. M.M.Ibrahim, N.Shimomura, K.Ichikawa, M.Shiro, Phosphoester hydrolysis using structural phosphatase models of tren based zinc(II) complexes and X-ray crystal structures of $[\text{Zn}(\text{tren})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ and $[\text{Zn}(\text{tren})(\text{BNPP})]\text{ClO}_4$, *Inorg.Chim.Acta*, **313** (2001) 125-136.
99. R.Breslow, D.Berger, D.L.Huang Bifunctional zinc-imidazole and zinc-thiophenol, *J.Am.Chem.Soc.*, **112** (1990) 3686-3687.
100. L.A. Jenkins Autry, J.K.Bashkin, Transesterification of RNA by Cu(II)terpyridine, *Inorg.Chim.Acta*, **263** (1997) 49-52.
101. S.Liu, A.D.Hamilton, Catalysis of phosphodiester transesterification by dinuclear Cu(II) complexes: the role of the second Cu(II) ion, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **7** (1997) 1779-1784.
102. P.E.Jurek, A.E.Martell, Molecular recognition of activated and unactivated phosphate diesters, *Inorg.Chem.*, **38** (1999) 6003-6007.
103. E.Kövári, R.Krämer, Rapid phosphodiester hydrolysis by an ammonium-functionalized copper(II) complex. A model for the cooperativity of metal ions and NH-Acidic groups in phosphoryl transfer enzymes, *J.Am.Chem.Soc.*, **118** (1996) 12704-12709.
104. E.Kimura, Y.Kodama, T.Koike, M.Shiro, Phosphodiester hydrolysis by a new zinc(II) macrocyclic tetraamine complex with an alcohol pendant: elucidation of the roles of Ser-102 and zinc(II) in alkaline phosphatase, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 8304-8311.
105. M.J.Young, D.Wahnon, R.C.Hynes, J.Chin, Reactivity of copper (II) hydroxides and copper (II) alkoxides for cleaving an activated phosphate diester, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 9441-9447.
106. J.Suh, M.Cheong, Cupric ion catalyzed ester hydrolysis of o-acetyl-2-pyridine carboxaldoxima. Nucleophilic attack by metal-bound water, *J.Am.Chem.Soc.*, **104**, (1982) 1654-1657.
107. J.Suh, E.Lee, E.S.Jang, Kinetic study of the zinc ion catalyzed hydrolysis of o-acetyl-2-pyridine carboxaldoxime, *Inorg.Chem.*, **20** (1981) 1932-1934.
108. J.Suh, H.Han, Zinc ion catalyzed ester hydrolysis of o-acetyl-2-acetylpyridine ketoxime: bimolecular participation of hydrozinc (II) ion, *Bioorg.Chem.*, **12** (1984a) 177-187.

109. J.Suh, M.Cheong, H.Han, Multifunctional catalysis by metal complexes, *Bioorg.Chem.*, **12** (1984b) 187-196.
110. (a) J.S.Seo, R.C.Hynes, D.Williams, J.Chin, Structure reactivity of dinuclear cobalt (III) complexes with peroxide and phosphate diester analogues bridging the metal ions, *J.Am.Chem.Soc.*, **120** (1998) 9943-9944; (b) J.S.Seo, N.-D.Sung, R.C.Hynes, J.Chin, and Reactivity of a dinuclear cobalt(III) complex with a bridging phosphate monoester, *Inorg.Chem.*, **35** (1996) 7472-7473.
111. R.Breslow, D.-L.Huang, Effects of metal ions, including Mg^{2+} and lanthanides on the cleavage of ribonucleotides and RNA complex, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88** (1991) 4080-4083.
112. (a) J.R.Morrow, L.A.Buttrey, K.A.Berback, Transesterification of a phosphate diester by divalent and trivalent metal ions, *Inorg.Chem.*, **31** (1992) 16-20; (b) J.R.Morrow, L.A.Buttrey, V.M.Shelton, K.A.Berback, Transesterification of a phosphate diester by divalent and trivalent metal ions, Efficient catalytic cleavage of RNA and lanthanide (III) macrocyclic complexes: toward synthetic nucleases for *in vivo* applications, *J.Am.Chem.Soc.*, **114** (1992) 1903-1905.
113. J.Chin, X.Zou, Cobalt(III) complex promoted hydrolysis of phosphate diesters: Change in rate-determining step with change in phosphate diester reactivity, *J.Am.Chem.Soc.*, **110** (1988) 223-225.
114. M.A.De Rosch, W.C.Trogler, Hydrolysis of phosphodiester with Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II) and Pt(II) complexes, *Inorg. Chem.*, **29** (1990) 2409-2416.
115. J.R.Morrow, Hydrolytic cleavage of RNA catalyzed by metal ion complexes, en *Metal Ions in Biological Systems*, Editores A.Siegel, H.Siegel, vol.33, cap.19 (1996) 561-592.
116. J.K.Bashkin, Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysis, *Curr.Opinion Chem.Biol.* **3** (1999) 752-758.
117. (a) N.N.Greenwood, A.Earnshaw, Chemistry of the elements, 2^a Edición, Gran Bretaña (1998) cap.30; (b) G.R.Chopin, Lanthanide probes in Life, Chemical and Earth Sciences, Editado por J.-C.G.Bünzli y G.R.Chopin, Elsevier, Amsterdam (1989).
118. D.H.Vance, A.W.Czarnik, Functional group convergency in a binuclear dephosphorilation reagent, *J.Am.Chem.Soc.*, **115** (1993) 12165-12166.
119. A.Blaskó, T.C.Bruice, Recent studies of nucleophilic, general acid, and metal ion catalysis of phosphate diester hydrolysis. *Acc.Chem.Res.*, **32** (1999) 475-484.

120. P.Hurst, B.K.Takasaki, J.Chin, Rapid cleavage of RNA with a La(III) dimer, *J.Am.Chem.Soc.*, **118** (1996) 9982-9983.
121. P.Molenveld, J.F.J.Engbersen, D.N.Reinhoudt, Dinuclear metallo-phosphodiesterasa: models of application of calix[4]arenes as molecular scaffolds, *Chem.Soc.Rev.*, **29** (2000) 75-86.
122. B.F.Baker, H.Khalili, N.Wei, J.R.Morrow, Cleavage of the 5'cap structure of mRNA by a europium (III) macrocyclic complex with pendant alcohol groups, *J.Am.Chem.Soc.*, **119** (1997) 8749-8755.
123. A.Roigk, R.Hettich, H.-J.Schneider, Unusual catalyst concentration effects in the hydrolysis of phenyl phosphate esters and of DNA: a systematic investigation of the lanthanide series, *Inorg.Chem.* **37**, (1998) 751-756.
124. R.W.Hay, N.Govan, The reactivity of metal-hidroxo nucleophile and a range of bases in the hydrolysis of the phosphate triester 2,4-dinitro-phenyl diethyl phosphate, *Polyhedron*, **15** (1996) 2381-2386.
125. (a) S.Amin, J.R.Morrow, C.Lake, M.R.Churchill, Lanthanide(III) tetraamide macrocyclic complexes as synthetic ribonucleases: structure and catalytic properties of [La(tcmc)(CF₃SO₃)(EtOH)] (CF₃SO₃)₂, *Angew.Chem.Int.Ed.Eng.*, **33** (1997) 773-775; (b) S.Amin, D.A.Voss,Jr., W.DeW.Horrocks,Jr., J.R.Morrow, Restoration of catalytic activity by replacement of a coordinated amide group: synthesis and laser-induced luminescence studies of the phosphate diester transesterification catalyst, *Inorg.Chem.*, **35** (1995) 7466-7467; (c) J.R.Morrow, S.Amin, C.H.Lake, M.R.Churchill, Synthesis, structure, and dynamic properties of the lanthanum (III) complex of 1,4,7,10-tetrakis(2-carbamylethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane, *Inorg.Chem.*, **32** (1993) 4566-4572.
126. D.M. Epstein, L.L.Chappell, H.Khalili, R.M. Supkowski, W.DeW.Horrocks, Jr., J.R.Morrow, Eu(III) macrocyclic complexes promote cleavage and bind to models for the 5'-cap of mRNA. Effect of pendant group and a second metal ion, *Inorg.Chem.* **39**, (2000) 2130-2134.
127. L.L.Chappell, D.A.Voss, Jr., W.DeW.Horrocks, Jr., J.R.Morrow, Effect of mixed pendant groups on the solution and catalytic properties of Europium (III) macrocyclic complexes: bifunctional and monofunctional amide and alcohol pendants in septadentate or octadentate ligands, *Inorg.Chem.* **37**, (1998) 3989-3998.

128. K.O.A.Chin, J.R.Morrow, RNA cleavage and phosphate diester transesterification by encapsulated lanthanide ions: traversing the lanthanide series with lanthanum(III), europium(III) and lutetium(III) complexes of 1,4,7,10-tetrakis(2-hydroxyalkyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo dodecane, *Inorg.Chem.*, **33** (1994) 5036-5041.
129. J.R.Morrow, L.A.Buttrey, V.M.Shelton and K.A.Berback, Efficient catalytic cleavage of RNA by lanthanide (III) macrocyclic complexes: toward synthetic nucleases for in vivo applications, *J.Am.Chem.Soc.*, **114** (1992) 1903-1905.
130. H.-J.Schneider, J.Rammo, R.Hettich, Catalysis of the hydrolysis of phosphoric acid diesters by lanthanide ions and the influence of ligands, *Angew.Chem.,Int.Ed.Engl.*, **32** (1993) 1716-1718.
131. J.Rammo, R.Hettich, A.Roigk, H.-J.Schneider, Catalysis of DNA cleavage by lanthanide complexes with nucleophilic or intercalating ligands and their kinetic characterization, *Chem.Commun.*, (1996) 105-107.
132. J.Huskens, A.D.Kennedy, H.Vanbekkum, J.A.Peters, The hydrolysis of trimetaphosphate catalyzed by lanthanide (III) aminopolycarboxylate complexes-coordination, stability, and reactivity of intermediate complexes, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 375-382.
133. C.A.Chang, P.H.L.Chang, V.K.Manchanda, S.P.Kasprzyk, Equilibria and dissociation kinetics of lanthanide complex of diazacrown ether carboxylic acids, *Inorg.Chem.*, **27** (1998) 3786-3789.
134. A.Roigk, O.V.Yescheulova, Y.V.Fedorov, O.A.Fedorova, S.P.Gromov, H.-J. Schneider, Carboxylic groups as cofactors in the lanthanide-catalyzed hydrolysis of phosphate esters. Stabilities of europium(III) complexes with aza-benzo-15-crown-5 ether derivatives and their catalytic activity vs. bis(*p*-nitrophenyl)phosphate and DNA, *Org.Lett.*, **1**, (1999) 833-835.
135. S.J.Oh, Y.-S.Choi, S.Hwangbo, S.Bae, J.K.Ku, J.W.Park, Structure and phosphodiesterase activity of Bis-Tris coordinated lanthanide (III) complexes, *Chem.Commun.* (1998) 2189-2190.
136. N. Takeda, M.Irisawa and M.Komiyama, Cooperation of lanthanum ion and non-lanthanide metal ions for the hydrolysis of bis(4-nitrophenyl)phosphate, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, (1994) 2773-2774.

137. (a) B.K.Takasaki, J.Chin, La(III)-Hydrogen peroxide cooperativity in phosphate diester cleavage: a mechanistic study, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 8582-8585; (b) B.K.Takasaki and J.Chin, Synergistic effect between La(III) and hydrogen peroxide in phosphate diester cleavage, *J.Am. Chem.Soc.*, **115** (1993) 9337-9338.
138. A.Tsubouchi, T.C.Bruice, Phosphonate ester hydrolysis catalyzed by two lanthanum ions. Intramolecular nucleophilic attack of coordinated hydroxyde and Lewis acid activation, *J.Am.Chem.Soc.*, **117** (1995) 7399-7411.
139. K.G.Ragunathan, H.-J.Schneider, Binuclear lanthanide complexes as catalysts for the hydrolysis of bis(*p*-nitrophenyl)phosphate and double stranded DNA, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.*, **35** (1996) 1219.
140. (a) B.Zhu, D.-Q.Zhao, J.-Z.Ni, Q.-H.Zeng, B.-Q.Huang, Z.-L.Wang, Binuclear lanthanide complexes as catalysts for the hydrolysis of double stranded DNA, *Inorg.Chem.Commun.*, **2** (1999) 351-353; (b) B.Zhu, D.-Q.Zhao, J.-Z.Ni, Q.-H.Zeng, B.-Q.Huang, Z.-L.Wang, Lanthanide Binuclear macrocyclic complexes as synthetic enzymes for the cleavage of DNA, *J.of Mol. Cat.A:Chem.*, **135** (1998) 107-110.
141. R.A.Moss, K.G.Ragunathan, Remarkable acceleration of dimethyl phosphate hydrolysis by ceric cations, *Chem.Commun.*, (1998) 1871-1872.
142. M.Komiyama, Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: mechanistic studies leading to new applications, *Chem.Commun.*, (1999) 1443-1451.
143. R.A. Moss, J.Zhang, K.Bracken, Extraordinary acceleration of phosphodiester hydrolyses by thorium cations, *J.Chem.Soc., Chem. Commun.*, (1997) 1639-1640.
144. T.Igawa, J.Sumakoa, M.Komiyama, Hydrolysis of oligonucleotides by homogeneous Ce(IV)/EDTA complex, *Chem.Lett.*, (2000) 356-357.
145. B.K.Takasaki, J.Chin, Cleavage of phosphate diester backbone of DNA with cerium(III) and molecular oxygen, *J.Am.Chem.Soc.*, **116** (1994) 1121-1122.
146. M.Komiyama, N.Takeda, Y.Takahashi, H.Uchida, T.Shiiba, T.Kodama, M.Yashiro, Efficient and oxygen-independent hydrolysis of single-stranded DNA by cerium (IV) ion, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.2*, (1995) 269-274.
147. M.Komiyama, T.Shiiba, T.Kodama, N.Takeda, J.Sumaoka, M.Yashiro, DNA hydrolysis by cerium (IV) does not involve either molecular oxygen or hydrogen peroxide, *Chem.Lett.*, (1994) 1025-1028.

148. J.Sumaoka, S.Miyama, M.Komiyama, Enormous acceleration by cerium(IV) for the hydrolysis of nucleoside 3',5'-cyclic monophosphates at pH 7, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, (1994) 1755-1756.
149. M.Komiyama, K.Matasumura, Y.Matsumoto, Unprecedentedly fast DNA hydrolysis by the synergism of the cerium(IV)-praseodymium(III) and the cerium(IV)-neodymium(III) combinations, *Chem.Lett.*, (1996) 599-600.
150. M.Komiyama, N.Takeda, Y.Takahashi, H.Uchida, T.Shiiiba, T.Kodama, M.Yashiro, Efficient and oxygen-independent hydrolysis of single-stranded DNA by cerium (IV) ion, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.2*, (1995) 269-274.
151. R.A.Moss, K.G.Ragunathan, An unusually reactive phosphodiester, *Tetrahedron Lett.*, **41** (2000) 3275-3278.
152. C.Wang, S.Choudhary, C.B.Vink, E.A.Secord, J.R.Morrow, Harnessing thorium (IV) as a catalyst: RNA and phosphate diester cleavage by a thorium (IV) macrocyclic complex, *J.Chem.Soc., Chem.Comm.*, (2000) 2509-2510.
153. T.Ihara, H.Shimura, K.Ohmori, H.Tsuji, J.Takeuchi, M.Takagi, Hydrolysis of nucleotides using actinoid metal ion, *Chem.Lett.*, (1996) 687-688.
154. E.Stulz, C.Leumann, X-ray structure and solvolytic activity towards phosphate diesters of a zirconium(IV) complex, *Chem.Comm.*, (1999) 239-240.
155. R.Ott, R.Krämer, Rapid phosphodiester hydrolysis by zirconium (IV), *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.*, **37**, (1998) 1957-1960.
156. R.A. Moss, K. J.Zhang, Actinide (uranyl) hydrolysis of phosphodiester, *Chem.Comm.*, (1997) 563-564.
157. D.A.Silverman, S.Lindskog, The catalytic mechanism of carbonic anhydrase, *Acc.Chem.Res.*, **21** (1988) 30-36.
158. F.A.Cotton, E.E.Hazen, M.J.Legg, Staphylococcal nuclease: proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3'5'-biphosphate-calcium ion complex at 1.5-Å resolution, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **76** (1979) 2551-2555.
159. R.B.McComb, G.N.Bowers, Jr., Alkaline phosphatase, Plenum, New York, 1979.
160. J.B.Vincent, G.L.Olivier-Lilley, B.A.Averil, Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective, *Chem.Rev.*, **90** (1990) 1447-1467.
161. S.J.Lyle, Md.M.Rahman, Complexometric titration of yttrium and the lanthanons I. A comparison of direct methods, *Talanta*, **10** (1963) 1177-1182.

162. (a) A.E.Martell, R.J.Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, Segunda edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992; (b) P. Gans, A. Sabatini y A. Vacca, Investigation of equilibria in solution. determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta*, **43** (1996) 1739-1753; (c) L.Alderighi, P.Gans, A Ienco, D.Peters, A.Sabatini, A.Vacca, Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species, *Coord.Chem.Rev.*, **184** (1999) 311-318.
163. Con frecuencia se supone que el electrodo de vidrio calibrado con amortiguadores estándares mide $\text{pH} = -\log a_{\text{H}}$, donde a_{H} es la actividad de protones. Hay que hacer dos aclaraciones respecto de esto. Primero, los valores de a_{H} de los amortiguadores estándares no son, de hecho no pueden ser, determinados experimentalmente, sino que son asignados con base en ciertas hipótesis. Segundo, un análisis del sentido real de la escala de pH establecida mediante del uso de estos amortiguadores indica que el valor de pH no coincide ni con $-\log a_{\text{H}}$, ni con $-\log[\text{H}^+]$. Por esto es más correcto calibrar el electrodo en la escala de $-\log[\text{H}^+]$ que puede realizarse experimentalmente (Ver Ref.164).
164. H.Sigel, A.D.Zuberbiller, O.Yamauchi, Comments on potentiometric pH titrations and the relationship between pH-meter reading and hydrogen ion concentration, *Anal.Chim.Acta*, **38** (1991) 63-72.
165. A.Johansson, S.Johansson, Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant. Part III. Use of linear equations to calculate equivalence volumes in acid-base titrations, *Analyst*, **103** (1978) 305-316.
166. G.Charlot, *Les Méthodes de la Chimie Analytique*, Cuarta edición, Masson, Estados Unidos, 1961.
167. (a) A.K.Covington, M.Paabo, R.A.Robinson, R.G.Bates, Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (pD_D) scale and the operational pH in heavy water, *Anal.Chem.*, **40** (1968) 700-706. (b) K. Mikkelsen, S.O.Nielsen, Acidity measurements with the glass electrode in H_2O - D_2O mixtures, *J.Am.Chem.Soc.*, **64** (1960) 632-637.
168. R.G.Bates, *Determination of pH. Theory and practice*, Segunda edición, Wiley, Nueva York, 1973, 251-253 y 375-376.

169. C.S.Allen, C.-L.Chuang, M.Cornebise, J.W.Canary, Electrospray mass spectrometry and X-ray crystallography studies of divalent metal ion complexes of tris(2-pyridylmethyl)amine, *Inorg.Chim.Acta*, **239** (1995) 29-37.
170. G.Hopfgartner, C.Piguet, J.D.Henion, Ion spray tandem mass-spectrometry of supramolecular coordination-complexes, *J.Am.Soc.Mass Spectrom.*, **5** (1994) 748-756 (y referencias ahí citadas).
171. W.P.Jencks, Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation, *J.Am.Chem.Soc.*, **81** (1959) 475-481.
172. C.P.Gómez Tagle Chávez, Reactividad hidrolítica de la 2,6-diacetilpiridindioxima en presencia de iones metálicos, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1997.
173. D.H.Kim, S.S.Lee, origin of rate-acceleration in ester hydrolysis with metalloprotease mimics, *Bioorg.Med.Chem.*, **8** (2000) 647-652.
174. J.Xia, Y.Xu, S.Li, W.Sun, K.Yu, W.Tang, Carboxy ester hydrolysis promoted by a zinc(II) 2-[bis(2-aminoethyl)amino]ethanol complex: a new model for indirect activation on the serine nucleophile by zinc(II) in zinc enzymes, *Inorg.Chem.*, **40** (2001) 2394-2401.
175. G.E.Means, M.L.Bender, acetylation of human-serum albumin by para-nitrophenyl acetate, *Biochemistry*, **14** (1975) 4989-4995.
176. P.Bhargara, M.Tyagi, Studies on the complexes of some transition metals with 2,3-butanedione monoxime, *Indian J.Chem.*, **25A** (1986) 193-195.
177. D.Mojon, W.Zhang, H.Oetliker, Inhibition by 2,3-butanedione monoxime of mitochondrial ADP-dependent respiration and muscle contraction, *Biochem.Mol.Biol.Int.*, **31** (1993)501-507.
178. L.C.Sellin, J.J.McArdle, P.Taylor, L.Wong, Z.Radic, I.Tsigenly, R.Bruggemann, N.A.Hosea, A.H.Berman, D.L.Sudakin, M.E.Mullins, B.Z.Horowitz, V.Abshier, L.Letzig, Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime, *Pharmacol.Toxicol.*, **74** (1994) 305-313.
179. M.T.Stapleton, C.M.Fuchsbauer, A.P.Allshire, BDM drives protein dephosphorylation and inhibits adenine nucleotide exchange in cardiomyocytes, *Am.J.Physiol. (Heart Circ.Physiol 44)*, **275** (1998) H1260-H1266.

180. S.C.Armstrong, C.E.Gangote, Effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on contracture and injury of isolated rat myocytes following metabolic inhibition and ischemia, *J.Mol.Cell.Cardiol.*, **23** (1991) 1101-1104.
181. H.Higuchi, S.Takemori, Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle, *J.Biochem.(Tokyo)*, **105** (1989) 638-643.
182. J.R.Wiggins, J.Reiser, D.Fitzpatrick, J.L.Bergey, Inotropic actions of diacetyl monoxime in cat ventricular muscle, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **212** (1980) 217-224.
183. A.K. Yatsimirsky, P. Gómez Tagle, S. Escalante-Tovar, L. Ruiz-Ramirez, Kinetics and mechanism of ester hydrolysis by metal complexes of 2,6-diacetyl pyridine dioxime, *Inorg.Chim.Acta*, **273** (1998) 167-174.
183. F.McC.Blewett, P.Watts, The yttrium catalysed hydrolysis of acid phosphonate esters, *J.Chem.Soc.(B)* 1971, 881.
184. Y.Kitamura, T.Itoh, Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. Prediction of pressure dependence of pH and pOH, *J.Solut.Chem.*, **16** (1987) 715-725.
185. C.Bazzicalupi, A.Benchini, E.Berni, A.Bianchi, V.Fedi, V.Fusi, C.Giorgi, P.Paoletti, B.Valtancoli, Carboxy and diphosphate ester hydrolysis by a dizinc complex with a new alcohol-pendant macrocycle, *Inorg.Chem.* **38**, (1999) 4115-4122.
186. R.Delgado, J.J.R.Frausto Da Silva, M.T.S.Amorim, M.F.Cabral, S.Chaves, J.Costa, Dissociation constants of Bronsted acids in D₂O and H₂O: studies on polyaza and polyoxa-polyaza macrocycles and a general correlation, *Anal.Chim.Acta*, **245**, (1991), 271-282.
187. J.-M.Pfefferlé, J.-C.G.Bünzli, Interaction between the buffer Tris and the Eu(III) ion-luminiscence and potentiometric investigation, *Helv.Chim.Acta.*, **72** (1989) 1487-1494.
188. S.S.Massoud, H.Sigel, Metal ion coordinating properties of pyrimidine-nucleoside 5'-monophosphate (CMP, UMP, TMP) and of simple phosphate monoesters including D-ribose 5'-monophosphate – establishment of relations between complex stability and phosphate basicity, *Inorg.Chem.*, **27** (1988) 1447-1494.
189. P.Scrimin, G.Ghirlanda, P.Tecilla, R.A.Moss, Comparative reactivities of phosphate ester cleavages by metallomicelles, *Langmuir*, **12** (1996) 6235-6241.

190. J.B.Cunniff, P.Vouros, False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry, *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* **6** (1995) 437-447.
191. S.G.Lias, J.E.Bartmess, J.F.Liebman, J.L.Holmes, R.D.Levin, W.G.Mallard, Gas phase ion and neutral thermochemistry, *J.Phys. Chem. Ref. Data Suppl.*, **17** (1998) 1-861.
192. (a) A.Bencini, E.Berni, A.Bianchi, V.Fedi, C.Giorgi, P.Paoletti, B.Valtancoli, Carboxy and diphosphate ester hydrolysis promoted by dinuclear zinc(II) macrocyclic complexes. Role of Zn(II)-bound hydroxide as the nucleophilic function, *Inorg.Chem.*, **38** (1999), 6323-6325; (b) C.Bazzicalupi, A.Benchini, A.Bianchi, V.Fusi, C.Giorgi, P.Paoletti, B.Valtancoli, D.Zanchi, Carboxy and phosphate esters cleavage with mono- and dinuclear zinc(II) macrocyclic complexes in aqueous solution. Crystal structure of $[Zn_2L1(\mu-PP^-)_2(MeOH)_2](ClO_4)_2$ L1= [30]aneN₆O₄, PP⁻ =diphenyl phosphate, *Inorg.Chem.*, **36** (1997) 2784-2790.
193. T.Koike, E.Kimura, Roles of zinc(II) ion in phosphatases. A model study with zinc(II) macrocyclic polyamine complexes, *J.Am.Chem.Soc.*, **113** (1991) 8935-8941.
194. S.J.Oh, K.H.Song, D.Whang, K.Kim, T.H.Yoon, H.Moon, J.W.Park, Catalytic hydrolysis of phosphate diesters by lanthanide(III) cryptate (2.2.1) complexes, *Inorg.Chem.*, **35** (1996) 3780-3785.
195. I.H.Segel, *Enzyme Kinetics; Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, Wiley, Nueva York, (1993).
196. S.Ba-Saif, A.K.Luthra, A.Williams, Concertedness in acyl group transfer in solution: a single transition state in acetyl group transfer between phenolate ion nucleophiles, *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (1987) 6362-6368.
197. R.W.Hay, R.Bembi, The $[Cu([15]aneN_5)OH]^{2+}$ promoted hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate, *Inorg.Chim.Acta*, **64** (1982) L179-L181.
198. (a) G.E.Lienhard, *Science*, **180** (1973) 149-154. (b) Tee, O.S. *Adv.Phys.Org.Chem.*, **1994**, **29**, 1-199. (c) A.J.Kirby, Enzyme mechanisms, models and mimics, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **35**, (1996) 707-724.
199. J.L.Kurz, Transition states as acids and bases, *Acc.Chem.Res.*, **5** (1972) 1-9.
200. W.L.Koltun, M.Fried, F.R.N.Gurd, Coordination complexes and catalytic properties of proteins and related substances. IV.Reactions of glycine-containing dipeptides with cupric ion and with *p*-nitrophenyl acetate, *J. Am. Chem. Soc.*, **82** (1960) 233-241.

201. P.E.Jurek, A.E.Martell, Catalysis of hydrolysis of a phosphate diester by mono- and dinuclear macrocyclic zinc (II) complexes, *Inorg.Chim.Acta*, **287**, (1999) 47-51.
202. J.Sambrook, D.W.Russell, *Molecular cloning. A laboratory manual*, Vol.3.cap.5 Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis, Cold Spring Harbor Laboratories Press, Tercera edición, China 2001.
203. L.A.Basile, A.L.Raphael, J.K.Barton, Metal-activated hydrolytic cleavage of DNA, *J.Am.Chem.Soc.*, **109** (1987) 7550-7551.
204. S.Takenaka, T.Ihara, M.Tagaki, Cleavage of double helical DNA by Cu²⁺ ion in the presence of the bisintercalator containing penta(ethylene glycol) connector chain, *J.Mol.Recognit.*, **3** (1990) 156-162.
205. N.Hayashi, N.Takeda, T.Shiiba, M.Yashiro, K.Watanabe, K.Komiyama, Site-selective hydrolysis of tRNA by lanthanide metal ions, *Inorg.Chem.*, **32** (1993) 5899-5900.
206. N.E.Dixon, R.J.Geue, J.N.Lambert, S.Moghaddas, D.A.Pearce, A.M.Sargeson, DNA hydrolysis by stable metal complexes, *Chem.Commun.*, (1996) 1287-1288.
207. T.Itoh, H.Hisada, T.Sumiya, M.Hosono, Y.Usui, Y.Fujii, Hydrolytic cleavage of DNA by a novel copper (II) complex with *cis,cis*-1,3,5-triaminocyclohexane, *Chem.Commun.*, (1997) 677-678.
208. A.Sreedhara, J.D.Freed, J.A.Cowan, Efficient inorganic deoxyribonucleases. Greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage, *J.Am.Chem.Soc.*, **122** (2000) 8814-8824.
209. P.Gómez-Tagle, A.K.Yatsimirsky, Kinetics of phosphodiester hydrolysis by lanthanide ions in weakly basic solutions, *J.Chem.Soc.,Dalton Trans*, (1998) 2957-2959.

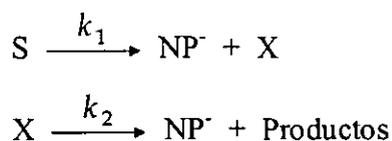
ANEXOS

A1. Modelos cinéticos

A1.1. Modelo cinético de hidrólisis sucesivas para BNPP.

Bajo algunas condiciones de reacción el perfil de absorbancia vs. tiempo para la hidrólisis de BNPP se desvía de una curva cinética de primer orden: para reacciones lentas es lineal aunque se ha formado irreversiblemente más del 50% de un equivalente de nitrofenolato, y para reacciones más rápidas la curva cinética llega a un valor constante de absorbancia al tiempo “infinito”, sino que se observa un gradual aumento. Debido a que la formación de nitrofenolato a partir de la ruptura de BNPP no es un proceso reversible, no se observa ningún precipitado y el pH se mantiene constante durante toda la reacción, resulta lógico buscar otro de modelo que describa estos perfiles.

La hidrólisis total de BNPP produce dos equivalentes de nitrofenolato (NP⁻) pero debido a que la ruptura del primer grupo éster para el fosfodiéster BNPP produce un fosfomonoéster, la constante de velocidad e incluso el mecanismo mediante el cual transcurren la primera y segunda ruptura pueden ser diferentes. Considerando esto, se planteó el siguiente esquema de reacción:



en donde S es el sustrato, BNPP, y X es el intermediario formado después de la primera liberación de nitrofenolato. En este esquema, si $k_2 \gg k_1$ el intermediario X no se alcanza a acumular, y la curva cinética observada es de primer orden ($n=2$ para BNPP):

$$[\text{NP}^-] = n[S]_0(1 - e^{-k_1 t}) \quad (\text{A1.1})$$

Sin embargo si $k_2 \sim k_1$ la velocidad de formación del segundo equivalente de nitrofenolato depende de la concentración del intermediario X, que al inicio de la reacción es cero, y cuya acumulación depende de la relación entre las constantes k_1 y k_2 .

$$\frac{d[\text{NP}^-]}{dt} = k_2[X] \quad (\text{A1.2})$$

y la ecuación cinética para este segundo nitrofenolato sería:

$$\frac{d[NP^-]}{dt} = \frac{k_2 k_1 [S]_0}{k_1 - k_2} (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \quad (\text{A1.3})$$

Por lo tanto la concentración total del nitrofenolato, observada en todo momento, debe corresponder a la suma de ambas reacciones:

$$[NP^-]_{\text{total}} = [S]_0 \left\{ (1 - e^{-k_1 t}) + \frac{k_2 k_1}{k_1 - k_2} \begin{pmatrix} e^{-k_2 t} & - e^{-k_1 t} \\ -k_2 & k_1 \end{pmatrix} \right\} \quad (\text{A1.4})$$

reordenando los términos en los paréntesis, y usando un denominador comun:

$$[NP^-]_{\text{total}} = [S]_0 \left\{ (1 - e^{-k_1 t}) + \frac{k_1 (1 - e^{-k_2 t}) - k_2 (1 - e^{-k_1 t})}{k_1 - k_2} \right\}$$

$$[NP^-]_{\text{total}} = [S]_0 \left\{ 2 + \frac{(2k_2 - k_1)e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_1 - k_2} \right\} \quad (\text{A1.6})$$

En el límite cuando $k_2 \gg k_1$ para la ecuación A1.6, obtenemos la ecuación A1.1 con $n=2$. Finalmente, sustituyendo la concentración de nitrofenolato en la expresión de la absorbancia para la curva de A vs. t y considerando que la absorbancia a tiempo infinito, corresponde a la concentración total de sustrato por el coeficiente de absorptividad molar del nitrofenolato a un pH dado, $A_\infty = \varepsilon_{NP^-} [S]_0$ tenemos:

$$A = \varepsilon_{NP^-} [NP^-]_{\text{total}} = A_\infty \left\{ 2 + \frac{(2k_2 - k_1)e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_1 - k_2} \right\} \quad (7.1)$$

La figura A1.1 muestra un ejemplo comparativo entre los ajustes con las ecuaciones A1.1 y A1.7.

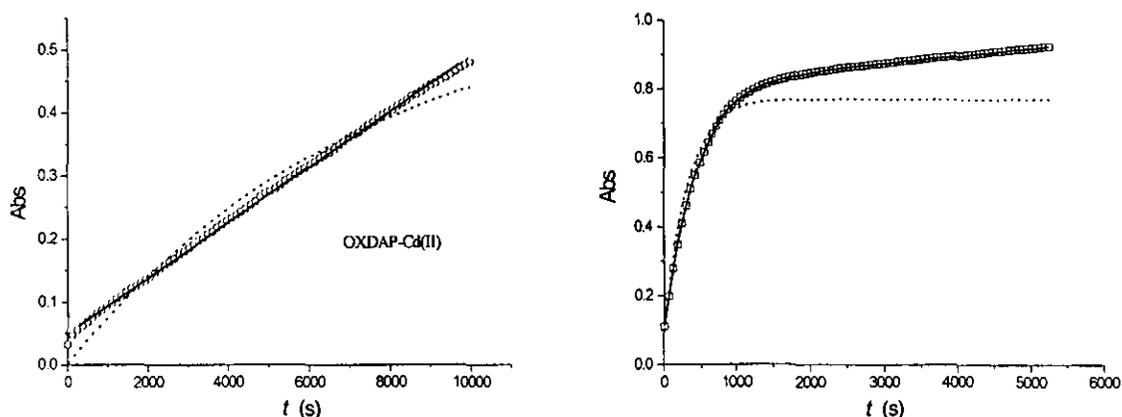
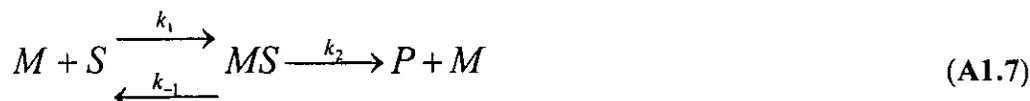


Fig.A1.1. Curvas cinéticas para la hidrólisis de BNPP a 25°C. (a) OXDAP 10 mM y Cd(II) 10 mM a pH 8.0. (b) BTP 20 mM, Y(III) 2.7 mM a pH 8.5. La línea continua muestra el ajuste al modelo cinético de hidrólisis sucesivas, ecuación (7.1). La línea punteada muestra el ajuste a la ecuación A1.1.

A1.2. Modelo cinético tipo Michaelis-Menten

Michaelis y Menten desarrollaron el primer tratamiento matemático satisfactorio del efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente; este tratamiento incorpora el concepto de la formación de un complejo enzima-sustrato. Los esquemas cinéticos que asumen la formación reversible de un intermediario catalizador-sustrato, seguidos de una descomposición de primer orden del complejo hacia el producto, dan ecuaciones cinéticas tipo Michaelis-Menten.

Considerando este esquema de reacción:



donde M es el metal o catalizador, S el sustrato, MS el complejo metal-sustrato y P el producto que se forma. La velocidad de formación del producto está definida como

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[MS] \quad (\text{A1.8})$$

y la velocidad de formación del complejo como:

$$\frac{d[MS]}{dt} = -k_2[MS] + k_1[M][S] - k_{-1}[MS] \quad (\text{A1.9})$$

Asumiendo un estado estacionario para MS

$$\frac{d[MS]}{dt} = 0 \quad (\text{A1.10})$$

por lo tanto

$$k_2[MS] + k_{-1}[MS] = k_1[M][S]$$

o bien

$$[MS](k_{-1} + k_2) = k_1[M][S] \quad (\text{A1.11})$$

De los balances de masa para el sustrato y para el metal tenemos:

$$[S]_{\text{T}} = [S] + [MS] \quad (\text{A1.12}) \quad [M]_{\text{T}} = [M] + [MS] \quad (\text{A1.13})$$

en donde los $[S]_{\text{T}}$ y $[M]_{\text{T}}$ representan las concentraciones totales. Despejando la $[MS]$ de la ecuación A1.12 y substituyéndola en A1.11

$$([S]_{\text{T}} - [S])(k_{-1} + k_2) = k_1[M][S] \quad (\text{A1.14})$$

En este trabajo se empearon siempre en condiciones de exceso de metal y de ligante sobre el sustrato, $[M] \gg [S]$, por lo tanto se puede considerar que

$$[M]_{\text{T}} \approx [M] \quad (\text{A1.15})$$

Introduciendo A1.15 en A1.14 y reorganizando:

$$[S]_{\text{T}}(k_{-1} + k_2) - [S](k_{-1} + k_2) = k_1[M]_{\text{T}}[S]$$

$$[S]_{\text{T}}(k_{-1} + k_2) = [S](k_{-1} + k_2 + k_1[M]_{\text{T}})$$

$$[S] = \frac{[S]_{\text{T}}(k_{-1} + k_2)}{k_{-1} + k_2 + k_1[M]_{\text{T}}}$$

$$[S] = \frac{[S]_{\text{T}}}{1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[M]} \quad (\text{A1.16})$$

Ahora bien, la constante de Michaelis se define como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{A1.17})$$

y al sustituirla en A1.16 y reorganizando la expresión, tenemos

$$[S] = \frac{K_M [S]_T}{K_M + [M]_T} \quad (\text{A1.18})$$

Sustituyendo la $[MS]$ despejada de A1.12 y la $[S]$ de A1.18 en A1.8 se obtiene la expresión A1.19 análoga a la de Michaelis-Menten:

$$\begin{aligned} v &= k_2 [MS] = k_2 ([S]_T - [S]) \\ v &= k_2 \left([S]_T - \frac{K_M [S]_T}{K_M + [M]_T} \right) \\ v &= \frac{k_2 [S]_T [M]_T}{K_M + [M]_T} \end{aligned} \quad (\text{A1.19})$$

La velocidad para una reacción bajo condiciones de primer orden puede expresarse como

$$v = k_{obs} [S]_T \quad (\text{A1.20})$$

Empleando las ecuaciones A1.20 y A1.19 es sencillo mostrar que la constante de velocidad observada, cuando se tiene una cinética tipo Michaelis-Menten (k_2 es k_{cat}) y se trabaja con $[M] \gg [S]$ corresponde a A1.21.

$$k_{obs} = \frac{k_{cat} [M]_T}{K_M + [M]_T} \quad (\text{A1.21})$$

A2. Derivación del modelo de equilibrios BTP-Ln(III) a partir de los experimentos de titulación potenciométrica y datos de las titulaciones.

La derivación del modelo de equilibrio elegido para la complejación de BTP con lantánidos en medio básico, a partir de los datos de las titulaciones potenciométricas realizadas, se ejemplifica con los resultados para gadolinio(III) debido a que fue el caso más complicado: se necesitaron cuatro parámetros de variables para ajustar las curvas. (Para Gd(III) todos los complejos $M_2(BTP)_2(OH)_n$ con $n=2, 4, 5$ y 6 contribuyen significativamente a la concentración total del metal mientras que para otros lantánidos solamente fueron significativos tres de ellos) La figura A2.1 muestra los puntos experimentales y cuatro ajustes preliminares a modelos con un solo complejo mononuclear de composición $Gd(BTP)OH_n^{3-n}$ ($n=0-3$).

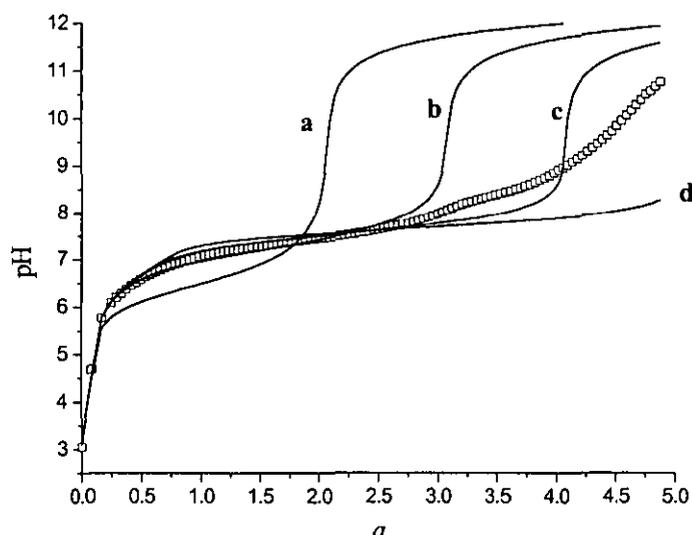
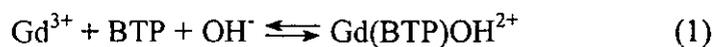


Fig. A2.1. Curva de titulación de una disolución con BTP 10 mM y perlorato de Gd(III) 10 mM en $NaClO_4$ 0.1 mM. Se adicionaron dos equivalentes de $HClO_4$ al inicio de la titulación. a es el número de equivalentes de $NaOH$ adicionados. Los cuadrados vacíos son los datos experimentales. Las líneas a a d son los mejores ajustes logrados con *Hyperquad* considerando la formación de los siguientes complejos: (a) $Gd(BTP)^{3+}$, (b) $Gd(BTP)(OH)^{2+}$, (c) $Gd(BTP)(OH)_2^+$ y (d) $Gd(BTP)(OH)_3$.

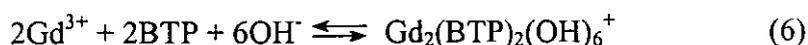
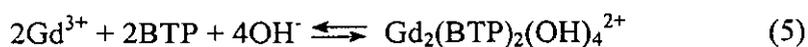
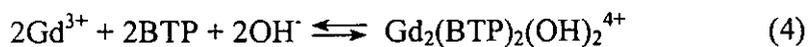
Los modelos con $n=0-2$, estiman el número total de protones a titular por debajo de lo que indican los puntos experimentales: las curvas teóricas muestran puntos de equivalencia para valores de $a=2, 3$ y 4 respectivamente, cuando la titulación es evidentemente incompleta. Sin embargo, al ir a un valor de $n=3$, la curva de ajuste es demasiado tendida. En todos los casos la desviación respecto a los datos experimentales es muy alta.

Evidentemente el modelo que se requiere debe involucrar la formación de complejos hidroxido. El ajuste del modelo que considera los tres hidroxocomplejos anteriores, equilibrios (1) a (3), se muestra en la Fig.A2.2 curva "a".



La calidad de este modelo es mucho mejor, especialmente por debajo de pH 8.0, pero muestra una desviación substancial a pH más alto, donde es lógico esperar que los hidroxocomplejos se formen a mayores concentraciones. En la figura A.2.3. curva "a", se muestra una amplificación de la región de la curva de titulación a pH mayor a 8. Sin embargo un análisis cuidadoso de este modelo, indica en qué dirección puede ser mejorado. Primero, los datos experimentales muestran una mayor curvatura hacia arriba que la curva de ajuste, lo que indica que posiblemente existan complejos de orden más alto, es decir, mayor número de especies que se asocien, y por lo tanto debe considerarse la formación de complejos polinucleares. Segundo, hay un punto de inflexión en $\alpha=4.5$, en donde además de los 2 equivalentes de NaOH por equivalente de ligante (doblemente protonado al inicio) se han consumido 2.5 equivalentes de OH^- por equivalente de metal. Esta inflexión no está presente en la curva teórica, e indica la formación de un complejo relativamente estable de estequiometría $\text{Gd}:\text{OH}^-=1:2.5$, lo cual implica, lógicamente, la formación de complejos dinucleares de estequiometría 2:5.

Por lo tanto, como un siguiente paso, se consideraron modelos con complejos dinucleares. Inicialmente se consideró probar un modelo con la estequiometría del modelo, simplemente duplicando las relaciones entre el metal y el ligante, equilibrios (4)-(6):



El ajuste a este modelo se muestra en la Fig.A2.3 curva "b". El perfil de este ajuste es más cercano a los datos experimentales pero aun no describe correctamente la zona alrededor de $\alpha=4.5$. Finalmente la inclusión de un complejo con estequiometría 2:5, equilibrio (7), en el modelo de ajuste permite lograr un muy buen ajuste con un nivel de 95% de confianza, mostrado por la curva "c" en las figuras A2.2 y A2.3.

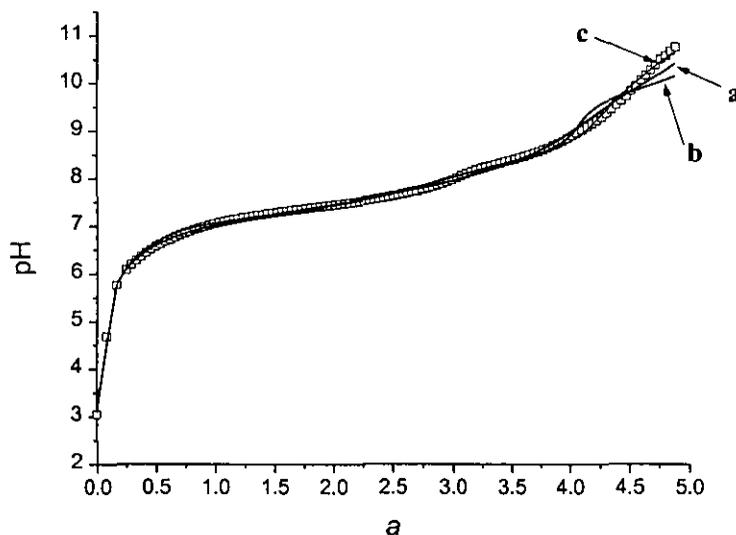


Fig.A2.2. Ajuste de la curva de titulación de la Fig.A2.1. Los modelos de ajuste involucran las etapas de formación para complejos: (a) monoméricos $\text{Gd}(\text{BTP})(\text{OH})_n^{3-n}$ donde $n=1, 2, 3$; (b) diméricos $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ donde $n=2, 4, 6$; (c) diméricos $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ donde $n=2, 4, 5, 6$.

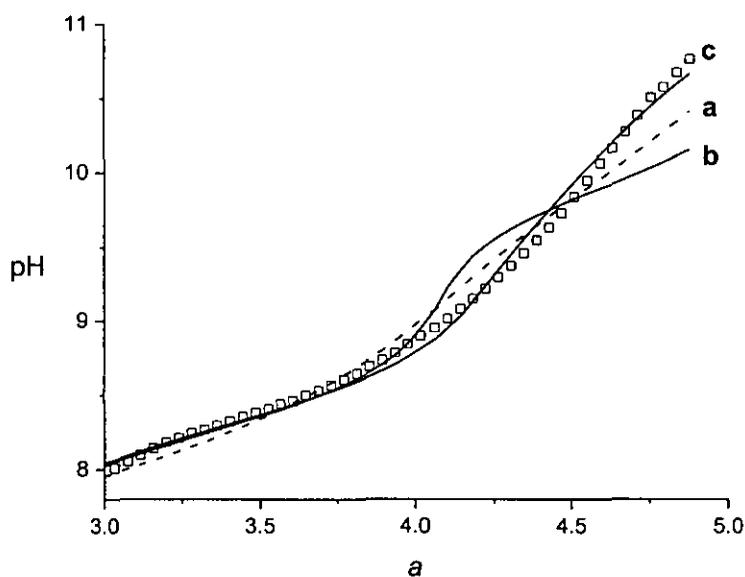
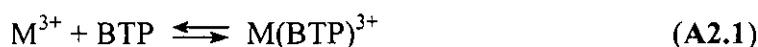


Fig.A2.3. Ampliación de la Fig.A2.2. Los modelos de ajuste involucran las etapas de formación para complejos: (a) monoméricos $\text{Gd}(\text{BTP})(\text{OH})_n^{3-n}$ donde $n=1, 2, 3$; (b) diméricos $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ donde $n=2, 4, 6$; (c) diméricos $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ donde $n=2, 4, 5, 6$.

A este punto, vale la pena hacer consideraciones sobre varios aspectos. Uno obviamente debe probar un modelo más complicado que involucra la formación de complejos mononucleares y dinucleares. Técnicamente esto es posible porque se usaron 120 puntos experimentales y esto nos permite determinar simultáneamente más de cuatro parámetros de ajuste. Sin embargo, los intentos realizados de ajustar los resultados con este modelo extendido muestran una fuerte interdependencia entre los parámetros y no se logró hacer ninguna mejora en la calidad del ajuste cuando algunos de los parámetros de este modelo se fijaron. Aun el complejo simple, $M(\text{BTP})^{3+}$ sin ligantes hidroxilo (ecuación A2.1), fue rechazado por el programa de ajuste (*Hyperquad 2000*). Este complejo ciertamente debe existir, pero evidentemente contribuye de forma insignificante a la concentración total del metal.



Entre los modelos probados, se consideró también la posibilidad de que existan especies con diferentes relaciones metal:BTP. Para ello, se plantearon modelos que incluyen la formación subsecuente de complejos con estequiometría: $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ con una relación metal:BTP = 2:2, $\text{Gd}_2(\text{BTP})_3(\text{OH})_n^{6-2n}$ con una relación metal:BTP = 2:3 y $\text{Gd}_2(\text{BTP})(\text{OH})_n^{6-2n}$ con una relación metal:BTP = 2:1. La figura A2.4 muestra las curvas de ajuste para estos tres modelos.

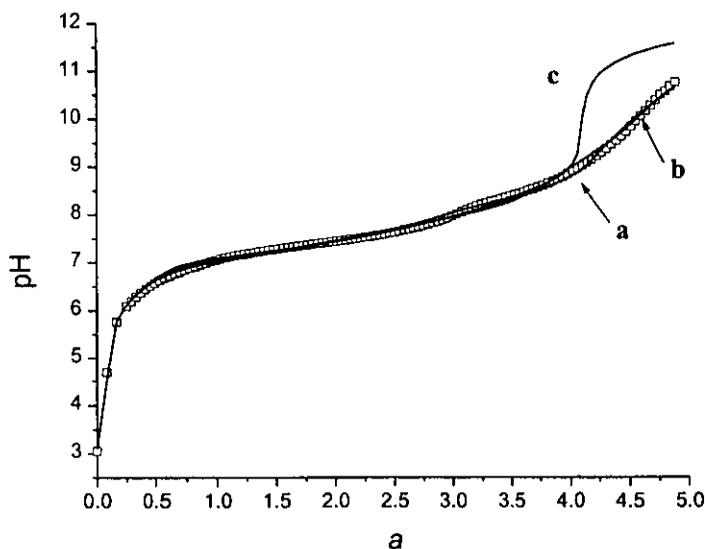


Fig.A2.4. Ajuste de los datos de la figura A2.1 a los modelos que involucran la formación sucesiva de complejos hidroxilo dinucleares con diferentes relaciones metal:ligante. (a) $\text{Gd}_2(\text{BTP})(\text{OH})_n^{6-2n}$, (b) $\text{Gd}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-2n}$ y (c) $\text{Gd}_2(\text{BTP})_3(\text{OH})_n^{6-2n}$ con valores de $n=2,4,5,6$.

Evidentemente los complejos de composición $Gd_2(BTP)_3(OH)_n^{6-2n}$ pueden ser excluidos, curva "c". También se probaron relaciones más altas para el ligante (BTP:Gd): 4:2 y 5:2 y los ajustes logrados fueron peores. Sin embargo, la diferencia en la calidad del ajuste para los complejos con relaciones Gd:BTP 2:2 y 2:1 es insignificante. En principio, seira posible discriminar entre estos dos modelos mediante la titulación de mezclas Gd-BTP con un exceso de metal respecto al ligante, pero desafortunadamente, esto es imposible debido a la precipitación del hidróxido del metal.

Por otro lado, las curvas de distribución de especies generadas con ambos dos modelos (Gd:BTP 2:2 y 2:1) son muy similares entre sí, y por lo tanto la interpretación de los resultados cinéticos sería esencialmente la misma en términos de cualquiera de estos dos modelos. Sin embargo, la información obtenida de los experimentos realizados en ESI-MS, concuerda mejor con la presencia de especies con una relación metal:ligante 2:2. Finalmente, resulta más razonable desde el punto de vista químico elegir un modelo que contempla complejos de composición más simétrica, Gd:BTP 2:2.

Tabla A2.1 Curvas de titulación para disoluciones con BTP 10 mM y perclorato de lantánido 10 mM en NaClO₄ 0.1 M a 25.0°C

Punto No.	mL NaOH (M)	La (0.209)	Pr (0.209)	Nd (0.202)	Eu (0.202)	Gd (0.205)	Dy (0.201)
1	0.0	3.194	2.026	6.8077	2.3434	3.0465	2.4577
2	0.1	4.208	2.049	---	---	---	2.4947
3	0.2	5.386	2.073	6.9147	2.4324	4.6805	2.5397
4	0.3	5.726	2.095	6.9607	2.4824	---	2.5917
5	0.4	5.933	2.121	7.0087	2.5434	5.7595	2.6477
6	0.5	6.086	2.149	7.0567	2.6104	---	2.7137
7	0.6	6.210	2.176	7.1037	2.6914	6.0795	2.7957
8	0.7	6.319	2.207	7.1477	2.7914	6.1885	2.8917
9	0.8	6.413	2.24	7.1917	2.9214	6.2785	2.9907
10	0.9	6.501	2.274	7.2327	3.1074	6.3625	3.0167
11	1.0	6.582	2.305	7.2687	3.4404	6.4395	3.1947
12	1.1	6.658	2.345	7.3057	4.6614	6.5055	3.5127
13	1.2	6.730	2.39	7.3427	5.5394	6.5675	4.5337
14	1.3	6.801	2.438	7.3787	5.8384	6.6215	5.3637
15	1.4	6.870	2.493	7.4097	6.0254	6.6725	5.8627
16	1.5	6.939	2.557	7.4417	6.1594	6.7185	6.0567
17	1.6	7.011	2.629	7.4737	6.2664	6.7635	6.1947
18	1.7	7.082	2.717	7.5007	6.3564	6.8055	6.3027
19	1.8	7.155	2.827	7.5277	6.4304	6.8435	6.3897
20	1.9	7.230	2.975	7.5507	6.4994	6.8825	6.4667
21	2.0	7.306	3.197	7.5737	6.5604	6.9175	6.5327
22	2.1	7.384	3.487	7.5947	6.6134	6.9525	6.5887
23	2.2	7.468	5.182	7.6147	6.6624	6.9845	6.6377
24	2.3	7.552	5.695	7.6317	6.7034	7.0125	6.6827
25	2.4	7.637	5.93	7.6517	6.7464	7.0405	6.7197
26	2.5	7.722	6.107	7.6677	6.7864	7.0675	6.7547

Punto No.	mL NaOH (M)	La (0.209)	Pr (0.209)	Nd (0.202)	Eu (0.202)	Gd (0.205)	Dy (0.201)
27	2.6	7.808	6.243	7.6857	6.8224	7.0915	6.7837
28	2.7	7.890	6.355	7.7017	6.8604	7.1125	6.8077
29	2.8	7.966	6.451	7.7157	6.8974	7.1345	6.8317
30	2.9	8.037	6.538	7.7297	6.9354	7.1535	6.8507
31	3.0	8.103	6.617	7.7457	6.9664	7.1725	6.8677
32	3.1	8.163	6.691	7.7597	6.9974	7.1905	6.8847
33	3.2	8.217	6.76	7.7737	7.0274	7.2075	6.9027
34	3.3	8.267	6.825	7.7857	7.0554	7.2225	6.9157
35	3.4	8.313	6.889	7.8007	7.0804	7.2375	6.9277
36	3.5	8.354	6.95	7.8147	7.1054	7.2535	6.9417
37	3.6	8.391	7.009	7.8287	7.1284	7.2675	6.9517
38	3.7	8.427	7.069	7.8417	7.1494	7.2825	6.9587
39	3.8	8.457	7.126	7.8577	7.1694	7.2965	6.9687
40	3.9	8.488	7.183	7.8857	7.1884	7.3105	6.9757
41	4.0	8.517	7.237	7.9007	7.2064	7.3245	6.9827
42	4.1	8.541	7.29	7.9147	7.2244	7.3385	6.9907
43	4.2	8.562	7.342	7.9287	7.2424	7.3505	7.0017
44	4.3	8.584	7.393	7.9457	7.2544	7.3645	7.0087
45	4.4	8.607	7.441	7.9597	7.2684	7.3795	7.0167
46	4.5	8.625	7.461	7.9757	7.2814	7.3915	7.0237
47	4.6	8.642	7.507	7.9947	7.2934	7.4035	7.0287
48	4.7	8.658	7.552	8.0117	7.3054	7.4155	7.0357
49	4.8	8.674	7.594	8.0297	7.3184	7.4285	7.0427
50	4.9	8.692	7.633	8.0477	7.3304	7.4405	7.0497
51	5.0	8.708	7.671	8.0647	7.3444	7.4545	7.0567
52	5.1	8.722	7.706	8.0827	7.3574	7.4665	7.0627
53	5.2	8.737	7.738	8.1027	7.3694	7.4805	7.0677
54	5.3	8.753	7.769	8.1237	7.3834	7.4945	7.0767
55	5.4	8.767	7.797	8.1447	7.3964	7.5105	7.0797

Punto No.	mL NaOH (M)	La (0.209)	Pr (0.209)	Nd (0.202)	Eu (0.202)	Gd (0.205)	Dy (0.201)
56	5.5	8.779	7.822	8.1677	7.4104	7.5245	---
57	5.6	8.792	7.847	8.1927	7.4224	7.5405	7.0937
58	5.7	8.806	7.868	8.2157	7.4374	7.5585	---
59	5.8	8.818	7.888	8.2447	7.4494	7.5745	7.1107
60	5.9	8.833	7.907	8.2687	7.4634	7.5915	---
61	6.0	8.846	7.925	8.2987	7.4784	7.6095	7.1277
62	6.1	8.860	7.942	8.3267	7.4924	7.6295	---
63	6.2	8.871	7.961	8.3577	7.5064	7.6505	7.1437
64	6.3	8.883	7.978	8.3877	7.5204	7.6715	---
65	6.4	8.895	7.994	8.4177	7.5364	7.6945	7.1607
66	6.5	8.906	8.012	8.4497	7.5524	7.7175	---
67	6.6	8.918	8.027	8.4807	7.5664	7.7415	7.1777
68	6.7	8.931	8.044	8.5087	7.5824	7.7665	---
69	6.8	8.943	8.058	8.5367	7.6024	7.7965	7.1947
70	6.9	8.954	8.074	8.5677	7.6184	7.8245	---
71	7.0	8.965	8.09	8.5957	7.6364	7.8575	7.2137
72	7.1	8.976	8.105	8.6257	7.6554	7.8915	---
73	7.2	8.985	8.119	8.6527	7.6774	7.9295	7.2337
74	7.3	8.996	8.135	8.6777	7.6964	7.9685	---
75	7.4	8.993	8.149	8.7067	7.7174	8.0095	7.2567
76	7.5	---	8.165	8.7327	7.7424	8.0535	---
77	7.6	---	8.181	8.7667	7.7664	8.0985	7.2807
78	7.7	---	8.196	8.7887	7.7924	8.1405	---
79	7.8	---	8.212	8.8137	7.8214	8.1815	7.3027
80	7.9	---	8.226	8.8507	7.8494	8.2095	---
81	8.0	---	8.242	8.8767	7.8794	8.2415	7.3317
82	8.1	---	8.258	8.9107	7.9124	8.2665	---
83	8.2	---	8.276	8.9467	7.9504	8.2925	7.3637
84	8.3	---	8.292	8.9917	7.9884	8.3225	---

Punto No.	mL NaOH (M)	La (0.209)	Pr (0.209)	Nd (0.202)	Eu (0.202)	Gd (0.205)	Dy (0.201)
85	8.4	---	8.311	9.0337	8.0344	8.3545	7.3997
86	8.5	---	8.329	9.0787	8.0824	8.3795	---
87	8.6	---	8.347	9.1277	8.1324	8.4065	7.4377
88	8.7	---	8.368	9.1737	8.1844	8.4375	---
89	8.8	---	8.386	9.2267	8.2234	8.4615	7.4837
90	8.9	---	8.407	9.2887	8.2644	8.4985	---
91	9.0	---	8.427	9.3527	8.3034	8.5295	7.5367
92	9.1	---	8.450	9.4237	8.3354	8.5665	---
92	9.2	---	8.475	9.5017	8.3614	8.6025	---
94	9.3	---	8.499	9.5757	8.3974	8.6465	---
95	9.4	---	8.523	9.6687	8.4224	8.6925	7.6807
96	9.5	---	8.55	9.7687	8.4544	8.7355	---
97	9.6	---	8.578	9.8837	8.4874	8.7845	---
98	9.7	---	8.606	10.0127	8.5194	8.8445	---
99	9.8	---	8.636	10.1237	8.5454	8.9005	7.7607
100	9.9	---	8.665	10.2587	8.5744	8.9545	---
101	10.0	---	8.697	10.3897	8.6094	9.0155	---
102	10.1	---	8.731	10.4967	8.6524	9.0815	---
103	10.2	---	8.763	10.5997	8.6874	9.1525	---
104	10.3	---	8.827	10.6887	8.7374	9.2185	---
105	10.4	---	8.857	10.7657	8.7774	9.2965	---
106	10.5	---	8.891	---	---	9.3735	---
107	10.6	---	8.916	---	8.8854	9.4595	---
108	10.7	---	8.944	---	---	9.5465	---
109	10.8	---	8.974	---	9.0124	9.6345	8.0337
110	10.9	---	9.005	---	---	9.7295	---
111	11.0	---	9.043	---	9.1704	9.8405	8.0337
112	11.1	---	9.066	---	---	9.9505	---
113	11.2	---	9.096	---	9.3084	10.0645	---

Punto No.	mL NaOH (M)	La (0.209)	Pr (0.209)	Nd (0.202)	Eu (0.202)	Gd (0.205)	Dy (0.201)
114	11.3	---	9.130	---	---	10.1675	---
115	11.4	---	9.165	---	9.4844	10.2785	8.2767
116	11.5	---	9.199	---	---	10.3865	---
117	11.6	---	9.238	---	9.6874	10.5065	---
118	11.7	---	9.285	---	---	10.5775	---
119	11.8	---	9.339	---	9.9274	10.6765	8.4827
120	11.9	---	9.381	---	---	10.7655	---
121	12.0	---	9.430	---	10.1804	10.7655	---
122	12.1	---	9.478	---	---		
123	12.2	---	9.536	---	10.4454	10.7655	8.7217
124	12.3	---	9.595	---	---	---	---
125	12.4	---	9.655	---	10.6874	---	---
126	12.5	---	9.723	---	---	---	---
127	12.6	---	9.796	---	10.8854	10.7655	8.9657
128	12.7	---	9.879	---	---	---	---
129	12.8	---	9.971	---	---	---	---
130	12.9	---	10.079	---	---	---	---
131	13.0	---	10.202	---	---	---	---
132	13.1	---	10.335	---	---	---	---
133	13.2	---	10.471	---	---	---	---
134	13.3	---	10.609	---	---	---	---
135	13.4	---	10.737	---	---	---	---
136	13.5	---	10.852	---	---	---	---
137	13.6	---	10.948	---	---	---	---
138	13.7	---	11.034	---	---	---	---
139	13.8	---	11.105	---	---	---	---

Tabla A2.2. Constantes de estabilidad acumulativas (*Hyperquad* β) para titulaciones de mezclas de BTP y perclorato de La(III) en relaciones metal:ligante 1:2 y 1:1 a 25°C en NaClO₄ 0.1 M. Todas las concentraciones se ajustaron al modelo MBTP(OH)_n.

L	OH ⁻	M	BTP 20.0 mM	BTP 10.0 mM	BTP 5.0 mM
			La ³⁺ 10.0 mM	La ³⁺ 10.0 mM	La ³⁺ 5.0 mM
			Log $\beta \pm$ sd	Log $\beta \pm$ sd	Log $\beta \pm$ sd
1	0	1	-- no --	2.26 \pm 0.02	2.01 \pm 0.06
1	1	1	6.29 \pm 0.05	6.77 \pm 0.05	6.52 \pm 0.03
1	2	1	15.06 \pm 0.04	15.34 \pm 0.03	-- no --
1	3	1	24.28 \pm 0.04	24.39 \pm 0.02	24.34 \pm 0.02
chi ²			33.68	4.27	15.98

Notas:

β , constantes de estabilidad acumulativas, definidas como un cociente de concentraciones.

L, número de ligantes BisTris propano

M, número de cationes metálicos de lantano

Tabla A2.3. Constantes de estabilidad acumulativas (*Hyperquad* β) para titulaciones de mezclas de BTP y perclorato de La(III) en relaciones metal:ligante 1:2 y 1:1 a 25°C en NaClO₄ 0.1 M. Todas las concentraciones se ajustaron al modelo M₂BTP(OH)_n.

L	OH ⁻	M	BTP 20.0 mM	BTP 10.0 mM	BTP 5.0 mM
			La ³⁺ 10.0 mM	La ³⁺ 10.0 mM	La ³⁺ 5.0 mM
			Log $\beta \pm$ sd	Log $\beta \pm$ sd	Log $\beta \pm$ sd
1	0	1	2.46 \pm 0.04	2.30 \pm 0.01	2.22 \pm 0.04
1	2	2	12.45 \pm 0.05	12.89 \pm 0.01	12.87 \pm 0.03
1	4	2	29.97 \pm 0.06	30.73 \pm 0.02	30.66 \pm 0.03
1	5	2	38.42 \pm 0.03	39.88 \pm 0.02	-- no --
chi ²			8.59	7.30	14.17

Notas:

β , constantes de estabilidad acumulativas, definidas como un cociente de concentraciones.

L, número de ligantes BisTris propano

M, número de cationes metálicos de lantano

Tabla A2.4. Constantes de estabilidad acumulativas (*Hyperquad* β) para titulaciones de mezclas de BTP y perclorato de La(III) en relaciones metal:ligante 1:2 y 1:1 a 25°C en NaClO₄ 0.1 M. Todas las concentraciones se ajustaron al modelo $M_2BTP_2(OH)_n$.

L	OH ⁻	M	BTP 20.0 mM La ³⁺ 10.0 mM Log $\beta \pm sd$	BTP 10.0 mM La ³⁺ 10.0 mM Log $\beta \pm sd$	BTP 5.0 mM La ³⁺ 5.0 mM Log $\beta \pm sd$
1	0	1	2.49 ± 0.03	2.35 ± 0.01	2.29 ± 0.03
2	2	2	9.89 ± 0.03	10.10 ± 0.01	9.94 ± 0.04
2	4	2	27.29 ± 0.03	28.17 ± 0.05	27.73 ± 0.03
2	5	2	36.39 ± 0.02	36.94 ± 0.02	-- no --
chi ²			18.11	4.92	15.68

Notas:

β , constantes de estabilidad acumulativas, definidas como un cociente de concentraciones.

L, número de ligantes BisTris propano

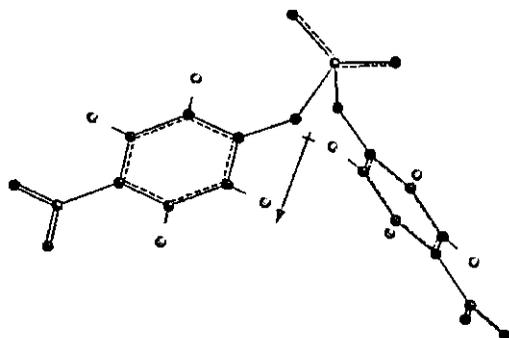
M, número de cationes metálicos de lantano

A3. Propiedades electrónicas de los sustratos y ligantes

Los cálculos de modelaje molecular se realizaron en el programa PC Spartan Pro (1999) de Wavefunction, Inc.

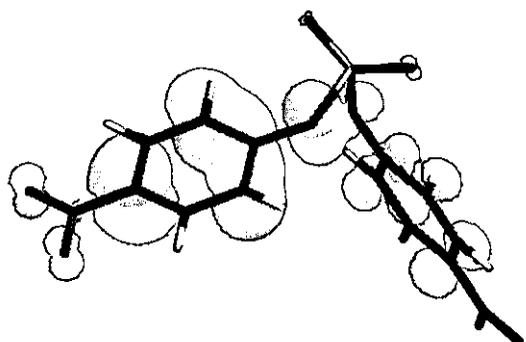
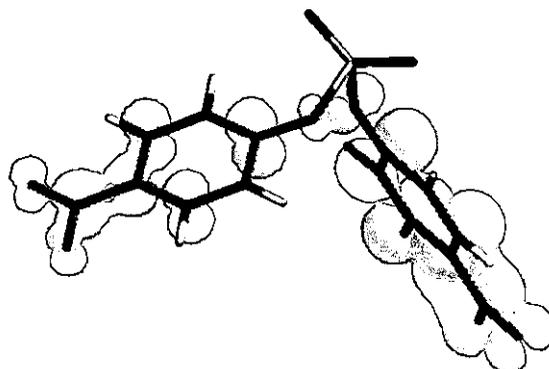
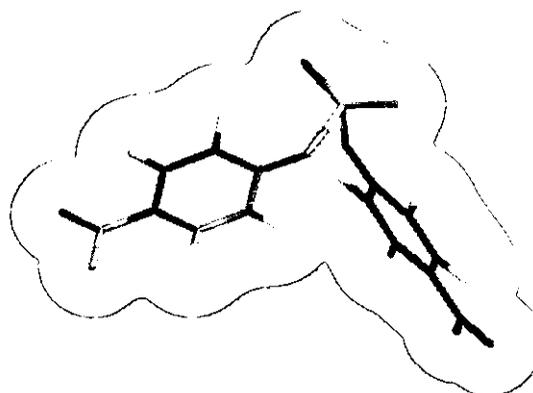
Para determinar las propiedades electrónicas de una molécula mediante cálculos semiempíricos (modelos moleculares) es necesario conocer su estructura. Los sustratos y ligantes empleados en este trabajo son fluxionales en disolución acuosa, es decir, experimentan rápidamente rearrreglos degenerados, lo que complica asignarles una geometría en particular. Se decidió emplear un método de mecánica molecular que optimiza la geometría de una molécula con base en la minimización de las interacciones interatómicas (energías de enlace, angular, torsional, electrostáticas, de van der Waals, etc) en el vacío. La minimización de la energía de la estructura se hizo de manera preliminar con un campo de fuerzas simple (SYBYL, incluido en el programa PC Spartan Pro) y posteriormente todos los cálculos se hicieron con el método semiempírico PM3. Se seleccionó este método de cálculo debido a que, dentro de Spartan, incluye la parametrización de metales de transición que, en principio, permitiría calcular parámetros de algunas de las especies reactivas de este trabajo; así, para poder hacer comparaciones todas las moléculas deben ser calculadas con el mismo método.

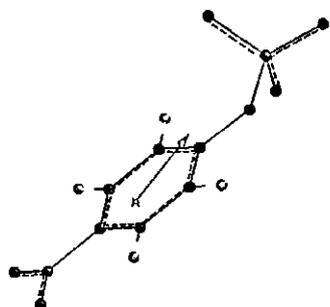
Las propiedades electrónicas moleculares que se muestran son: densidad electrónica y energías de los orbitales frontera (HOMO, Highest-energy Occupied Molecular Orbital, y LUMO, Lowest-energy Unoccupied Molecular Orbital), entalpía de formación (ΔH_f), momento dipolar, y superficie de densidad electrónica (en color verde) mapeada con el potencial electrostático (zonas positivas en color azul y zonas negativas en color rojo).

Sustrato BNPP⁻

Energía del orbital HOMO -6.531 eV

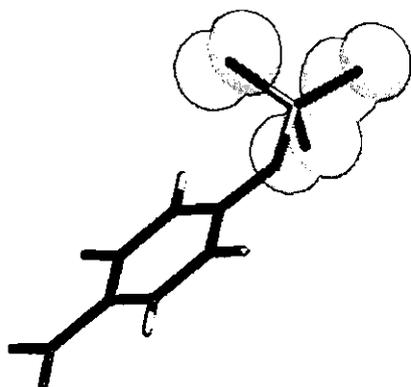
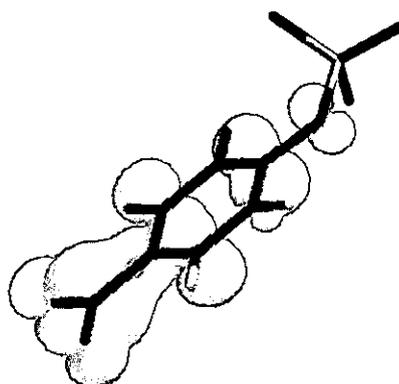
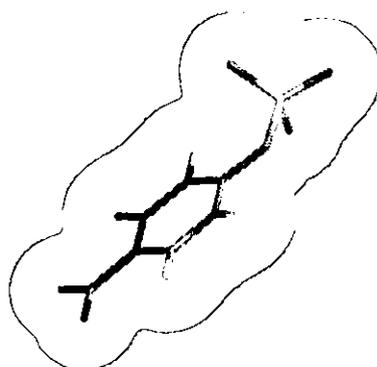
Energía del orbital LUMO 1.924 eV

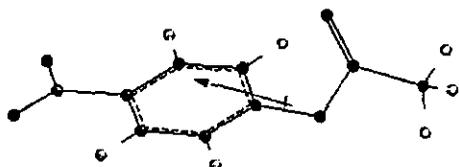
 ΔH_f -264.70 Kcal/mol μ 0.636 debye**BNPP⁻, HOMO****BNPP⁻, LUMO****BNPP⁻**, superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático

Sustrato MNPP²⁻

Energía del orbital HOMO -0.030 eV

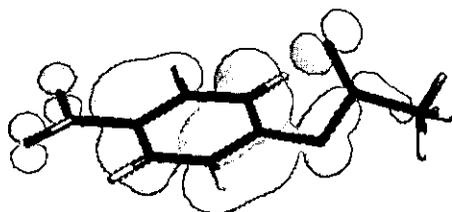
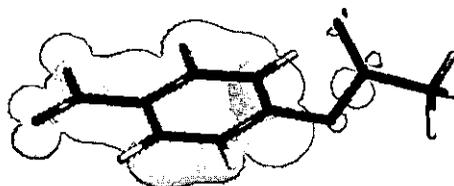
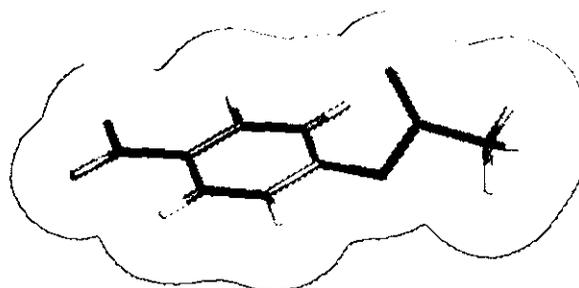
Energía del orbital LUMO 4.991 eV

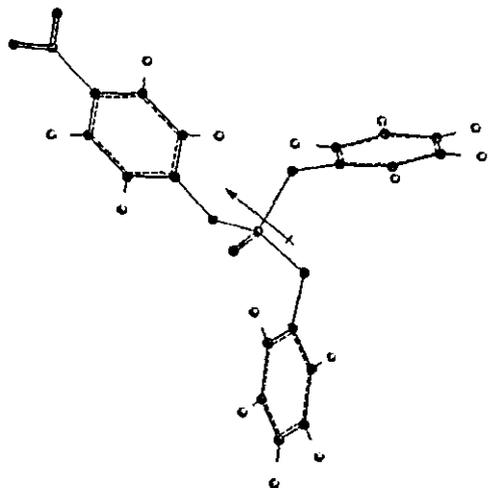
 ΔH_f -174.00 Kcal/mol μ 20.490 debye**MNPP²⁻, HOMO****MNPP²⁻, LUMO****MNPP²⁻, superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático**

Sustrato PNPA

Energía del orbital LUMO -1.2428 eV

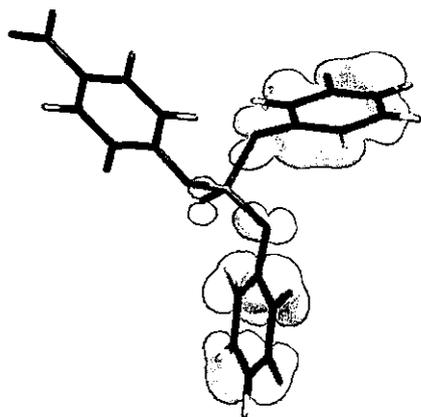
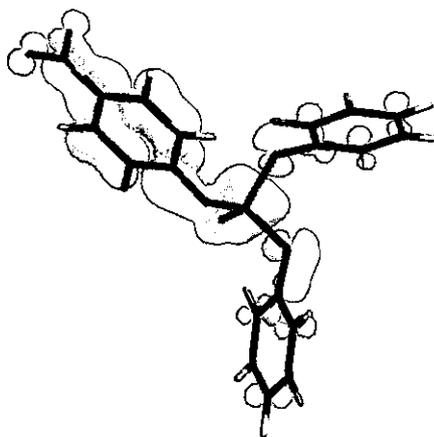
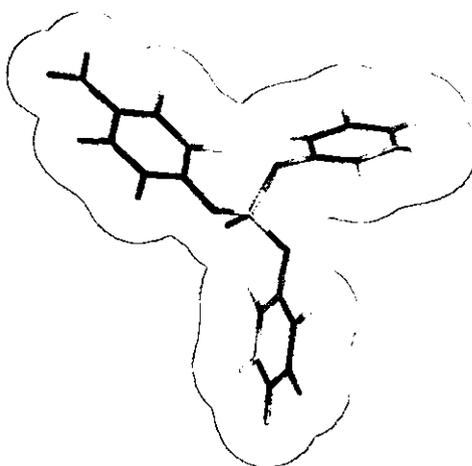
Energía del orbital HOMO -10.592 eV

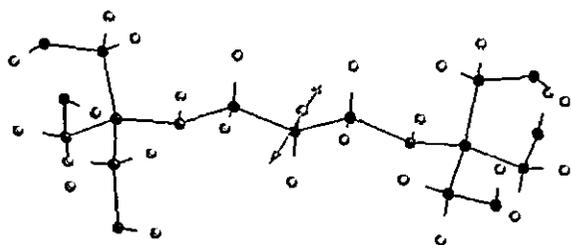
 ΔH_f -66.38 Kcal/mol μ 6.534 debye**PNPA, HOMO****PNPA, LUMO****PNPA, superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático**

Sustrato PNPDPP

Energía del orbital HOMO -9.479 eV

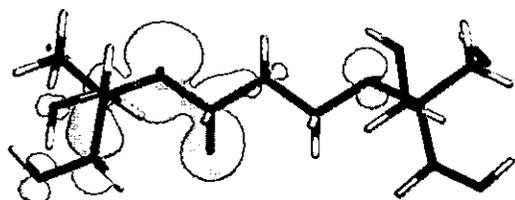
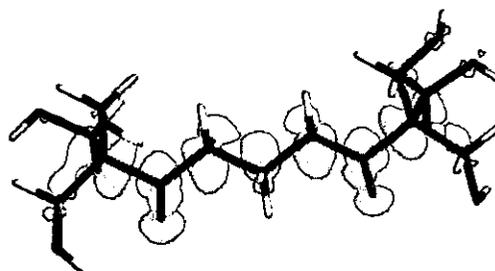
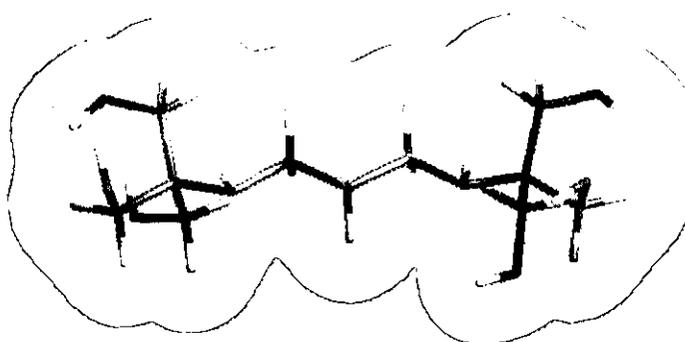
Energía del orbital LUMO -1.314 eV

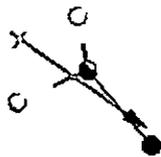
 ΔH_f -143.97 Kcal/mol μ 6.878 debye**PNPDPP, HOMO****PNPDPP, LUMO****PNPDPP, superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático**

Ligante BTP

Energía del orbital HOMO -9.655 eV.

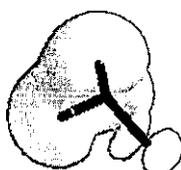
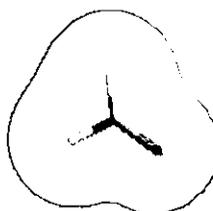
Energía del orbital LUMO 1.805 eV

 ΔH_f -284.45 Kcal/mol μ 2.564 debye**BTP, HOMO****BTP, LUMO****BTP, superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático**

Ligante NH_2O^- 

Energía del orbital LUMO 10.856 eV

Energía del orbital HOMO -0.838 eV

 ΔH_f 1.064 Kcal/mol μ 5.019 debye **NH_2O^- , HOMO** **NH_2O^- , LUMO** **NH_2O^- , superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático****Ligante NH_2OH** 

Energía del orbital LUMO 2.733 eV

Energía del orbital HOMO -10.092 eV

 ΔH_f -13.31 Kcal/mol μ 0.457 debye **NH_2OH , HOMO** **NH_2OH , LUMO** **NH_2OH superficie de densidad electrónica mapeada con el potencial electrostático**