

00582

11

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

INTERACCION DE CALCIO, PLOMO, ZINC Y CADMIO
CON LOS AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS DEL
SITIO METÁLICO DE LA CALBINDINA

T E S I S

PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

PRESENTE

ROSANA ELENA FERRARI ZULSTRA

C.U. MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

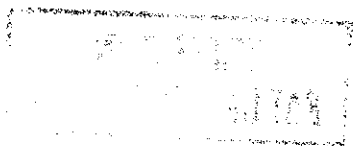


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Dedicatorias

Cuando me dijeron que no se podía incluir un agradecimiento fuera de lo académico o económico, me di cuenta de lo incompleto que estaría mi trabajo si no podía mencionar a quienes dan significado a este esfuerzo largo y gratificante.

...si entendiésemos todos los misterios y toda ciencia... y no tengo amor, nada soy (1ª de Corintios 13:2).

A Laura

Por aceptarme como alumna, compañera y amiga. Por compartirme su visión del mundo

A México

Por las oportunidades de vida dadas a mi familia. Por su gente, su espacio, su cultura, que se convirtió en mi gente, mi espacio y mi cultura. Por la educación que me permitió adquirir.

A las conchitas,

Ayo y Lety (con Lino), porque a pesar de enfrentarnos a etapas de mayor distancia, sabemos que nos tenemos, y espero que siempre sigamos siendo como hermanas.

Al lab216

Gerardo, ahora lejos, pero siempre dispuesto con su amistad y humor, Sigfrido y sus siempre enriquecedoras conversaciones, Edgar, su fraternal compañía y confianza. Los chicos que llegaron después, Karen, Marge y Juanito, por darme la oportunidad de participar en sus decisiones. Ana, por lo mucho compartido en el poco tiempo juntas.

Los demás del pasillo

Erika y cía (desde Charly, Kari -tantas veces mi paciente anfitriona en ultramar-, Edgar, Gina, Pau, Pao, Beto), siempre haciéndome sentir parte del grupo.

Lab210: Gaby, compañera de curso, Normita, que me distingue con su amistad y confianza, María Elena, su confianza y sincero cariño, Jorge, siempre observador y ocurrente, Angel, por las horas de discusión de fútbol y fórmula 1, Luis, Armando, Lena.

Del fondo, Toño, compañero de comidas, Paola, por muy amenas conversaciones.

A Guillermo y Egla, en Guanajuato, por interesarse tanto en mi proyecto químico y de vida, y los viajes compartidos.

A mis compañeros de generación,

Perseverantes en su amistad y en su calidad "académica" pero sobre todo humana. Raúl (con Rocío y ahora Elenita), Ingrid, Vicky J., Vicky M., Gaby, Tak, Paco, Alexander, Ángel, Chela

A mis alumnos desde '97, fuente constante de retos y satisfacciones, y especialmente los que me han permitido orientarlos vocacionalmente a la Química

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FALTA DE ORIGEN
TERCER COM

A mi soporte de cordura:

Los coros que me han permitido participar con ellos en este tiempo: el juvenil de Churubusco(1996-97), Ars Iovialis de la Facultad de Ingeniería (97-2001), y ahora el Buen Pastor de Churubusco(2001-...)

Y en este renglón, a mi congregación de Churubusco, siempre pendiente de mis logros, a la expectativa de mis viajes, cariñosos conmigo, y estimulando mi crecimiento espiritual. Mi familia lejos de mi primera tierra. Mayra, Ofé, Vhania, Sarah, David, además de hermanos, amigos, con quienes he compartido momentos muy padres.

Josué y Sahara Zamora, Saharita y Josuesito, dispuestos a una relación íntima de familia más allá de los cargos pastorales, como hermanos y sobrinos.

A mi familia:

Papá, Mamá y Eduardo (con Jessica), constantemente orgullosos de mí, convencidos de mis capacidades a grados incomprensibles, dispuestos a apoyar siempre mi superación intelectual, emocional y espiritual como un todo, llamándome a la reflexión, proveyendo de comodidades y muy grata compañía.

La familia más lejana -muy lejana geográficamente, pero muy cercana en el pensamiento y en el sentimiento- en Argentina, en Uruguay, Estados Unidos, Francia, España. Gracias por tanto cariño, recuerdos y estímulo constante

A Dios por permitirme conocer y amar a esta gente maravillosa y aprender tanto de ellos. Por redimir mi pasado, acompañarme en mi presente e impulsarme en mi futuro.

Agradecimientos

Al Prof. Thomas James y su grupo en UCSF por su apoyo en el uso de RMN 600MHz y el software MARDIGRAS así como muchos otros, y por la cálida bienvenida.

Al Dr. Guillermo Mendoza Díaz, por la capacitación en el equipo y el trabajo de Resonancia

Al Dr. Sylvain Bernés por su entusiasta trabajo en la obtención de estructuras cristalinas.

A la USAI

A la Facultad de Química por mi formación, los recursos dedicados y el espacio para la docencia.

A DGAPA y después DGEP, por el apoyo económico

A CONACyT por el apoyo a este proyecto (4290-11)

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Anatoli Iatsimirski
Primer vocal	Dr. Juan Manuel Fernández González
Segundo vocal	Dra. María de Jesús Rosales Hoz
Tercer vocal	Dr. Enrique González Vergara
Secretario	Dr. Rafael Moreno Esparza
Primer suplente	Dr. José Federico del Río Portilla
Segundo suplente	Dr. Alberto Rojas Hernández

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 216

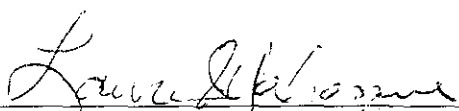
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear

División de Estudios de Posgrado

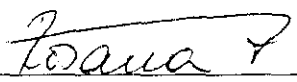
Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:


Dra. Laura María Gasque Silva

Sustentante:


Q Rosana Elena Ferrari Zijlstra



Índice

Introducción	1
Objetivo General	3
Hipótesis	3
Objetivos Particulares y Metodología	4
Capítulo 1	
Antecedentes	5
1.1. El Ca^{2+} en el organismo	5
1.1.1. <i>Proteínas de enlace a calcio</i>	6
1.1.2. <i>Asimilación de Calcio</i>	8
1.1.3. <i>Calbindina D_{9K} (ICaBP)</i>	9
1.2. Relación de plomo, cadmio y zinc con calcio en los sistemas biológicos	11
1.2.1. <i>Plomo</i>	11
1.2.2. <i>Cadmio</i>	15
1.2.3. <i>Zinc</i>	17
1.3. Química de Coordinación de los cationes Ca^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+}	18
1.3.1. <i>Principio de los Ácidos y Bases Duros y Blandos</i>	18
1.3.2. <i>Calcio</i>	22
1.3.3. <i>Plomo</i>	23
1.3.4. <i>Zinc</i>	26
1.3.5. <i>Cadmio</i>	28
Estudio en disolución	29
1.4. Constantes de equilibrio	30
1.4.1. <i>Método Potenciométrico</i>	30
1.4.2. <i>Operaciones con constantes de equilibrio</i>	33
1.4.3. <i>Factores que influyen en la estabilidad</i>	34
1.5. RMN: ^1H , NOE; 2D: NOESY; pH variable	37
1.5.1. <i>Mecanismos y tiempos de relajación</i>	38
1.5.2. <i>Efecto Nuclear Overhauser</i>	42
Estudio en estado sólido	48
1.6. Difracción de Rayos X de monocristal	48
1.7. IR mediano y lejano	49
1.8. RMN CP/MAS de ^{13}C , T_1 de ^1H , ^{111}Cd	51
1.8.1. ^{13}C	51
1.8.2. ^{111}Cd	53

Capítulo 2

Sección Experimental	54
2.1. Estudio en disolución	54
2.1.1. Determinaciones Potenciométricas	54
2.1.2. RMN ^1H , NOE, 2D. NOESY; pH variable	57
2.2. Síntesis	58
2.2.1. Derivados de aminoácidos	58
2.2.1.1. Síntesis de $\text{Ca}(\text{aspH})_2$	58
2.2.1.2. Síntesis de $\text{Pb}(\text{aspH})(\text{NO}_3)$	58
2.2.1.3. Síntesis de $\text{Pb}(\text{asp})$	58
2.2.1.4. Síntesis de $\text{Cd}(\text{aspH})(\text{NO}_3)$	59
2.2.1.5. Síntesis de $\text{Cd}(\text{asp})$	59
2.2.1.6. Síntesis de $\text{Zn}(\text{aspH})(\text{NO}_3)$	59
2.2.1.7. Síntesis de $\text{Ca}(\text{gluH})_2$	59
2.2.1.8. Síntesis de $\text{Pb}(\text{glu})$	60
2.2.1.9. Síntesis de $\text{Cd}(\text{glu})$	60
2.2.1.10. Síntesis de $\text{Zn}(\text{glu}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
2.2.2. Derivados de Glyglu	61
2.2.2.1. Síntesis de $\text{Ca}(\text{GEH})\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	61
2.2.2.2. Síntesis de $\text{Pb}(\text{GEH})(\text{ClO}_4)$	61
2.2.2.3. Síntesis de $\text{Pb}(\text{GE})$	61
2.2.2.4. Síntesis de $\text{Cd}(\text{GE})$	61
2.2.2.5. Síntesis de $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	62
2.2.2.6. Síntesis de $\text{Zn}(\text{GE})$	62
2.3. Estudio en estado sólido	62
2.3.1. Análisis Elemental	62
2.3.2. IR mediano y lejano	62
2.3.3. RMN ^{13}C , T_1 de ^1H , ^{111}Cd	63
2.3.4. Difracción de Rayos X de monocristal	63
2.3.5. Difracción de Rayos X de polvos	65

Capítulo 3

Interacción con Aminoácidos -Aspártico y Glutámico-	65
3.1. Estudios potenciométricos	66
3.2. Resonancia Magnética Nuclear. Espectros de ^1H a pH variable	73
3.3. Cristalografía	75
3.3.1. $\text{Pb}(\text{AspH})\text{NO}_3$	79
3.3.2. $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$	82
3.4. Espectroscopia Infrarroja	86
3.4.1. IR mediano	86
3.4.2. IR lejano	87
3.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS	89
3.5.1. CP/MAS de ^{111}Cd	89
3.5.1.1. $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$	90
3.5.1.2. $\text{Cd}(\text{Asp})$	91
3.5.1.3. $\text{Cd}(\text{Glu})$	91

3.5.2. CP/MAS de ^{13}C	92
3.5.3. T_1 de ^1H a partir de CP/MAS de ^{13}C	95
3.6 Interacción con aminoácidos. Observaciones relevantes.	96

Capítulo 4

Interacción con Gly-Glu	98
4.1. Estudios potenciométricos.	98
4.2. Resonancia Magnética Nuclear en disolución.	102
4.2.1. Espectros de RMN de ^1H pH variable	102
4.2.2. Estudio conformacional mediante NOE diferencial	104
4.3. Cristalografía	106
4.3.1. $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	106
4.3.2. $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	110
4.4. Espectroscopia infrarroja	114
4.4.1. IR mediano	114
4.4.2. IR lejano	114
4.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS	115
4.5.1. Espectros de RMN de ^{111}Cd CP/MAS	115
4.5.1.1. $\text{Cd}(\text{GE})$	115
4.5.1.2. $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	116
4.5.2. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS	116
4.6. Interacción de Gly-Glu con los cationes en estudio. Observaciones relevantes	120

Capítulo 5

Interacción con Asp-Gly-Glu y Asp-Gly-Glu-amida	122
5.1. Estudios potenciométricos.	123
5.2. Resonancia Magnética Nuclear	130
5.2.1. Espectros de RMN de ^1H de una dimensión, pH variable	130
5.2.2. Espectros de RMN ^1H en dos dimensiones. Estudio conformacional	137
5.3. Interacción de Asp-Gly-Glu y Asp-Gly-Glu-amida con los cationes en estudio. Observaciones relevantes.	141

Capítulo 6

Interacción con el Dodecapéptido-Sitio II de la calbindina D9K-	142
6.1. Estudios potenciométricos	143
6.2. Resonancia Magnética Nuclear	148
6.2.1. Espectros de RMN de ^1H en dos dimensiones. Estudio conformacional	149
6.3. Interacción del dodecapéptido con los cationes en estudio. Observaciones Relevantes	153

Capítulo 7

Análisis General de Resultados y Conclusiones	154
Afinidad	154
7.1. Estudios potenciométricos	154
Estructura	159
7.2. Resonancia Magnética Nuclear en disolución.	160

7.3. Cristalografía	161
7.4. Espectroscopia infrarroja. IR lejano.	161
7.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS	162
7.5.1. Espectros de RMN de ^{111}Cd CP/MAS	162
7.5.2. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS	162
7.6. Conclusiones.	163

Referencias 166

Introducción	166
Capítulo 1. Antecedentes	166
Capítulo 2. Sección Experimental	172
Capítulo 3. Interacción con Aminoácidos	172
Capítulo 4. Interacción con Glyglu	174
Capítulo 5. Interacción con Tripéptidos	175
Capítulo 6. Interacción con el Dodecapéptido	176

Anexo 1

Manual Para el Manejo y Procesamiento de Datos del Titulador 179

A1.1. Preparación de la celda	180
A1.2. Ajuste del electrodo	181
A1.2.1. Diseño de un método de calibración	181
A1.2.2. Calibración del electrodo	182
A1.3. Obtención de datos	185
A1.3.1. Diseño de un método de titulación	185
A1.3.2. Normalización del NaOH.	187
A1.3.3. Normalización del ácido	188
A1.4. Procesamiento de datos.	189
A1.4.1. Formateo e importación de archivos	189
A1.4.2. Punto de equivalencia	190
A1.4.3. Método de gran Cálculo del porcentaje de carbonato en el NaOH titulante	194
A1.5. Disoluciones de trabajo	196
A1.6. Referencias	197

Anexo 2

Determinación de Constantes de Equilibrio 198

A2.1. Condiciones iniciales	198
A2.1.1. Determinación de pKa	198
A2.1.2. Determinación de constantes de formación de compuestos de coordinación	201
A2.2. Generación de los archivos	201
A2.3. Definición de parámetros	203
A2.4. Ajuste manual	207
A2.5. Ajuste por mínimos cuadrados	208
A2.6. Principio de funcionamiento del programa	210
A2.7. Referencias	212

Anexo 3

Elucidación de estructuras en disolución a partir de espectros NOESY a través de MARDIGRAS

	213
A3.1. Experimento de Resonancia	214
A3.2. Procesamiento de espectros	216
A3.2.1. <i>Vnmr</i>	216
A3.2.2. <i>NMRPipe/NMRDraw</i>	217
A3.3. Asignación e integración. Archivos de entrada para cálculo de restricciones.	223
A3.4. Cálculo de restricciones	227
A3.5. Dinámica molecular restringida	231
A3.6. Visualización de las estructuras y parámetros de ajuste.	235
A3.7. Inclusión del catión en los complejos	237
A3.8. Referencias	238

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Aminoácido de origen y disposición geométrica de los átomos donadores en el sitio de enlace a Ca^{2+} de proteínas EF	7
Tabla 1.2. Niveles para intoxicación por plomo según la CDC.	13
Tabla 1.3. Parámetros relacionados con la dureza de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}	20
Tabla 1.4. Cantidad de enlaces Ca-X encontrados en estructuras cristalinas almacenadas en CSD de acuerdo al número de coordinación del complejo	22
Tabla 1.5. Cantidad de enlaces Zn-X en estructuras cristalinas almacenadas en CSD de acuerdo al número de coordinación del complejo, en comparación con Mg^{2+}	27
Tabla 1.6. Ubicación de los cationes Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} de acuerdo al tipo de ligante en la "regla de estabilidad"	36
Tabla 1.7. Valores de radios en Å	49
Tabla 1.8. Señales características en el espectro de IR mediano de los grupos presentes en este trabajo	50
Tabla 2.1. Valores estadísticos del ajuste de las constantes acumulativas de formación determinadas	56
Tabla 2.2. Datos cristalográficos para los derivados de aspártico	64
Tabla 2.3. Datos Cristalográficos de los derivados de GlyGlu	64
Tabla 3.1. Constantes de equilibrio calculadas de datos experimentales.	67
Tabla 3.2. Constantes calculadas: pKa del grupo amino en el complejo, constante de formación con el grupo amino protonado y contribución de la interacción con N a la estabilidad de los complejos	69
Tabla 3.3. Longitudes de enlace (Å) y ángulos ($^{\circ}$) para el complejo $\text{Pb}(\text{AspH})\text{NO}_3$	82
Tabla 3.4. Longitudes de enlace (Å) y ángulos ($^{\circ}$) para el complejo $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$	84
Tabla 3.5. Puentes de hidrógeno en $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$	86
Tabla 3.6. Desplazamientos químicos de ^{13}C en estado sólido para aspártico y sus derivados	93
Tabla 3.7. Desplazamientos químicos de ^{13}C en estado sólido para glutámico y sus derivados.	94
Tabla 3.8. Valores de $\langle T_1 \rangle$ para los derivados de Aspártico y Glutámico con los cationes Pb^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}	95
Tabla 4.1. Constantes de equilibrio calculadas de datos experimentales	100
Tabla 4.2. Longitudes de enlace de coordinación (Å) y ángulos ($^{\circ}$) para el complejo $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	108
Tabla 4.3. Puentes de hidrógeno en $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	109
Tabla 4.4. Longitudes de enlace de coordinación (Å) y ángulos ($^{\circ}$) para el complejo $\text{Cd}(\text{GEH})_2$	111
Tabla 4.5. Puentes de hidrógeno en $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	112
Tabla 4.6. Señales de IR asignadas a la interacción Metal-Amino	114
Tabla 4.7. ^{13}C CP/MAS NMR $\delta(\text{ppm})$ de GlyGluH_2 y sus derivados	117
Tabla 5.1. Constantes de formación acumulativas para DGE^{4+} y DGEa^{3+}	124
Tabla 5.2. Constantes calculadas para discriminar la interacción con los átomos donadores	126

Tabla 5.4. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en disoluciones 1:1 DGE:M ²⁺	133
Tabla 5.5 Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en disoluciones 1:1 DGE:M ²⁺ .	136
Tabla 6.1. Constantes acumulativas de formación de complejos	145
Tabla 6.2. Átomos donadores y residuos correspondientes que se ubican a distancia menor que la suma de radios de van der Waals de los cationes en los compuestos de coordinación del dodecapéptido	152
Tabla 7.1 Número de onda y constante de fuerza ξ asociada a la interacción M-N	162
Tabla 7.2 Valores de $\langle T1 \rangle$ de ¹ H medidos en CP-MAS ¹³ C para los derivados aislados	163
Tabla A3.1 Variables de tipo de funciones de minimización en Dyana	234

Índice de Figuras

Figura 1.1. Cambio estructural en la Calbindina (amortiguadora) y en la calmodulina (sensora) al enlazarse el calcio	6
Figura 1.2 “Mano EF”: Sitio de enlace a Ca ²⁺ en proteínas EF	7
Figura 1.3 Esquema del transporte de calcio a través de las células intestinales	9
Figura 1.4 Estructura molecular y esquemática de la ICaBP Calbindina D _{9K}	10
Figura 1.5. Sitio II de la Calbindina D _{9K} en su interacción con calcio	10
Figura 1.6 Niveles de plomo en el aire del Valle de México (1988-1998).	12
Figura 1.7 Estructuras cristalinas de compuestos de Pb publicadas hasta marzo de 2002	24
Figura 1.8. Porcentajes de compuestos de Pb(II) con diferentes números de coordinación	25
Figura 1.9 Estructuras cristalinas de compuestos de Cd publicadas a marzo de 2002	29
Figura 1.10. Variación en las constantes de formación para los cationes M ²⁺ de la serie de Irving Williams	36
Figura 1.11. Multiplicidad por acoplamiento entre núcleos con I= ½; n=1,2,3,4	38
Figura 1.12 Efecto de la relajación espín-espín (T ₂) en la amplitud de las señales	40
Figura 1.13. Dependencia de los tiempos de relajación respecto al tiempo de correlación molecular	41
Figura 1.14. Transiciones posibles y permitidas Probabilidades de transición (W)	42
Figura 1.15 Efecto Nuclear Overhauser	43
Figura 1.16. Esquema de pulsos y efectos del experimento NOESY	45
Figura 1.17 Ejemplo de espectro TOCSY	47
Figura 1.18 Esquema de pulsos y adquisición de espectros CP-MAS (estado sólido)	52
Figura 2.1. Puntos experimentales, curva teórica de valoración y especies de Ca+Dodeca	56
Figura 3.1. Contribución de la interacción con el átomo donador involucrado con los átomos donadores a la estabilidad de los compuestos de coordinación	71
Figura 3.2 Diagramas de distribución de especies de los cationes con Aspártico	72
Figura 3.3 Diagramas de distribución de especies entre los cationes y Glutámico	73
Figura 3.4 Efecto del pH en la formación de los complejos observado vía RMN ¹ H	75
Figura 3.5 Estructuras de complejos de M ²⁺ con aspártico presentes en la literatura. Distancias del entorno de coordinación	77
Figura 3.6 Estructuras de complejos de M ²⁺ con glutámico presentes en la literatura. Distancias del entorno de coordinación.	78
Figura 3.7. Anillos de 18 miembros que contienen 3 iones Pb	79
Figura 3.8. Entorno de coordinación del ion Pb ²⁺ en Pb(AspH)NO ₃	80
Figura 3.9 Papel de O1 en la formación de la red tridimensional de Pb(AspH)NO ₃	81
Figura 3.10 Entorno de coordinación del ion Cd ²⁺ en Cd(AspH)NO ₃ . Elipsoides al 50%.	83
Figura 3.11 Polímero bidimensional formado por Cd(AspH)NO ₃ . Se observa la formación de anillos de 14 miembros.	85
Figura 3.12 Interacción entre capas poliméricas a través de puentes de hidrógeno	85
Figura 3.13 Espectros de IR-lejano de los derivados de aspártico con plomo.	88

Figura 3 14 Señales asignadas a la interacción Metal-Amino en los espectros de IR lejano de M^{2+} con glutámico.	89
Figura 3.15. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd del compuesto $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$ y su ajuste matemático	91
Figura 3 16. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd del compuesto $\text{Cd}(\text{Glu})$	92
Figura 3 17. Efecto del tiempo de relajación en la intensidad de las señales de ^{13}C CP/MAS en los derivados de Aspártico con plomo	95
Figura 4.1. Diagrama de distribución de especies del ligante GE	99
Figura 4 2 Diagrama de distribución de especies de los complejos	102
Figura 4 3. Titulaciones seguidas por RMN de ^1H	103
Figura 4.4. Espectros NOE diferencial y estructuras propuestas acorde a las interacciones observadas	105
Figura 4 5 Polímero tridimensional $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	107
Figura 4 6: Entorno de coordinación del ion Pb^{2+} en $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	108
Figura 4 7 Arreglo tridimensional del polímero y ubicación de los iones perclorato	109
Figura 4 8: Entorno de coordinación para los átomos de Cd en $\text{Cd}(\text{GEH})_2$.	111
Figura 4.9: Estructura tridimensional de $\text{Cd}(\text{GEH})_2$ vista a lo largo del eje [001].	113
Figura 4 10. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd de los derivados de Glyglu	115
Figura 4 11 Esquema de las especies tautoméricas correspondientes al GlyGluH_2	117
Figura 4 12. Efecto del tiempo de relajación en la intensidad de las señales de ^{13}C CP/MAS	118
Figura 5 1. Esquema de la estructura de los tripéptidos DGE y DGEa	123
Figura 5 2 Diagrama de distribución de especies de los tripéptidos	124
Figura 5 3 Contribución de los átomos donadores a la estabilidad de los complejos	126
Figura 5 4 Diagrama de distribución de especies de los complejos con DGE	129
Figura 5 5 Diagrama de distribución de especies de los complejos con DGEa	130
Figura 5 6. Titulaciones seguidas por RMN de ^1H	131
Figura 5 7 Simulación de espectros de los ligantes libres que arrojan los valores de δ , J^2 y J^3	133
Figura 5 8 Simulación de espectros de disoluciones de DGE con M^{2+} que arrojan los valores de δ , J^2 y J^3	135
Figura 5 9 Simulación de espectros de disoluciones de DGEa con M^{2+} responsables de los valores de δ , J^2 y J^3	135
Figura 5 10 Espectro ROESY de DGE a pH=8.5 Interacciones intraresiduo y ruido provocado por la presencia de agua	139
Figura 5 11 Sobreposición de estructuras para DGE a pH=8.5 calculadas por dinámica molecular a partir de datos de RMN (ROESY)	139
Figura 5 12. Espectros ROESY en D ₂ O Estructuras que pueden presentar las interacciones interresiduos observables en los espectros	140
Figura 6 1 Estructura del dodecapéptido DKNGDGEVSFEE	144
Figura 6 2 Diagrama de distribución de especies del ligante Dodeca	144
Figura 6 3 Efecto de la precipitación de los hidróxidos de los metales en la curva de titulación	145
Figura 6 4 Contribución del átomo donador a la estabilidad de los complejos.	147
Figura 6 5 Diagrama de distribución de especies de los complejos	148
Figura 6 6 Espectro 1D de RMN a 600MHz de ^1H del Dodeca (pH=9)	149
Figura 6.7 Fragmento de la Calbindina D_{9K} correspondiente al sitio II unida a calcio	150
Figura 6 8 Estructuras del dodecapéptido en los complejos con Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} .	151
Figura 7 1. Constantes de formación de los complejos en los que puede intervenir como donadores tanto el grupo amino como los carboxilos. Los ligantes se ubican de menor a mayor disponibilidad de grupos carboxilo	156
Figura 7 2 Participación de los grupos carboxilo en la estabilidad de los complejos	157
Figura 7.3. Influencia de la disponibilidad de NH_2 en la estabilidad de los complejos	157
Figura A1 1. Esquema de los dispositivos para titulación automatizada	179
Figura A1 2 Esquema de la celda preparada para (a) calibración y (b) titulación	180
Figura A1 3. Calibración del electrodo. Valores de pH de Buffer a usar	182
Figura A1 4. Pantalla de 702 SM Titrino controlador del titulador	182

Figura A1 5. Pantalla del titulador al establecer el método ca01	183
Figura A1 6. Gráfica de calibración del electrodo. Regresión lineal	185
Figura A1 7. Fijando el volumen final de titulación	186
Figura A1 8. Fijando el pH final de titulación	186
Figura A1 9. Parámetros de la titulación	186
Figura A1 10. Estableciendo el número de puntos para la graficación.	187
Figura A1 11. Instrucciones para la importación de datos de titulación a ORIGIN®	190
Figura A1 12. Graficación de datos en ORIGIN	191
Figura A1 13. Determinación de punto de equivalencia por derivación	192
Figura A1 14. Línea en $y=0$	192
Figura A1 15. Valor del cruce de la segunda derivada con $y=0$	193
Figura A1 16. Cálculo de la función de Gran	194
Figura A1 17. Agregando un eje de ordenadas dependiente del mismo eje de abscisas	195
Figura A2 1. Íconos para el cálculo de estructura tridimensional y constantes de acidez de una estructura en el software de ACDlabs	199
Figura A2 2. Despliegue de resultados de cálculo de pKa en ACDlabs pKa/DB	199
Figura A2 3. Determinación de dos puntos de equivalencia del ligante	201
Figura A2 4. Pantalla de inicio de Hyperquad2000NT. Se marca la importación de datos	202
Figura A2 5. Ventana de importación de archivos. Se marca el campo de selección de número de reactivos	202
Figura A2 6. Ventana de edición del modelo	204
Figura A2 7. Menú de edición de datos potenciométricos	205
Figura A2 8. Edición de datos potenciométricos. Condiciones de Titulación.	205
Figura A2 9. Edición de Datos Potenciométricos. Configuración del electrodo	206
Figura A2 10. Edición de Datos Potenciométricos. Datos de la titulación	206
Figura A2 11. Ventana de ajuste manual	207
Figura A2 12. Archivo de salida de Hyperquad2000NT visto en WINOUTNT	209
Figura A2 13. Menú para establecer los componentes del proyecto: datos y modelo	209
Figura A3 1. Dependencia de la intensidad de la señal NOE respecto al tiempo de correlación. Diferencia entre NOESY y ROESY	215
Figura A3 2. Sugerencia para la selección del tiempo de mezclado (t_m) a usarse en el experimento NOE bidimensional	215
Figura A3 3. Pantalla de NMRDraw	218
Figura A3 4. Ventana de Conversión de archivos fid de Varian a formato NMRPipe	218
Figura A3 5. Despliegue de la traza de la dimensión f_2	219
Figura A3 6. Ventana "Macro Edit"	219
Figura A3 7. Fid original (a) y después de ser corregida por disolvente con una función de convolución (b).	221
Figura A3 8. Efecto de la corrección de fase	222
Figura A3 9. Espectro procesado y en fase	223
Figura A3 10. Comparación de señales entre un espectro TOCSY y un NOESY de la misma muestra	225
Figura A3 11. Visualización en Sparky de la traza y la integral calculada, así como de la escala de contornos	226
Figura A3 12. Simulación de un espectro de alta resolución, de la que se obtienen valores de desplazamiento químicos y constantes de acoplamiento	231
Figura A3 13. Pantalla del programa Molmol (visualización de estructuras moleculares)	236
Figura A3 14. Pantalla de Hyperchem. Optimización con centro metálico	238

Abreviaturas

Aminoácidos
 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COO}^-$
 R

			R:
Glicina	Gly	G	-H
Aspártico	Asp	D	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Glutámico	Glu	E	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Lisina	Lys	K	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Asparagina	Asn	N	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$
Valina	Val	V	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Serina	Ser	S	$-\text{CH}_2-\text{OH}$
Fenilalanina	Phe	F	$-\text{CH}_2-\phi$

GE	GlyGlu	Ácido Glicilglutámico
DGE	AspGlyGlu	Ácido aspartilglicilglutámico
DGEa	AspGlyGlu-amida	Amida en el carboxilo terminal
TFA	Trifluoroacetic Acid	Ácido Trifluoroacético
CaBP	Calcium Binding Protein	Proteína enlazadora a calcio
ICaBP	Intestinal Calcium Binding Protein	Proteína intestinal enlazadora a calcio
CP/MAS	Cross Polarization Magic Angle Spin	Polarización cruzada, la muestra gira en el "ángulo mágico"
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre	Centro de datos cristalográficos en Cambridge
FID	Free Induction Decay	Decaimiento libre de la inducción
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Espectroscopía (2D) de Efecto Nuclear Overhauser

Introducción

Los organismos biológicos, en su contacto constante con el medio ambiente, junto con las especies esenciales, en los últimos tiempos han asimilado iones no esenciales que han quedado disponibles debido a su emisión como contaminantes a la biosfera. Estos iones han resultado nocivos al entrar en competencia con los iones esenciales por su interacción con las biomoléculas, obstaculizando sus actividades regulares en los organismos tanto a nivel estructural como funcional.

Un catión que presenta especial competencia por los sitios de enlace de metales esenciales es el Pb^{2+} . Este elemento se ha redistribuido en la superficie terrestre y ha pasado de ser un elemento ajeno a los sistemas biológicos, a uno comúnmente presente en los tejidos de plantas y animales, incluyendo al ser humano. Desde hace algún tiempo se conoce la relación que existe entre el calcio y el plomo en mamíferos. Se sabe que los organismos que llevan una dieta deficitaria en calcio incorporan más plomo que los que llevan una dieta con niveles satisfactorios de calcio.¹

Dentro de las muchas metaloproteínas en las cuales el ion metálico se encuentra unido directamente a la cadena polipeptídica, hay una familia, denominada EF, que es la encargada de la regulación, transporte, almacenamiento y utilización del ion Ca^{2+} . Continuamente se descubren proteínas a las que se asocia el ion calcio, así como procesos bioquímicos en donde el calcio juega un papel fundamental.

Los estudios realizados hasta la fecha dan evidencia de que el ion Pb^{2+} procedente de la contaminación, al ingresar por vía oral, se une en el duodeno a una proteína, la ICaBP (Intestinal Calcium Binding Protein), que en los mamíferos es específicamente la Calbindina D_{9K} y que se encarga principalmente del transporte del calcio del intestino al torrente sanguíneo. Estos estudios indican que el plomo compite con el calcio por el sitio de unión en la Calbindina D_{9K} ² e interfiere con su función, pues desplaza al calcio, pero aún no se sabe cuál es el mecanismo de esta competencia.

Por otro lado, desde el punto de vista de la química de coordinación, a partir de la postulación del concepto de dureza y blandura en los ácidos y bases por Pearson en 1963,³ la clasificación de cationes como el plomo y el cadmio ha variado. En un principio, el Cd^{2+} fue considerado como blando y el Pb^{2+} como intermedio junto con el Zn^{2+} . Veinte años después, en pos de una sistematización teórica de la dureza y blandura, Pearson y Parr⁴ generan parámetros de dureza absoluta según el cual se ubica al Pb^{2+} como más blando que el Cd^{2+} , y éste a su vez, con una dureza muy similar al Zn^{2+} . En todos los casos el Ca^{2+} se considera duro. Actualmente, la clasificación de los cationes Pb^{2+} y Cd^{2+} en los libros de texto sigue difiriendo.

Esta perspectiva cobra importancia en el ámbito biológico, pues la toxicidad del plomo ha sido en general asociada a su gran afinidad por los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas, en concordancia con su clasificación como ácido blando. Sin embargo, su capacidad para competir con un metal típicamente duro como el calcio en las proteínas de la familia EF, en cuyo sitio de coordinación abundan los iones carboxilato, definitivamente duros, pone en entredicho su clasificación dentro de este esquema.

Todo esto hace patente la necesidad de conocer más acerca de la química de coordinación del plomo, en particular en disolución acuosa y con moléculas de interés biológico, de

modo que al profundizar en el conocimiento de la interacción puramente química, pueda contribuirse a la comprensión de su toxicidad.

Un par de cationes que junto con el plomo, interfieren en la asimilación de calcio a nivel intestinal son Zn^{2+} y Cd^{2+} . Dada la ambigüedad en la clasificación de dureza, ambos cationes pueden compartir categoría con el plomo.

Objetivo General

Modelar las interacciones que iones metálicos divalentes pueden presentar con la proteína ICaBP a través de un estudio sistemático de compuestos de coordinación formados por los cationes Ca^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} con aminoácidos carboxílicos y secuencias peptídicas (bi, tri y dodecapéptido) pertenecientes a un sitio de unión a calcio.

Hipótesis

- Conforme aumente el tamaño del ligante, el comportamiento estructural y la afinidad en los compuestos de coordinación será más similar a los del sitio metálico *en* la proteína
- Aquellos cationes que cuenten con una mayor afinidad por nitrógeno que por oxígeno, es decir, que presenten una menor dureza, generarán complejos más estables con los ligantes que aporten un mayor número de grupos donadores por nitrógeno.

Objetivos Particulares y Metodología

Se presentan a continuación los objetivos (•) y los pasos de la metodología (○) relacionados con estos

- Evaluar la modelación de la Calbindina mediante péptidos constituyentes de su sitio II. Los ligantes utilizados en este estudio son:
Aspártico (D), Glutámico (E), Glicilglutámico (GE), Asp-Gly-Glu (DGE), DGE-Amida (DGEa), Dodeca (*N-Ac*)Asp-Lys-Asn-Gly-Asp-Gly-Glu-Val-Ser-Phe-Glu-Glu-Amida (DKNGDGEVSFEE)
 - Se comienza con los ligantes más sencillos para ir creciendo en la cadena y en la semejanza con el sitio II de la Calbindina D_{9K}.
- Comparar la estabilidad de los complejos formados por los ligantes estudiados con los diversos cationes y obtener información respecto a la fuerza de la interacción, así como respecto a los átomos donadores involucrados en la coordinación a los cationes
 - Determinación potenciométrica de los pKa's de los ligantes
 - Determinación potenciométrica de las constantes de estabilidad de los complejos de M²⁺ con los ligantes.
- Estudiar la interacción de Pb²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺ en relación con la que presenta el Ca²⁺ con aminoácidos y péptidos constituyentes del sitio de enlace a calcio de la Calbindina
 - Síntesis de los complejos de M²⁺ con los ligantes mencionados y su caracterización mediante IR, RMN y rayos X, para conocer el entorno de coordinación en estado sólido
 - Determinación de la naturaleza de dichos complejos en disolución a distintos valores de pH, mediante RMN de una y dos dimensiones, para conocer el entorno de coordinación en disolución

Antecedentes

En un principio se presentarán las características generales de las proteínas involucradas en el metabolismo del calcio, para posteriormente comentar las específicas de la Calbindina. También, a manera de justificación para la selección de los cationes utilizados en este trabajo, se expondrá la relación de Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} con el metabolismo del Ca^{2+} , así como la clasificación de estos cationes respecto a su tendencia en la interacción con los átomos donadores. Se explica la aplicación de las técnicas que se emplean a lo largo del trabajo, tanto para establecer la tendencia en afinidades entre ligantes y cationes, para elucidar las conformaciones que adquieren los complejos en disolución, como para la caracterización de los compuestos que se logran aislar en estado sólido.

1.1. El Ca^{2+} en el organismo

El calcio es el quinto elemento más abundante en el organismo constituyendo un 1.5 a 2% en peso ¹ El 99% constituye al tejido rígido (huesos y dientes) además de ser una reserva para mantener los niveles requeridos de Ca^{2+} Esto deja un 1% al Ca^{2+} ubicado en fluidos intra y extracelulares, que se encuentra involucrado en los siguientes procesos:²

- transmisión de señales
- control de división celular y crecimiento
- contracción muscular
- procesos de transporte de carga
- procesos metabólicos
- actividad enzimática
- metabolismo de los nucleótidos
- coagulación de la sangre

1.1.1 Proteínas de enlace a calcio

Para la regulación de funciones existen proteínas denominadas “sensoras”, mientras que las proteínas encargadas del transporte de este ion y de mantener constante la concentración son denominadas “amortiguadoras”.

Las proteínas sensoras presentan cambios estructurales sustantivos al cambiar del estado libre al enlazado con calcio, en tanto que las amortiguadoras mantienen una conformación prácticamente constante independientemente de la interacción con Ca^{2+} , como se muestra en la Figura 1.1² En ambos casos se sobreponen la estructura de la proteína cargada con calcio a la correspondiente a la apoproteína, es decir, la metaloproteína en ausencia del metal. Mientras que el ángulo entre las hélices α que enmarcan a cada sitio de enlace a calcio –de acuerdo como se describe a continuación– sufre una variación de alrededor de 37° en la calmodulina, la Calbindina presenta un cambio de 12° en el sitio I y de tan sólo 1° en el sitio II.

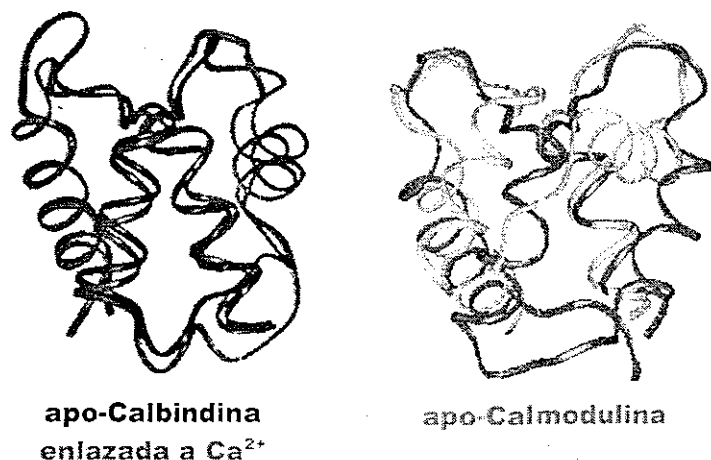


Figura 1.1. Cambio estructural en la Calbindina (amortiguadora) y en la calmodulina (sensora) al enlazarse el calcio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se mencionaba, ambos tipos de proteínas presenta un arreglo particular que constituye al sitio de enlace a calcio. Éste es denominado “mano EF” (Figura 1.2) y consta de una cadena de 12 aminoácidos que se encuentra entre dos hélices. Habiéndose caracterizado por primera vez en la Troponina C, se observó que retenía al calcio entre las hélices E y F, de ahí que se le denominara de esta manera:³

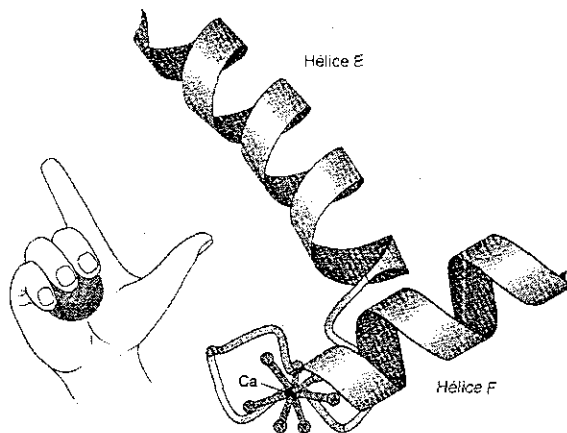


Figura 1.2. “Mano EF”: Sitio de enlace a Ca²⁺ en proteínas EF

En el sitio de enlace al metal, es decir, la secuencia de 12 aminoácidos:⁴

- Los átomos donadores son siempre O, tanto de carbonilos del esqueleto de enlaces peptídicos (C=O), como de carboxilos (COO⁻) de la cadena lateral.
- Generalmente los átomos donadores se encuentran dispuestos en los vértices de un octaedro conforme se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Aminoácido de origen y disposición geométrica de los átomos donadores en el sitio de enlace a Ca²⁺ de proteínas EF.⁵

Coordenada en el octaedro	x		y		z		-y		-x		-z	
Posición en el dodecapéptido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aminoácido ^{*⊗}	D		D,N		D,N,S	G		I,L,V	S,T,G,D,N,E			E(2)

* D: Aspártico (Asp) . E: Glutámico (Glu). G: Glicina (Gly). I: Isoleucina (Ile), L: Leucina (Leu), N: Asparagina (Asn), S: Serina (Ser), T: Treonina (Thr). V: Valina (Val)

⊗ Aminoácidos que se encuentran con mucha frecuencia en la posición indicada. Los más variables son 2, 7 y 10

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- o Ocasionalmente uno de esos vértices es ocupado por una molécula de agua.
- o Se trata de un octaedro distorsionado debido a que en el vértice -z se enlazan dos átomos donadores provenientes del carboxilo de la cadena lateral de glutámico. Así, el número de coordinación resulta ser 7.

Además de este tipo de proteínas, en las que el enlace a calcio se logra a través de grupos carboxílicos de aminoácidos cercanos entre sí en la secuencia -y que son la inspiración del presente trabajo-, existen proteínas en las cuales los residuos que aportan los átomos donadores corresponden a posiciones muy distantes en la secuencia, pero que en la estructura terciaria de la proteína quedan orientados formando una cavidad apropiada para alojar al calcio. También existen proteínas que forman canales de grupos aniónicos como fosfato o carboxilato (comúnmente con una elevada cantidad de residuos carboxiglutamato, un glutamato con un segundo carboxilo en su posición γ).

1.1.2. Asimilación de calcio

La absorción intestinal del calcio involucra dos procesos, uno transcelular activo, dirigido por el metabolismo, y otro transepitelial pasivo, dirigido por difusión.⁶ El paso limitante lo constituye la difusión a través del citoplasma, pero esto se contrarresta con la presencia de una proteína amortiguadora como es la Calbindina D_{9K} (Figura 1.3)

Pero así como las células de absorción intestinal son responsables del transporte completo del calcio fisiológicamente necesario proveniente de los alimentos, también se ven involucradas en la asimilación de iones que suelen competir con el calcio por la Calbindina, como son Ba²⁺, Sr²⁺, Mn²⁺, lantánidos y Pb²⁺⁽⁶⁾. Representan por tanto, además del principal paso para mantener la homeostasis de calcio, el punto en el que el cuerpo puede ser defendido del envenenamiento por plomo.⁷

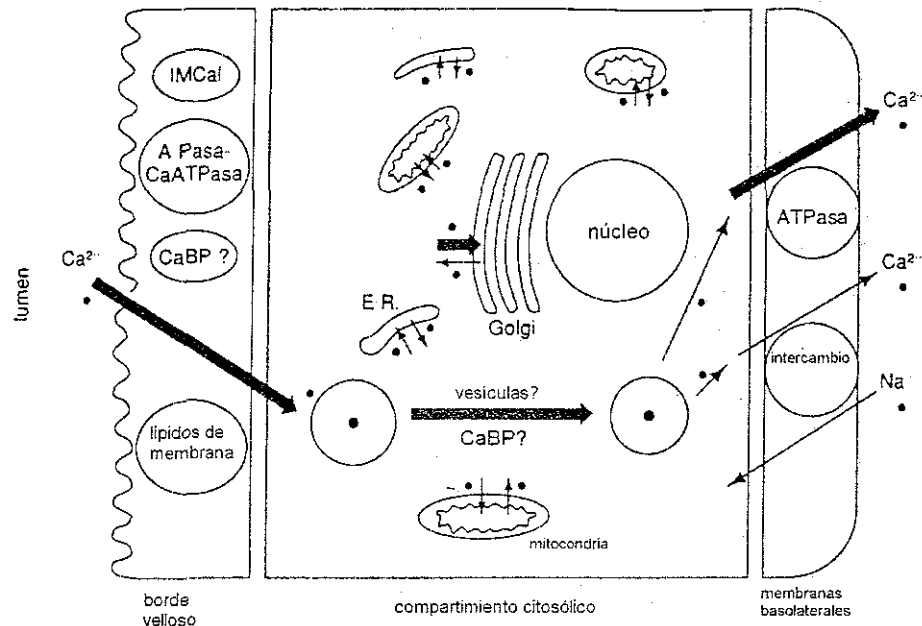


Figura 1.3. Esquema del transporte de calcio a través de las células intestinales⁸

1.1.3. Calbindina D_{9K} (ICaBP)

Es el momento entonces de describir a esta “proteína intestinal enlazadora de calcio” o ICaBP*, que controla el transporte del calcio. El tamaño de las ICaBP varía con la especie animal, y en esencia son proteínas amortiguadoras que poseen manos EF como sitio de unión a calcio.

La Calbindina D_{9K} es una ICaBP con dos sitios de enlace a calcio.

- Su síntesis depende de la presencia de la vitamina D -de ahí su nombre D-
- Se compone de 75 aminoácidos (M_r ≈ 7kDa) lo que le da el nombre 9k

Es la especie de Calbindina que se presenta mayormente en los mamíferos (existe una Calbindina D_{28K} que se encuentra en las aves).

* Intestinal Calcium Binding Protein

Su función amortiguadora queda de manifiesto, ya que la concentración intracelular de $[Ca_2\text{Calbindina}]$ puede superar por 3 órdenes de magnitud a la de Ca^{2+} libre ($10^{-7} M$).^{8,4}

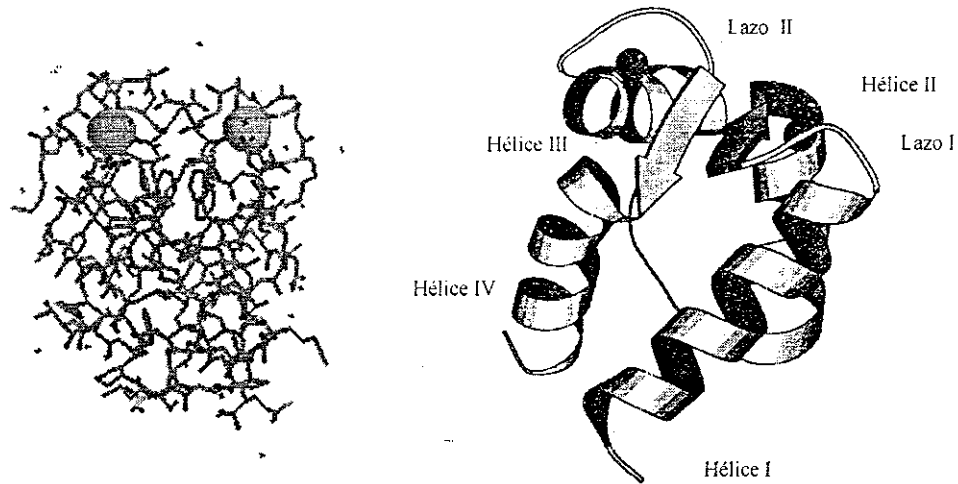


Figura 1.4. Estructura molecular y esquemática de la ICaBP Calbindina D_{9K} ⁹

Sus sitios de unión a calcio son⁵:

Lazo I. ala-ala-lys-glu-gly-asp-pro-asn-gln-leu-ser-lys-glu-glu (denominada pseudo-mano EF por estar formada de 14 aminoácidos en lugar de 12, que a su vez se denomina *canónico* por ser el tamaño de la mayoría de las manos EF)

Lazo II. asp-lys-asn-gly-asp-gly-glu-val-ser-phe-glu-glu (Figura 1 5)

en ambos sitios, la posición -x del octaedro está ocupada por una molécula de H_2O .

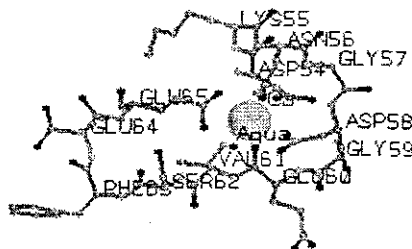
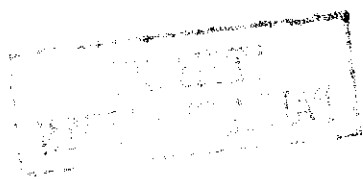


Figura 1.5. Sitio II de la Calbindina D_{9K} en su interacción con calcio⁹

Linse y colaboradores determinaron que la constante global de asociación a calcio tiene un valor de $\log \beta = 16.9$ ⁽¹⁰⁾, en condiciones de $pH = 7.5$ sin imponer fuerza iónica. Por otro lado, en 1980 Fullmer y Wasserman¹¹ determinaron la constante intrínseca aparente



de asociación (constante promedio por sitio) en un medio de fuerza iónica 0.15 a $\text{pH}=6.5$, con un valor $\log \beta=6.57$. Dado que la afinidad del calcio por ambos sitios de enlace es muy similar, para analizar el comportamiento del catión respecto a uno de los sitios ha sido necesario trabajar con una mutación de la proteína disminuyendo la afinidad del otro sitio.¹² La constante de asociación ($\log \beta$) del calcio con el sitio II resulta así ser de 8.4 en $\text{pH}=7.5$ y fuerza iónica no impuesta¹⁰ Se debe recordar la baja respuesta estructural ante la unión a calcio que presenta una proteína de tipo amortiguador como la Calbindina, en comparación con la de una proteína sensora como se mostró ya en la Figura 1.1.

1.2. Relación de plomo, cadmio y zinc con calcio en los sistemas biológicos

En numerosos estudios desde 1940,^{13,14} se ha observado tanto el efecto de la ingesta de calcio en la asimilación y almacenamiento de plomo en el organismo, como su influencia en la concentración de otros cationes divalentes como zinc.^{15,16,17} También se ha relacionado al transporte de calcio con la incorporación de cadmio.^{17,18,19}

1.2.1. Plomo

Este metal se conoce desde hace más de 5000 años²⁰ y sus efectos tóxicos fueron señalados por los griegos, los árabes y los romanos. Se sospecha que en el Imperio Romano se sufrían intoxicaciones por el uso de vasijas y otros implementos de plomo, además del acetato de plomo como edulcorante. Posteriormente, a lo largo de la historia, muchos pintores, entre ellos Goya, se intoxicaban por el continuo contacto con pinturas a base de plomo. Ya en la época actual, simplemente una década atrás, el aire de las grandes ciudades se encontraba contaminado por la combustión de gasolinas conteniendo tetraetilplomo como antidetonante. La reducción gradual en el uso de este aditivo en muchos países ha demostrado efectos positivos a este respecto (Figura 1.6)

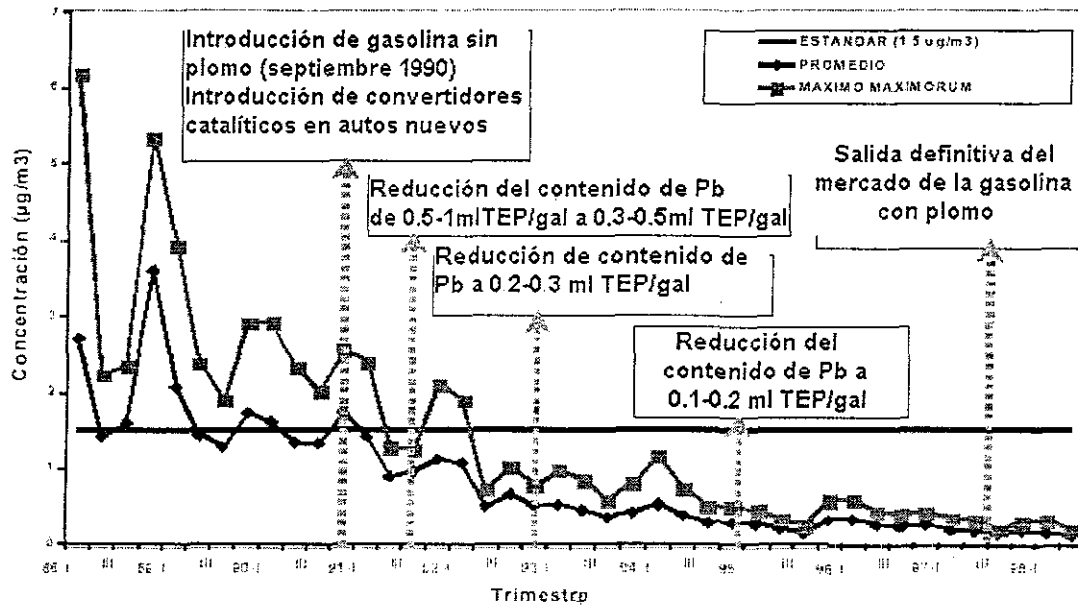


Figura 1.6. Niveles de plomo en el aire del Valle de México (1988-1998).²¹

Fuente: Red automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México

Aparte de este plomo ambiental, la mayor fuente de incorporación sigue siendo la dieta que, afortunadamente, al depender de la asimilación a nivel digestivo, constituye una fuente de absorción muy poco intensa debido a la fácil formación de compuestos insolubles de Pb^{2+} con aniones muy abundantes en el organismo, tales como el fosfato, $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$, o el carbonato básico, $\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$. La parte del plomo que se logra absorber puede acumularse en el sistema óseo, que de esta manera actúa como agente desintoxicante, ya que lo inmoviliza

Con el paso del tiempo, los límites máximos permisibles establecidos para la concentración de plomo en sangre han variado, debido al mayor conocimiento de los efectos tóxicos del metal. En los últimos años los centros para el control de enfermedades de los Estados Unidos (U.S. Centers for Disease Control, CDC) han modificado las cifras de plomo en sangre en que sobreviene la intoxicación como sigue: en los años sesenta: $600 \mu\text{g}/\text{L}$; a partir de 1975: $300 \mu\text{g}/\text{L}$, y desde 1985: $25 \mu\text{g}/\text{L}$.²² quedando finalmente un esquema como el que se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Niveles para intoxicación por plomo según la CDC.²³

Clase	Nivel de Pb en sangre (µg/dL)	Descripción
I	inferior a 10	Dentro del promedio, no se considera envenenamiento.
IIA	10 – 14	Cerca del límite, pero aún no se requiere intervención médica
IIB	15 – 19	Los efectos del envenenamiento, aunque sutiles, se pueden identificar cuando hay exposición prolongada, es decir envenenamiento crónico. En niños podría haber trastornos del desarrollo y el comportamiento e incluso un descenso en el Cociente Intelectual (IQ).
III	20 – 44	Es el intervalo entre envenenamiento ligero y agudo. En niños se debe evaluar si existe algún trastorno auditivo o del aprendizaje. Se requiere intervención médica.
IV	45 – 69	Es posible que haya síntomas físicos evidentes. En niños se debe evaluar la historia de su desarrollo. La toxicidad aguda produce vómitos y falta de apetito, disfunción renal y desórdenes nerviosos. Estos efectos se ven potenciados en los casos de pacientes que presentan deficiencias de calcio o hierro. ²⁴
V	superior a 69	Se considera como una emergencia médica. Puede existir ya daño cerebral.

En la actualidad, las fuentes principales de exposición al plomo son:²⁵

- Respirar o ingerir “suelos”, polvo, agua o aire contaminados. Algunas fuentes son: tiraderos de basura que con frecuencia contienen plomo, uso de combustibles fósiles con compuestos de plomo, fundición para extraer el metal de sus minerales, e industrias relacionadas
- Ingerir pinturas con plomo. Estas pinturas, que fueron usadas con frecuencia en el pasado, cuando se hacen viejas y se degradan tanto en interiores como en

exteriores, pueden ocasionar altos niveles de plomo en la sangre. La ingestión de pequeñas hojuelas de esta pintura es un peligro frecuente para los niños.

- Beber agua que haya pasado por tubería de plomo o que contengan uniones soldadas con plomo
- Exposición laboral. Este caso es muy común en la producción y reciclaje de baterías y acumuladores; construcción de barcos y procesamiento de hierro; pintura, recubrimiento y demolición de estructuras de acero; reparación y producción de radiadores; desecho de metales y producción de lastre para pesca; producción de vidrio emplomado; producción y fundido de minerales de plomo así como operaciones de reciclaje de materiales que contienen plomo.
- Consumir alimentos cultivados en suelos contaminados con plomo o que se han almacenado en latas con soldadura de plomo. En México la fuente principal, descartando la atmosférica ya comentada, la han constituido los alimentos preparados en cazuelas de barro vidriado.²⁶

La toxicidad de plomo se relaciona principalmente con su capacidad de obstruir los procesos en los que se encuentra involucrado el calcio, al sustituirlo en sus sitios de unión,²⁷ así como también sucede con algunos sitios correspondientes a hierro. El hecho de que el tipo de intoxicación con plomo que puede ser mayormente revertida por la ingestión de una dieta rica en calcio, es la proveniente del uso de loza de barro vidriado para la elaboración, almacenamiento y consumo de los alimentos, indica que la competencia con calcio se desarrolla a nivel digestivo²⁶

Se ha observado una alta correlación en la absorción de plomo con los niveles de Calbindina²⁸. De esta manera, la absorción tanto de calcio como de plomo a nivel

intestinal resulta fuertemente influida por la presencia de la vitamina D,²⁹ dado que como se comentó, la síntesis de la proteína es dependiente de esta vitamina. Su presencia puede aumentar la incorporación de Pb^{2+} y Ca^{2+} , 4 y 8 veces respectivamente, comparando con organismos deficientes en la vitamina. En estudios del grupo de Fullmer en 1985,³⁰ se determinó una mayor afinidad de las Calbindinas hacia el plomo que hacia calcio. La evidencia señala que el plomo se une a los sitios afines a calcio, con una constante de asociación aparente (promedio por sitio) $\log \beta = 7.03$, en un medio con fuerza iónica 0.15, y $pH=6.5$, comparado con $\log \beta=6.57$ para el Ca, como se mencionó en la sección 1.1.3.

La interrelación de las concentraciones de plomo y de calcio en la ingesta y la asimilación de ambos cationes muestra un patrón muy complicado, por lo que Fullmer³¹ enfatiza la importancia de hacer una caracterización minuciosa *modelando* el sistema animal. De cualquier manera es notable que a mayor consumo de calcio es menor la incorporación de plomo en varios órganos (cerebro, fémur, corazón, riñón, hígado, y testículos).¹⁶

1.2.2. Cadmio

Como catión divalente, este elemento presenta fuertes analogías químicas con dos elementos esenciales, el Zn^{2+} -con configuración electrónica d^{10} , lo cual da lugar a enlaces de coordinación de naturaleza similar- y el Ca^{2+} - $r_{Ca}=1.2\text{\AA}$, $r_{Cd}=1.17\text{\AA}$, dando lugar a interacciones de tipo electrostático similares-. Estas analogías dan cuenta de sus principales efectos tóxicos²⁰

El cadmio, por un lado, puede desplazar al Zn en algunos de sus sitios activos y por el otro, compite con el calcio en ciertos sistemas biológicos y también puede ser

incorporado al hueso, ocupando los sitios de calcio en las apatitas biológicas, lo que causa debilitamiento y deformación de los huesos

El acceso del cadmio a los organismos puede ser por vía respiratoria o bien a través de los alimentos. Las fuentes principales de contaminación de este metal son las pilas alcalinas, pigmentos y chapados²⁴. No es capaz de atravesar las membranas celulares tan fácilmente como el mercurio, seguramente debido a la escasa tendencia a formar derivados organometálicos. Sus efectos bioquímicos generales son muy variados, actuando como inhibidor de numerosos procesos celulares al afectar notablemente el metabolismo de algunos otros elementos esenciales aparte del zinc y el calcio (Cu, Fe, Se) Cuando estos elementos están en defecto, la toxicidad del cadmio resulta potenciada, así como disminuida cuando el organismo cuenta con un exceso de ellos.

Respecto a la interrelación del cadmio con el calcio, se ha reconocido una cierta competencia en la asimilación de estos cationes análoga a la comentada para el Pb^{2+} , demostrándose que bajos niveles de calcio favorecen la absorción de cadmio. Esto probablemente se deba al incremento de la actividad de las proteínas enlazadoras de calcio CaBP,³² y que por otro lado, la presencia de cadmio en la dieta afecta el metabolismo del calcio, pues disminuye la asimilación del calcio mediante la disminución de los niveles de ICaBP¹⁷ Sin embargo, a diferencia del plomo, el cadmio cuenta con mecanismos alternos de asimilación en regiones previas al duodeno -etapa en la que la ICaBP juega un papel muy importante-, en los cuales no hay competencia inhibitoria por parte del calcio³³.

Los síntomas de intoxicación aguda incluyen fuertes dolores de cabeza, vómitos y calambres abdominales, acompañados de cuadros de hipertensión. En el caso de la

intoxicación crónica, se observa disfunción renal por una creciente eliminación urinaria de glucosa, aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular, aumento en la relación Ca/P, anemia, rinitis, así como el efecto debilitador del sistema óseo por reemplazo del calcio como se comentó. Se ha determinado al cadmio como causante de tumores malignos y de alteraciones cromosomales

1.2.3 Zinc

A diferencia de los cationes que se acaban de presentar, el zinc es un elemento esencial, casi tan abundante como el hierro. Su asimilación en el sistema digestivo se da a nivel del íleo en un transporte activo muy bien regulado que asegura su homeostasis.³⁴ Por esto la toxicidad de este catión es principalmente asociada a su deficiencia, aunque existen síntomas asociados a su exceso. La concentración de Zn^{2+} libre a nivel celular es comparable a la de Ca^{2+} pues va de $10^{-9}M$ en el citoplasma, a $10^{-3}M$ en algunas vesículas. Los resultados de un estudio realizado por Koo y colaboradores¹⁵ sugieren que la homeostasis de zinc no involucra mecanismos de transporte dependientes de vitamina D como la CaBP.

Los síntomas asociados a la deficiencia son atrasos en la maduración sexual, en el crecimiento, prolongación del proceso de cicatrización, susceptibilidad a las infecciones. Por otro lado la intoxicación aguda se caracteriza por enfermedades gástricas, mareo, nauseas; mientras que la de tipo crónica incluye problemas gástricos, disminución de la actividad ceruloplasmina y concentración de cobre así como desbalance de tipo de colesterol presente en la sangre.

Mientras que los niveles de Ca^{2+} de la ingesta no parecen afectar la asimilación de Zn^{2+} , sí influyen ligeramente en la distribución del Zn^{2+} en los tejidos, ya que se observa que

hay una mayor incorporación ósea de zinc en condiciones de una dieta abundante en calcio, mientras que la presencia de este catión en tejido renal es máxima en una dieta deficiente en calcio¹⁶. En el sentido inverso, el efecto de la presencia de zinc en el metabolismo del calcio es similar al que presenta el cadmio, inhibiendo la síntesis de la proteína ICaBP¹⁷, originando así una menor asimilación de calcio.

Aunque los átomos donadores más usuales del zinc en el ámbito bioquímico son S y N, existen también casos como la carboxipeptidasa B en la que se encuentra ligado a O y N. En ambos tipos de proteínas, tanto plomo como cadmio suelen reemplazar al zinc en sus sitios de coordinación⁴.

1.3. Química de Coordinación de los cationes Ca^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+}

Como se mencionó en la introducción, el comportamiento a nivel biológico de estos cationes guardará una estrecha relación con sus propiedades químicas y estructurales, por lo que se enumerarán algunas a continuación.

1.3.1. Principio de los Ácidos y Bases Duros y Blandos

En 1963 Pearson³⁵ trató de sistematizar la reactividad de los ácidos y las bases de Lewis y creó un sistema donde clasifica, estudiando el comportamiento de los compuestos conocidos, a las bases y a los ácidos como duros o blandos. Los criterios para la clasificación se enumeran a continuación:

- Los ácidos duros tienen átomos aceptores pequeños ($r < 0.9\text{Å}$), con poca electronegatividad (de 0.7 a 1.6 en la escala de Pauling), frecuentemente con carga positiva alta ($\geq +3$). No tienen pares de electrones no compartidos en sus capas de valencia, es decir, no son polarizables.

- Los ácidos de Lewis blandos se caracterizan por ser muy electronegativos (de 1.9 a 2.54). Son átomos aceptores de gran tamaño, carga positiva pequeña y alta polarizabilidad, y suelen contener pares de electrones no compartidos (*p* o *d*) en su capa de valencia.
- Las bases duras son, por lo general moléculas cuyos átomos donadores son oxígeno y flúor, es decir muy electronegativos (3.44 y 3.98) y pequeños.
- Las bases blandas tienen átomos donadores cuya electronegatividad es moderada (entre 2 y 3) y son aniones o moléculas de gran tamaño. Entre los átomos donadores característicos se encuentran: C, P, As, S, Se, Te, Br y I.

Mediante la observación de la Naturaleza y de los sistemas de reacción, Pearson concluye que los ácidos duros prefieren unirse a bases duras y los ácidos blandos prefieren unirse a las bases blandas. Las bases o ácidos que se consideran intermedios pueden reaccionar con ácidos o bases tanto duros como blandos. Para evaluar la tendencia de la interacción en un sistema desde esta perspectiva se deben considerar tanto las interacciones iniciales, incluyendo al disolvente, como las que serían las interacciones en los productos.

Es importante hacer notar que los cationes de interés para este trabajo de investigación poseen una configuración electrónica ya sea d^0 o d^{10} , por lo que no habrán geometrías preferidas provocadas por efectos de energía de estabilización de campo cristalino.

En la clasificación inicial de los ácidos, Pearson coloca al Cd^{2+} entre los cationes blandos y al Pb^{2+} entre los intermedios junto al Zn^{2+} . Esta clasificación permanece así hasta 1983, en que Pearson publica con Parr³⁶ el resultado de cálculos que generan un parámetro denominado dureza absoluta, que al igual que la electronegatividad absoluta depende de

la energía de ionización (I_S) y la afinidad electrónica de la especie (A_S) y que se definen así:

$$\chi_S = \frac{1}{2} (I_S + A_S) = \text{electronegatividad absoluta} \quad \eta_S = \frac{1}{2} (I_S - A_S) = \text{dureza absoluta}$$

Como la energía de ionización es siempre mayor que la afinidad electrónica, el valor mínimo de la dureza es cero, lo cual corresponde a su vez a la mayor blandura. Con estos cálculos, se pretende ordenar a las especies, pues anteriormente se colocaban únicamente en unas cuantas categorías. A continuación (Tabla 1.3) se presentan los parámetros relacionados con el carácter de dureza de los cationes de nuestro interés

Tabla 1.3. Parámetros relacionados con la dureza de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} .

Catión	χ_P^{39}	Electronegatividad absoluta (eV) ³⁶	Dureza absoluta (eV) ³⁶	Radio iónico N.C. 7 (Å) ³⁹	Z^{*37*}	$\frac{Z^*}{r}$
Ca^{2+}	1.0	31.6	19.7	1.20	4.4	3.66
Zn^{2+}	1.65	28.8	10.8	0.96	5.97	6.21
Cd^{2+}	1.7	27.2	10.3	1.17	8.19	6.91
Pb^{2+}	1.87	23.5	8.5	1.37	12.39	9.04

*carga nuclear efectiva de los cationes de acuerdo a Clementi y Raimondi

En la tabla anterior se puede observar que el Pb^{2+} debiera considerarse como más blando que el Cd^{2+} , y éste a su vez, con dureza muy similar al Zn^{2+} .

Actualmente los libros de texto, como se comentaba en la introducción, presentan ambas posibilidades de clasificación para Cd^{2+} y Pb^{2+} , es decir, como intermedios o como blandos, mientras que Ca^{2+} siempre es considerado duro y Zn^{2+} intermedio. Wulfsberg³⁸ en 1991, al clasificar los elementos en la tabla periódica de acuerdo a su dureza, coloca a zinc y cadmio como intermedios y al plomo como blando. Huheey en 1993³⁹ sigue utilizando la clasificación de Pearson de 1963. Shriver y colaboradores en 1998⁴⁰ plantean el concepto de dureza y blandura directamente mediante la ecuación de la

dureza absoluta. En textos de química bioinorgánica se encuentra a Lippard³ catalogando a Pb^{2+} y Cd^{2+} como blandos mientras que Fraústo da Silva y Williams⁴ siguen la clasificación original de 1963

Ya que este carácter de los iones puede intervenir de manera determinante en los átomos donadores que participen en la formación del compuesto de coordinación, además de influir en la intensidad de la interacción con dichos átomos donadores, resulta importante enfatizar el tipo de interacción que se establece con cada tipo de ion. Las especies duras favorecen interacciones principalmente electrostáticas y las especies blandas interacciones de tipo orbital, es decir, covalentes.

Las cargas altas y positivas de iones pequeños favorecerán el enlace iónico con aniones que, teniendo carga negativa grande y pequeño tamaño, serán fijados por la interacción electrostática

Por el otro lado, cuando los ácidos tienen electronegatividades similares a las bases con las que interactúen, es decir, cationes de alta afinidad electrónica y bases de bajo potencial de ionización, presentarán una tendencia mucho menos acentuada de incremento en la energía debido a la repulsión interelectrónica en la curva de energía potencial, lo cual permite una aproximación más cercana entre las especies, y por lo tanto una mejor superposición orbital, para la formación de un enlace covalente.

Las bases blandas no tendrán posibilidad de una buena superposición con los ácidos duros para generar una interacción covalente, y la interacción iónica será débil debido a la baja carga y gran tamaño de la base.

1.3.2. Calcio

En 1996 J.P. Glusker y colaboradores⁴¹ realizaron un estudio exhaustivo de las estructuras cristalinas disponibles de calcio, resultando en observaciones muy interesantes, como por ejemplo que de 309 estructuras, ninguna presenta enlaces Ca-S, consistentemente con su clasificación como ácido duro. Se presenta en la Tabla 1.4 la contabilización de los enlaces a los diferentes átomos donadores en los compuestos almacenados en la base de datos hasta entonces, clasificados por el número de coordinación en cada complejo. Se resalta la columna de enlaces a oxígeno por representar la gran mayoría de las interacciones observadas, un 91% del total de enlaces. También los número de coordinación 6, 7 y 8 por ser los que el calcio presenta con más frecuencia.

Tabla 1.4. Cantidad de enlaces Ca-X encontrados en estructuras cristalinas almacenadas en CSD de acuerdo al número de coordinación del complejo

N.C.	Ca ²⁺ -O		Ca ²⁺ -N		Ca ²⁺ -S		Ca ²⁺ -Cl		Ca ²⁺ -Br		# total de enlaces	
	#*	%*	#	%	#	%	#	%	#	%	#	% del total
3	0	0	3	100	0	0	0	0	0	0	3	0.2
4	6	75	2	25	0	0	0	0	0	0	8	0.4
5	5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.3
6	347	80.3	69	16	0	0	14	3.2	2	0.5	432	22.1
7	466	93.8	25	5	0	0	4	0.8	2	0.4	497	25.4
8	819	93.9	51	5.8	0	0	2	0.2	0	0	872	44.6
9	88	97.8	2	2.2	0	0	0	0	0	0	90	4.6
10	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	50	2.6
Ca ²⁺ -X	1781	91	152	7.8	0	0	20	1	4	0.2	1957	100

* Número de enlaces encontrados en los 309 complejos encontrados en la base de datos con ese átomo y ese número de coordinación (N.C.)

* Porcentaje en referencia al total de enlaces presentes en los complejos con el número de coordinación (N.C.) del renglón

De los compuestos que contienen grupos carboxilato enlazados, se observa que conforme aumenta el número de coordinación en el centro metálico, es más frecuente encontrar al carboxilato interactuando de forma bidentada⁴². Es decir, en los complejos

hexacoordinados todos los carboxilos actúan como ligantes monodentados, en los heptacoordinados, el 16% actúa como bidentado y en los octacoordinados el 25%, a diferencia del magnesio, por ejemplo, que únicamente enlaza a los grupos carboxilo de forma monodentada.

Sobre su interacción con proteínas, el hecho de que la carga local del Ca^{2+} tenga que ser neutralizada mediante su interacción con los átomos donadores, siempre oxígenos, y dado que el número de coordinación puede ser hasta 8, permite -o induce- a que además de enlazarse a grupos carboxilato, utilice como ligantes a grupos con oxígenos con baja carga, como glutamina y asparagina (amida), treonina y serina (hidroxilo), grupos carbonilo de la cadena peptídica y moléculas de agua.

Se ha calculado la aportación de carga negativa en los grupos donadores para la interacción electrostática con los siguientes resultados: -1.0 para el carboxilato, -0.38 para un oxígeno de carbonilo, -0.14 para un grupo hidroxilo mientras que 0.0 para una molécula de agua.⁴³

1.3.3. Plomo

Además de la falta de información respecto a la interacción a nivel molecular del plomo con los sitios biológicos, existe escasa información estructural respecto al plomo en un contexto más inorgánico, si comparamos con otros cationes como Zn^{2+} . En una búsqueda reciente en el CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre),⁴⁴ por ejemplo, en tanto que para zinc hay 2979 estructuras tridimensionales determinadas que contienen en sus esferas de coordinación O y/o N, para plomo sólo se encuentran 514. En la Figura 1.7 se encuentran desglosados los compuestos de acuerdo con el tipo de átomo que se encuentra en su esfera de coordinación. De las 889 estructuras tridimensionales determinadas de

compuestos con plomo, tan sólo 9 se puede considerar que corresponden a derivados de biomoléculas siendo estas acetato, oxalato, glicolato, benzoilglicina, ácido glucónico, γ -ciclodextrina, propionato, citrato y al aspartato que se obtuvo en este trabajo

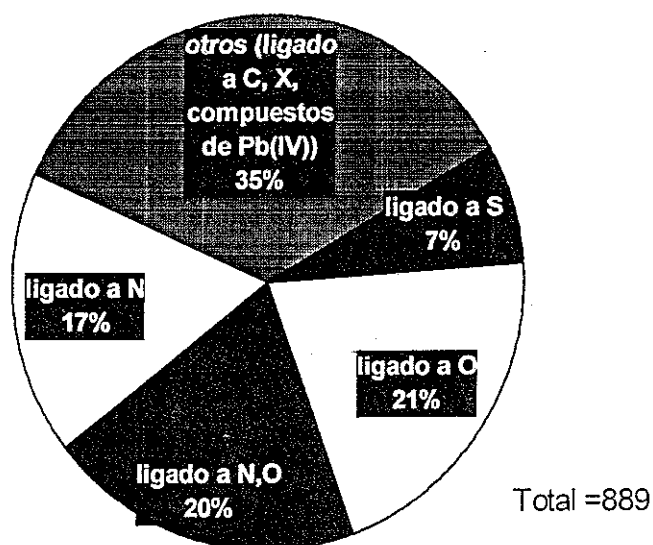


Figura 1.7. Estructuras cristalinas de compuestos de Pb publicadas hasta marzo de 2002

En 1998, el grupo de J. P. Glusker⁴⁵ se dio a la tarea de clasificar y sistematizar las tendencias en la geometría alrededor del átomo central en complejos de plomo. Para realizar esta clasificación se basaron en 329 estructuras cristalinas seleccionadas de la CCDC;⁴⁴ 255 con Pb(II) y el resto con Pb(IV) Su trabajo arrojó varias conclusiones sobre los factores que determinan la distribución de los ligantes alrededor del plomo.

En los compuestos de plomo la distribución de los ligantes alrededor del átomo central se puede clasificar en dos grupos: holodirigida y hemidirigida:

- **Holodirigida:** Si al dibujar una esfera imaginaria alrededor del metal, los ligantes se distribuyen homogéneamente en todo el espacio.

- **Hemidirigida:** Si al dibujar la esfera imaginaria alrededor del metal, los ligantes se encuentran distribuidos únicamente en una sección de ese espacio y se puede apreciar un hueco

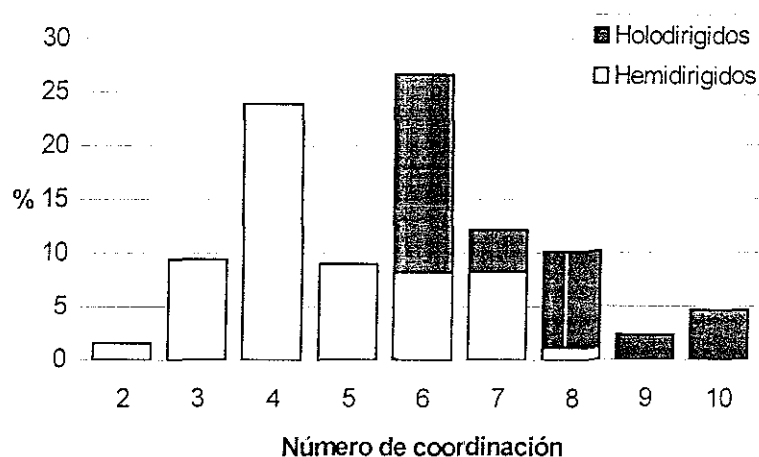


Figura 1.8. Porcentajes de compuestos de Pb(II) con diferentes números de coordinación⁴⁶ (Tamaño de muestra: 255 estructuras cristalinas).

Todos los compuestos de Pb(IV) tienen una geometría de coordinación holodirigida, ya que en este caso el metal no cuenta con un par de electrones libre. Por otro lado, los compuestos con Pb(II) pueden presentar ambas opciones de geometría de coordinación (Figura 1.8). Para números de coordinación de 2 a 5 todos los compuestos de Pb(II) presentan geometría hemidirigida. En los casos con números de coordinación 9 y 10, aunque son escasos, todos los compuestos de Pb(II) tienen geometría holodirigida. Para números de coordinación 6, 7 y 8 se encuentran reportadas ambas geometrías.

Los factores que favorecen cada tipo de conformación en la esfera de coordinación corresponden a los que se enumeran a continuación:

Para una distribución holodirigida:

- Número de coordinación alto
- Interacciones repulsivas entre los ligantes

- Ligantes de tipo blando
- Mayor transferencia de densidad electrónica (de los ligantes al Pb(II))
- Enlaces de tipo más covalente.

Mientras que para la conformación hemidirigida:

- El número de coordinación es bajo
- Existen interacciones de atracción entre los ligantes
- El par libre tiene carácter *p*
- Los ligantes son duros
- Poca transferencia de densidad electrónica de los ligantes al Pb(II)
- Los enlaces son de tipo más iónico

1.3.4. Zinc

Fue en 1995 que el grupo de Glusker⁴⁷ analizó a los compuestos de coordinación de Zn^{2+} . Energéticamente no pareciera tener una preferencia por un número de coordinación tetra, penta o hexacoordinado, sin embargo entre las estructuras cristalinas recopiladas de la literatura, sí se encuentra una cantidad mayor de complejos tetra y hexacoordinados. En la Tabla 1.5 se puede observar la contabilización de los enlaces a los diferentes átomos donadores en los compuestos almacenados en la base de datos hasta entonces, clasificados por el número de coordinación en cada complejo, y comparados con lo determinado para magnesio, catión que teniendo la misma carga posee también radios iónicos muy similares al Zn^{2+} .³⁹ En el último renglón se presenta el porcentaje que representan del total las interacciones del Zn^{2+} con cada átomo donador.

Tabla 1.5. Cantidad de enlaces Zn-X en estructuras cristalinas almacenadas en CSD de acuerdo al número de coordinación del complejo, en comparación con Mg²⁺

N.C.	M ²⁺ -N			M ²⁺ -O			M ²⁺ -S			M ²⁺ -Cl			M ²⁺ -Br			M...X				
	#	%Zn	%Mg	#	%Zn	%Mg	#	%Zn	%Mg	#	%Zn	%Mg	#	%Zn	%Mg	#	%Zn	%Mg		
3	0	0	0	0	0	100	3	100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	5
4	246	30	38	149	17	3	141	17	3	272	32	11	36	4	9	844	42	9	9	9
5	229	60	56	98	26	43	30	8	0	18	5	0	5	1	1	380	19	7	7	7
6	259	37	9	424	60	82	17	2	0	2	0	2	7	0	2	702	35	79	79	79
7	20	29	18	45	64	75	4	6	0	1	1	7	0	0	0	70	4	4	4	4
Zn...X	754	38		716	36		195	10		293	15		41	2		1999	100			

La preponderancia de la geometría tetraédrica es causada principalmente por el ion $ZnCl_4^{2-}$ presente en varias estructuras como contraión, representando el 58% de los enlaces Zn-Cl en estructuras que presentan geometría tetraédrica. Los otros átomos donadores que participan ampliamente en los complejos tetracoordinados de Zn^{2+} son nitrógeno, y en casi la misma medida, azufre y oxígeno.

Para el número de coordinación 5 el nitrógeno es el átomo donador preferido, el 20% de ellos en ciclos porfirínicos

De la gran cantidad de compuestos que presentan número de coordinación 6, únicamente un 4% incluye al hexaacouzinc, mientras que en el caso de magnesio representan un 25%

El volumen de los átomos de azufre y cloro no los hace muy propicios para arreglarse en una esfera de coordinación con otros 5 átomos donadores, por lo que su participación en este tipo de esfera es mínima. La coordinación de los átomos de nitrógeno es más acentuada en los complejos pentacoordinados, mientras que para los átomos de oxígeno se da en la esfera hexacoordinada.

Las geometrías que presentan los complejos de zinc son muy aproximadas a tetraedros en los tetracoordinados y a octaedros en las esferas hexacoordinadas

1.4. Constantes de equilibrio

1.4.1 Método Potenciométrico

Para la determinación de constantes de equilibrio entre un catión metálico M^{m+} y un anión de un ácido débil L^{l-} , como es el caso más frecuente, y de hecho el que nos ocupa en este trabajo, frecuentemente se aplica el método potenciométrico, en particular pHmétrico. El problema consiste en la determinación de la naturaleza y concentración de todas las especies presentes en las soluciones de los valores medidos de pH ($-\log[H^+]$) a lo largo de una titulación. Debe tenerse en cuenta que si dos o más especies en disolución tienen cargas idénticas y el mismo número de iones metálicos y moléculas de ligante, potenciométricamente se podrá determinar únicamente el total de las concentraciones de estas especie. Por ejemplo, especies complejas como $[FeEDTA]^{-1}$ y $[Fe(OH)EDTAH]^{-1}$, sus isómeros configuracionales y conformacionales serán indistinguibles.

A lo largo de este estudio se ha trabajado con complejos que contienen únicamente un tipo de catión metálico y de ligante, pero con la posibilidad de varios protones ionizables en el ligante o iones hidroxilo en la esfera de coordinación del catión.

Las constantes de estabilidad globales para un complejo dado se definen respecto a las actividades de las especies iónicas constituyentes no complejadas:

$$\beta_{M,H_j,L_k} = \frac{\{M_i H_j L_k\}^{im+j-kl}}{\{M^{m+}\}^i \{H^+\}^j \{L^{l-}\}^k}$$

$$\beta_{M,H_j,L_k} = \frac{[M_i H_j L_k]^{im+j-kl} \gamma_{im+j-kl}}{[M^{m+}]^i [H^+]^j [L^{l-}]^k (\gamma_m^i \gamma_l^j \gamma_l^k)}$$

La primera ecuación está definida a partir de las actividades, y la segunda en términos de la concentración, para lo cual se consideran los coeficientes de actividad (γ)

correspondientes la carga de cada ion. Las cargas se expresan como: m para el catión y l para el anión, por supuesto, la carga del protón es 1.

Las especies que contienen hidróxido se pueden representar formalmente en términos de la actividad del ion hidrógeno usando la constante de disociación iónica del agua:

$$\{\text{OH}^{-}\} = K_w \{\text{H}^{+}\}^{-1}$$

Por lo tanto, para la formación del complejo de plomo $[\text{Pb}(\text{OH})_4^{2-}]$, por ejemplo, la constante de formación se expresa:

$$\beta = \frac{\{\text{Pb}(\text{OH})_4^{2-}\}}{\{\text{Pb}^{2+}\}\{\text{OH}^{-}\}^4} = \frac{\{\text{Pb}(\text{OH})_4^{2-}\}\{\text{H}^{+}\}^4}{\{\text{Pb}^{2+}\}K_w^4}$$

Para evitar el cálculo de los coeficientes de actividad, se trabaja a una fuerza iónica constante —debida a la presencia de electrolitos inertes que no formen complejos con los reactivos en concentraciones mayores por 2 órdenes de magnitud respecto a los analitos—, lo cual provoca que los coeficientes de actividad permanezcan prácticamente constantes y puedan incorporarse al valor de la constante de estabilidad en términos de la concentración:

$$\beta_{ijk} = \frac{[M_i H_j L_k]}{[M]^i [H]^j [L]^k}$$

Como se notará, por simplicidad ya no se expresan las cargas de los componentes. Estas constantes sólo serán válidas en condiciones cercanas a aquellas en las que fueron determinadas, lo cual no les quita validez como constantes de equilibrio, en que como estado estándar se indica la fuerza iónica impuesta. Las constantes de formación se expresarán denotando con los subíndices los coeficientes estequiométricos de catión, protón y ligante requeridos para describir al complejo.

Para calcular las constantes de estabilidad a partir de los datos de una titulación potenciométrica en que se agrega una base BOH , se recurre al balanceo de masa y carga. La concentración total, por un lado del catión agregado como MX_m —donde X es un anión monovalente—, y del ligante por el otro, se pueden escribir como:

$$T_M = [M] + \sum_i [M_i H_j L_k] \text{—sobre todas las especies que contienen } M\text{—}$$

$$T_L = [L] + \sum_k [M_i H_j L_k] \text{—sobre todas las especies que contienen } L\text{—}$$

Donde T_M es la concentración total de metal y T_L la correspondiente al ligante

La condición de electroneutralidad o balance de carga expresa el hecho de que la disolución que contiene a los iones deberá ser eléctricamente neutra, como se muestra a continuación:

$$[H] + [B] + m[M] - [X] - [OH] - l[L] + \sum_{\text{sobre todas las especies complejas}} (im+j-k) [M_i H_j L_k] = 0$$

Sustituyendo la concentración de la especie compleja por la expresión de su constante de formación, la ecuación anterior se puede escribir así:

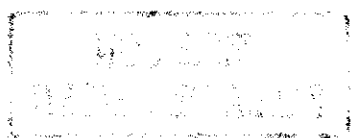
$$T_M = [M] + \sum_i \beta_{ijk} [M]^i [H]^j [L]^k \text{—sobre todas las especies que contienen } M\text{—}$$

$$T_L = [L] + \sum_k \beta_{ijk} [M]^i [H]^j [L]^k \text{—sobre todas las especies que contienen } L\text{—}$$

$$[H] + [B] + m[M] - [X] - [OH] - l[L] + \sum (im+j-k) \beta_{ijk} [M]^i [H]^j [L]^k = 0$$

Durante toda la titulación, para cada punto, T_M , T_L , $[B]$ y $[X]$ son valores conocidos, y se tienen 3 desconocidos: $[M]$, $[L]$, y la constante de formación β , que pueden ser calculados al medirse la actividad de protón, $\beta = f([M], [L], 10^{-pH})$. Ya que siempre se determinan más puntos en la titulación que el número de constantes desconocidas, se puede calcular a través de un procedimiento de mínimos cuadrados un conjunto de

constantes de estabilidad promedio que describan mejor los datos



Se define a s –suma cuadrática de los residuos– como $\sum[\text{valor de la titulación}-\text{valor calculado de la titulación}]^2$. El problema matemático que se enfrenta es encontrar los valores numéricos de las constantes que den un valor mínimo de s en cada punto de la titulación, sujetos a las restricciones del sistema dadas por las concentraciones totales y el balanceo de carga

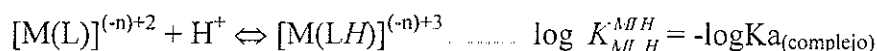
1.4.2 Operaciones con constantes de equilibrio

Debido a que las constantes de equilibrio son la medida de una función de estado, entonces su valor es independiente de la trayectoria que se siga entre el estado inicial (reactivos) y el final (productos),⁵⁵

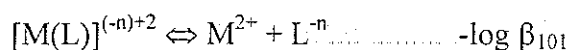
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

su logaritmo puede calcularse como la suma o la diferencia apropiada de las constantes de equilibrio de las reacciones intermedias.

Durante este trabajo, por ejemplo, a partir de las constantes de formación globales, se obtendrán valores de constantes parciales, como por ejemplo el pKa del grupo amino en el complejo que puede expresarse como el $\log K_{MLH}^{MLH}$:

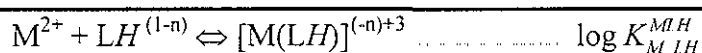
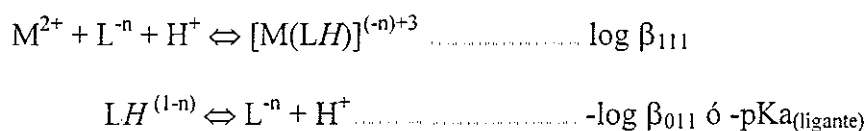


Que se puede calcular como la resta: $\log \beta_{101} - \log \beta_{111}$

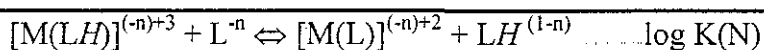
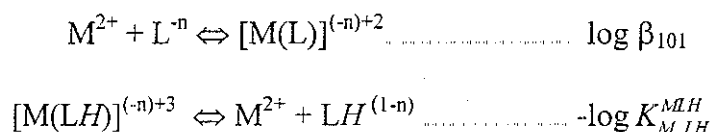


Para obtener el valor de la constante de estabilidad relacionada con la interacción de los grupos oxigenados con el catión, se recurre al estado del ligante en el que el grupo amino

se encuentra protonado, y por lo tanto no disponible para la coordinación. La constante $\log K_{M LH}^{MLH}$ (calculada como $\log \beta_{111} - (\log \beta_{011} \text{ ó } pK_{a(\text{amino del ligante})})$)



Finalmente, la contribución a la estabilidad debida a la interacción con nitrógeno ($\log K(N)$) se puede calcular por medio de la diferencia entre la constante de formación del complejo ML y la constante de formación de MLH donde el ligante tiene al grupo amino protonado ($\log \beta_{101} - \log K_{M LH}^{MLH}$)



En cada capítulo se esquematizará la reacción correspondiente dependiendo del ligante estudiado.

1.4.3. Factores que influyen en la estabilidad

El valor numérico de las constantes de equilibrio de una reacción no proporciona ninguna información sobre el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio, sólo indica la extensión en que dicha reacción tiene lugar cuando se alcanza el estado de equilibrio, incluso en sistemas en los que el estado inicial no corresponda a la proporción estequiométrica. Según el principio de Le Chatelier, si se hace aumentar la concentración

de A, el sistema reacciona consumiendo A, es decir, por medio de la reacción de A y B para formar C y D. Se alcanza así una nueva situación de equilibrio, más desplazado hacia la formación de C y D, de forma que las nuevas concentraciones de todos los componentes sigan dando el mismo valor de K_{eq} .⁵⁶

Los factores que pueden favorecer la obtención de productos (compuestos de coordinación) a partir de reactivos, son, entre otros:

- fuerza de los enlaces de coordinación,
- fuerza de los enlaces covalentes, o arreglo de iones en una red cristalina
- formación de anillos quelato
- afinidad de los cationes por los átomos donadores.

Para los iones de la primera serie de transición en su estado de oxidación 2+, Irving y Williams en 1948,⁵⁷ determinaron una secuencia de estabilidad para la formación de los complejos con un mismo ligante, la cual resulta prácticamente independiente del ligante con el que se trabaje, mientras que está relacionada con el cociente $\frac{Z^*}{r_{ion}}$ y la energía de estabilización de campo cristalino (EECC) (Figura 1.10).

Sin embargo, para los cationes de este trabajo, que no poseen energía de estabilización de campo cristalino, el orden de estabilidad en los complejos dependerá del ligante, específicamente de los átomos donadores participantes en la coordinación.^{58,59} La ubicación de los cationes Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} en la Tabla 1.6 corresponde a sus constantes de estabilidad en comparación con los cationes de la regla de estabilidad de Irving-Williams. Se presenta la amplitud en unidades logarítmicas que despliega cada ligante desde la formación del complejo con Mg^{2+} a la del complejo con Cu^{2+} .

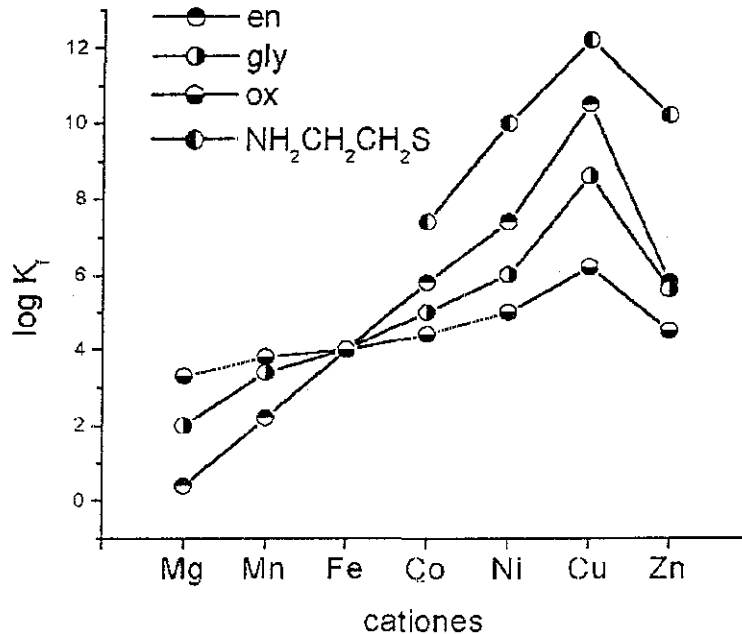


Figura 1.10. Variación en las constantes de formación para los cationes M²⁺ de la serie de Irving Williams

Tabla 1.6. Ubicación de los cationes Pb²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺ de acuerdo al tipo de ligante en la “regla de estabilidad”*

Ligante	Donadores	Amplitud escala	Mg < Mn < Fe < Co < Ni < Cu
Oxalato	O,O	2.1	Cd Zn Pb
Glicina	N,O	6.1	Cd Zn Pb
Histidina	N,=N	8.2	Cd Pb Zn
NH ₂ (CH ₂) ₂ NH ₂	N, N	10.1	Pb Cd Zn
NH ₂ (CH ₂) ₂ S-	N,S	11	Zn Cd Pb
Imidazol	=N	4	Pb Zn Cd
Amoniaco	NH ₃	4	Pb Zn Cd
Hidróxido	OH-	3.7	Cd Zn Pb

*Cotejado y corregido con las constantes críticas de Martell y Smith⁵⁹

A partir de los valores de las constantes de acidez y de formación de los compuestos de coordinación, podremos inferir **en caso de formar compuestos análogos**, la fuerza relativa de los enlaces de coordinación que se formen entre los cationes y los ligantes, es decir, su afinidad.

1.5. RMN: ^1H , NOE; 2D: NOESY; pH variable

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es probablemente la técnica analítica más ampliamente usada e importante para el químico experimental moderno. Esto es debido a su amplia aplicabilidad, su relativa sencillez en el uso y la gran cantidad de información química y estructural que se puede obtener mediante ella.⁶⁰ Los núcleos que se estudian con más frecuencia son ^1H y ^{13}C , aunque existe la posibilidad de observar otros (^{19}F , ^{31}P , ^{207}Pb , ^{111}Cd , ^{15}N , etc.).

En este trabajo se obtendrá información de espectros en disolución de una y dos dimensiones.

Por una parte se utilizará la diferencia en desplazamiento químico que resulte de un cambio en el pH para la asignación de los pKas a los centros ionizables correspondientes. El desplazamiento químico es sensible a la variación en el entorno electrónico, que origina campos magnéticos locales que alteran ligeramente la frecuencia de resonancia del núcleo observado. Al incrementarse la protección electrónica o apantallamiento, la frecuencia de resonancia disminuye, es decir que la señal se observa a un menor desplazamiento químico.

Lamentablemente no es posible observar el efecto provocado por la coordinación del ligante a los cationes en el desplazamiento químico de ^1H a lo largo de un intervalo suficientemente amplio de pH, debido a la precipitación de los hidróxidos de Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . Por otra parte, desde el punto de vista de la cinética, el intercambio de estos cationes y de Ca^{2+} entre los complejos formados y su estado libre es muy rápido, son muy lábiles. Tomando como base al intercambio de moléculas de agua se encuentra que estos cationes presentan intercambios en su esfera de coordinación con una velocidad de alrededor de 10^8s^{-1} ⁽³⁹⁾, mientras que la escala de tiempo en que la RMN logra detectar el

intercambio llega a 10^{-7} s.⁶¹ Por este motivo tampoco se logra obtener información valiosa de los espectros de los núcleos ^{207}Pb o ^{111}Cd en disolución. Y es que debido a un intercambio químico tan rápido, se presenta únicamente una señal en la posición promedio de acuerdo con la proporción de cada una de las especies involucradas. Cuando las constantes de formación no provocan que exista una considerable mayoría del ligante y del catión formando parte del complejo no es notable el efecto de la coordinación

Un efecto de la formación de los complejos, especialmente de la formación de anillos quelato, es el provocar la diferenciación de núcleos ^1H , de tal forma que la multiplicidad de protones aledaños a éstos cambiarán su patrón de acoplamiento.⁶² Por ejemplo un protón α verá de forma similar a los dos ^1H s β generando un patrón de triplete y, al diferenciarse estos protones, se tornará en un doble de dobles.

En general, cada núcleo se acoplará con cada uno de los otros núcleos magnéticamente activos cercanos y que no sean magnéticamente equivalentes a él, originando un patrón de $(2nI+1)$ líneas, en que n es el número de núcleos con número cuántico magnético I con el que se acopla, como se muestra en la Figura 1.11.



Figura 1.11. Multiplicidad por acoplamiento entre núcleos con $I = \frac{1}{2}$; $n=1,2,3,4$.

1.5.1. Mecanismos y tiempos de relajación

En todas las espectroscopias existe algún proceso por el cual los estados perturbados en energía logran volver a su estado de equilibrio. Si esto no sucediera, los dos diferentes estados energéticos acabarían estando igualmente poblados, lo cual resultaría en la pérdida de la señal. En la RMN existen dos mecanismos principales por los que se logra

retener el estado basal, denominados relajación de espín-red y de espín-espín. Los tiempos de relajación relacionados con estos procesos en los estudios en fase líquida suelen ser cortos.

Los procesos de **relajación espín-red**, caracterizados por un tiempo T_1 , son aquellos en los que la energía que causó que se modificara el estado de espín se dispersa a los alrededores, por ejemplo por la colisión con otras moléculas en disolución. Si la disolución es muy viscosa, entonces el movimiento Browniano natural se reduce y así también la rapidez en la que ocurre el proceso de relajación espín-red.

Para una colección de núcleos de espín $\frac{1}{2}$ -como lo son todos los detectados en este trabajo-, asumiendo que el proceso de relajación sigue un comportamiento exponencial⁶³ (lo cual es comúnmente el caso), la diferencia entre el número de espines con $m=+\frac{1}{2}$ y $m=-\frac{1}{2}$ (directamente relacionada con la intensidad de la señal) crece de acuerdo con:

$$\Delta n(t) = \Delta n_{eq} [1 - \exp(-t/T_1)]$$

donde Δn_{eq} es la diferencia de poblaciones al equilibrio y t es el tiempo de espera entre pulsos, siendo T_1 el tiempo que tarda en darse la disipación de la energía de la excitación de los núcleos hacia su entorno, por lo tanto, un mayor tiempo de relajación implica una menor libertad de movimiento en las moléculas.

El segundo proceso de **relajación** es el **espín-espín**, que se lleva a cabo en un tiempo T_2 , y en el que la energía es transferida a otros sistemas de espín en la molécula, principalmente a través de enlaces. Algunos núcleos se relajan más lentamente que otros. Por ejemplo en el caso de núcleos de ^{13}C sin núcleos activos unidos, la relajación es más lenta que en un C terciario que a su vez es más lenta que en un secundario y la de éste, más lenta que en un primario. Por esta razón las integrales de las señales de ^{13}C no son necesariamente proporcionales a la cantidad de núcleos con ese desplazamiento químico

También se puede originar la relajación por la presencia de especies paramagnéticas o núcleos cuadrupolares. Cuanto mayor es la cantidad de espines con las cuales el núcleo puede interactuar y es mayor el tiempo en el que se preserva la interacción, menor es el tiempo de relajación T_2 .

La amplitud de las señales aumenta considerablemente como efecto de la disminución del T_2 , lo cual se denomina ensanchamiento por incertidumbre, es decir, cuanto menor es el tiempo de vida media de un estado, la precisión en su energía es baja, y así las transiciones entre estos estados dispersos de energía (Figura 1.12b) se dan en un intervalo más amplio.

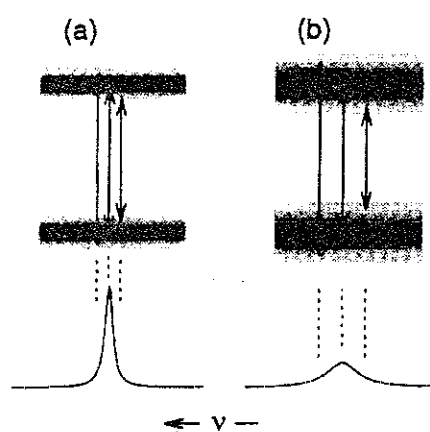


Figura 1.12. Efecto de la relajación espín-espín (T_2) en la amplitud de las señales

Ambos mecanismos de relajación están influidos por la movilidad del núcleo a nivel local como grupo tanto como por el movimiento de toda la molécula. Esta movilidad se encuentra cuantificada en un término denominado **tiempo de correlación rotacional**, τ_c .

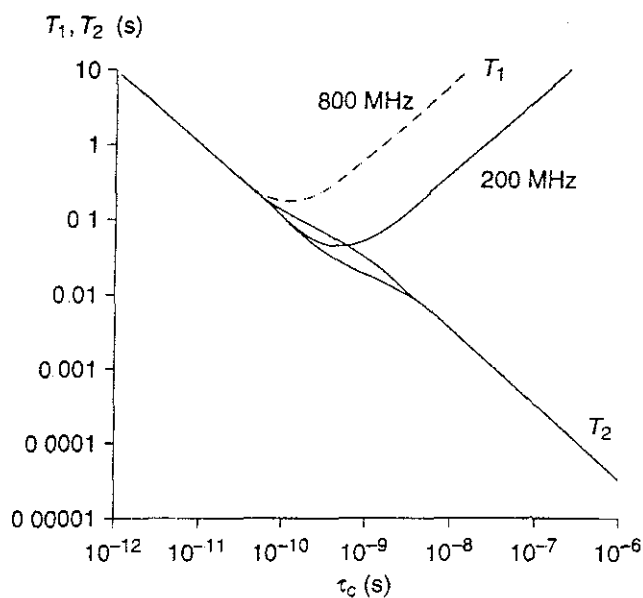


Figura 1.13. Dependencia de los tiempos de relajación respecto al tiempo de correlación molecular.

En circunstancias de gran movilidad (baja viscosidad, alta temperatura y pequeño tamaño de las moléculas), con cortos τ_c , las interacciones responsables de ambos procesos de relajación se dan en intervalos de tiempo muy similares, por lo que los valores de T_1 y T_2 son iguales (Figura 1.13). Al incrementarse el tiempo de correlación, es decir, que la molécula se encuentra más fija, el tiempo T_2 sigue decreciendo monótonicamente, pues la interacción entre espines se mantiene por más tiempo haciendo más eficiente el mecanismo de relajación. En el caso de T_1 , como se comentaba, llega el momento en que mientras más fija se encuentra la molécula le es más difícil disipar la magnetización hacia el entorno, con lo que T_1 se incrementa proporcionalmente con τ_c . El mínimo en T_1 corresponde al valor de tiempo de correlación coincidente con el inverso de la frecuencia de resonancia.

1.5.2. Efecto Nuclear Overhauser

Experimentos que resultan muy útiles para encontrar información relacionada con la conformación de los compuestos en disolución utilizan como herramienta al **efecto nuclear Overhauser (NOE)**. La observación del NOE puede lograrse mediante la saturación de una señal del espectro mientras éste es adquirido (es decir que se igualan sus poblaciones $m = +\frac{1}{2}$ y $m = -\frac{1}{2}$), aplicando un campo de radiofrecuencia con la misma frecuencia de resonancia de esa señal. Esto trae por consecuencia la destrucción de la señal, pero puede también afectar la intensidad de otras señales del espectro si los espines tienen un fuerte acoplamiento dipolar, en cuyo caso, la señal del otro núcleo puede tornarse más intensa, más débil o incluso invertirse.

A continuación se muestran todas las transiciones posibles y permitidas por la teoría con sus probabilidades de transición (W).

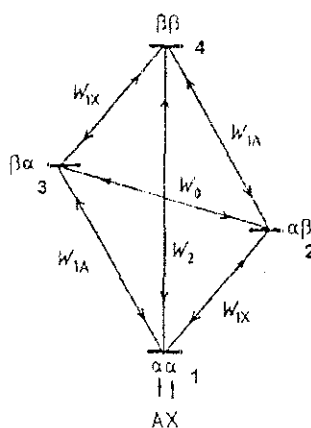


Figura 1.14. Transiciones posibles y permitidas. Probabilidades de transición (W)

Las cuatro probabilidades W_i (Figura 1.14) corresponden a las transiciones cuánticas sencillas que constituyen los procesos de relajación espín-red. Las transiciones entre 4 y 1 y entre 3 y 2 no se observan en los experimentos de observación directa, pues no pueden ser excitadas por radiación electromagnética, por ser espectroscópicamente prohibidas. W_2 y W_0 denotan las probabilidades para la relajación del sistema de espín vía

transiciones *doble cuántica* y *cero cuántica* respectivamente, es decir Δm es 2 ó 0. Sin embargo, ambas son permitidas en un sistema excitado y representan un mecanismo para la relajación del sistema. Debe recordarse que para cualquier tipo de perturbación el sistema tratará de restaurar su equilibrio a través de relajación espín-red, vía un mecanismo de acoplamiento dipolar -a través del espacio, no de enlaces-⁶⁴

En la Figura 1.15 se considera un sistema de 2 espines sin acoplamiento escalar. El grosor de las barras denota la población relativa que ocupa cada nivel de energía

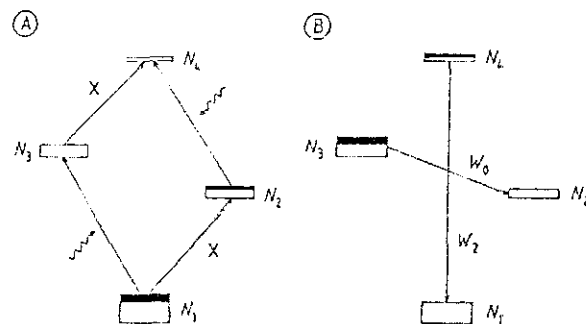


Figura 1.15. Efecto Nuclear Overhauser

El diagrama (A) de la Figura 1 15 muestra la condición inicial en que las poblaciones N_1 a N_4 corresponden al equilibrio. Si se saturan las transiciones permitidas mediante las irradiaciones que se muestran como líneas onduladas, cuyas frecuencias son iguales, la población de los niveles 1 y 3 se toman iguales como también sucede entre los niveles 2 y 4, por lo que $N_1=N_3$ y $N_2=N_4$. En el diagrama (B) se indica de color negro las contribuciones que fueron transferidas de N_1 y N_2 a N_3 y N_4 . Los cambios en las poblaciones no tienen efecto en la intensidad total de la señal X, pues ésta depende solamente de la magnetización total M_X la cual no es afectada por la saturación de las transiciones A. Entonces se establece un nuevo equilibrio con una nueva distribución de poblaciones a través de los procesos de relajación permitidos con las probabilidades W_2 y W_0 . $N_1 < N_1$ y $N_4 > N_4$, por lo que N_1/N_4 es menor que la relación al equilibrio N_1/N_4 . La

relajación W_2 se encarga de incrementar la población de N_1 a partir de N_4 lo que provoca un incremento en la diferencia de poblaciones entre los estados N_1 y N_2 y entre N_3 y N_4 que ahora sí alteran la intensidad de las transiciones X.

El proceso de relajación W_0 , por su parte, se encarga de incrementar N_2 a expensas de N_3 . Esto reduce la diferencia entre las poblaciones involucradas en las transiciones X, y por lo tanto, reduce también la intensidad de la señal.

La combinación de estos dos mecanismos de relajación determina la amplificación que se observe debido al efecto nuclear Overhauser. En moléculas pequeñas predomina W_2 , mientras que en macromoléculas se observa que W_0 tiene el efecto mayoritario.

También se puede observar NOE negativo cuando el núcleo cuya señal resulta amplificada se encuentra acoplado escalarmente –a través de enlaces- con un tercero. La señal del tercero disminuye⁶⁴.

Los experimentos que hacen uso del NOE se pueden utilizar para estimar la distancia internuclear debido a la relación con el inverso de la sexta potencia de la distancia (y corresponde a las constantes giromagnéticas y τ_c al tiempo de correlación que es función de la reorientación molecular):

$$W_2 - W_0 = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{1}{2} \hbar^2 \gamma_i^2 \gamma_j^2 \tau_c r^{-6}$$

En una dimensión se puede desarrollar el experimento denominado NOE diferencial en el que al sustraer el espectro original del espectro con las señales irradiadas, éstas quedan con signo negativo, las señales de núcleos que no presentan interacción se anulan y las que corresponden a núcleos que presentan efecto NOE con el núcleo irradiado exhiben por lo general una intensidad positiva

En dos dimensiones se puede desarrollar el experimento denominado **NOESY**⁶³ (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Para comprender este experimento se puede considerar a un par de protones, I y S, suficientemente cercanos como para presentar una interacción dipolar apreciable, pero sin acoplamiento escalar. Las dos frecuencias de precesión (respecto al sistema rotatorio de coordenadas) son Ω_I y Ω_S . Se ilustran los pasos mediante los incisos en la Figura 1.16.

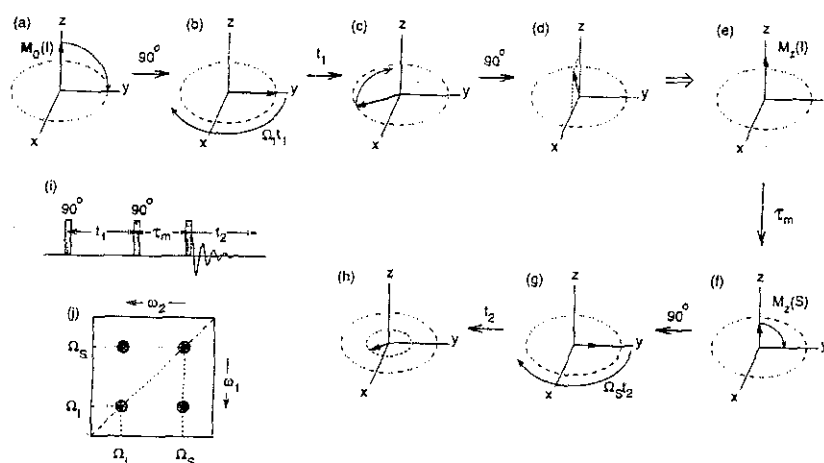


Figura 1.16. Esquema de pulsos y efectos del experimento NOESY

El vector de magnetización en estado de equilibrio correspondiente al espín I (a), originalmente en z, se rota para quedar sobre el eje y mediante el pulso de 90° (b), y precesa a su frecuencia natural Ω_I por un tiempo t_1 (c). Un segundo pulso de 90° rota a la componente en y de esta magnetización para quedar sobre el eje z (d, e). Durante el tiempo de espera τ_m (denominado tiempo de mezclado), los espines I y S sufren una relajación cruzada, es decir, algo de la magnetización en z del espín I se transfiere a S vía el efecto NOE (f). Finalmente la magnetización en z del espín S se rota hacia el eje y por un tercer pulso de 90° (g) desde donde precesa a la frecuencia Ω_S (h) durante un tiempo t_2 , en que la inducción del núcleo S decae libremente (FID de S), pero su amplitud, es modulada por la frecuencia Ω_I .

La doble transformada de Fourier produce, entonces, un espectro bidimensional con un pico fuera de la diagonal, en las coordenadas (Ω_I, Ω_S) , cuya intensidad depende de la eficiencia con la que la relajación cruzada transfiere magnetización en z entre los dos espines durante τ_m . Dado que el espín I siempre mantiene algo de su magnetización en z tras pasar el tiempo τ_m , y ésta se convierte en magnetización en y por el último pulso precesando a la frecuencia Ω_I durante el tiempo t_2 , también se encuentra un pico en la diagonal del espectro con coordenadas (Ω_I, Ω_I) . Por simetría, la excitación de S origina un pico en el cruce (Ω_S, Ω_I) , y un pico en la diagonal correspondiente a (Ω_S, Ω_S) .

Se han desarrollado programas que permiten optimizar una estructura molecular que puede generar las interacciones observadas en el espectro mediante la conjunción de un simulador de espectros NOESY y datos generados por cálculos de dinámica molecular.⁶⁵

Mediante la dinámica molecular se pueden encontrar diversas estructuras o conformaciones de mínima energía en la superficie de potencial a través de las “trayectorias” que presentarían los átomos en sus vibraciones y rotaciones de acuerdo a un campo de fuerzas, ya sea de mecánica molecular o de métodos semiempíricos, con el paso del tiempo, en unidades de femtosegundos. De estas estructuras, se seleccionan las de menor energía.

Los programas de dinámica molecular basados en espectros de RMN pueden refinar una estructura capaz de generar las interacciones observadas en el espectro experimental comparando una simulación del espectro NOESY con los datos experimentales y minimizando las estructuras en base a ángulos de torsión (Dyana⁶⁶).

Mientras la estructura que se estudia conste de pocos átomos y/o de pocos grados de libertad debido a la formación de anillos, enlaces dobles o triples, la asignación directa de la estructura no presenta demasiadas dificultades, pero conforme aumenta el tamaño de la

molécula, las señales de los diversos núcleos se encuentran muy cercanas entre sí, la asignación resulta más complicada. En estos casos el uso de estos programas se hace muy importante para la elucidación de las conformaciones presentes en disolución. Por ello, esta estrategia de elucidación de estructuras se aplica principalmente en proteínas y ácidos nucleicos de tamaño considerable. Se ha probado su eficacia en la generación de distancias en estructuras de proteínas previamente conocidas por cristalografía

Para las moléculas más grandes, la asignación de las señales observadas al núcleo correspondiente representa en sí una complicación, pues varios poseerán desplazamientos químicos similares y el espectro de una dimensión, a pesar de desarrollarse en equipos de alta potencia (600MHz) no resultan de mucha resolución. En este trabajo recurrimos a experimentos denominados TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), en el cual se observa la correlación de ^1H pertenecientes a un sistema de espines aislado de otro mediante carbonos cuaternarios. Así los aminoácidos de un péptido muestran correlaciones intraresiduo (Figura 1.17).

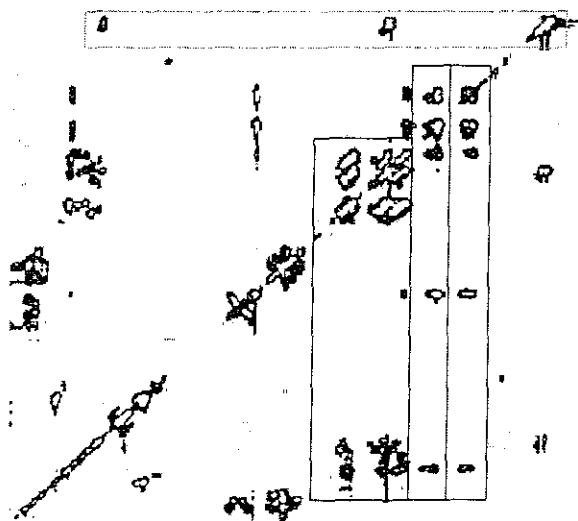


Figura 1.17. Ejemplo de espectro TOCSY. Se enmarcan los grupos de señales correspondientes a Valina, Lisina y Glutámico

Se revisan, entonces, de manera iterativa las asignaciones y valores de integrales en los espectros para obtener una conformación coherente con los experimentos (ver anexo 3).

Estudios en estado sólido

1.6. Difracción de Rayos X de monocristal

Mucho del conocimiento detallado que poseemos actualmente del arreglo de los átomos en las sustancias químicas ha sido obtenida de estudiar cristales con rayos X.⁶⁷ Los primeros estudios de rayos X revelaron estructuras de muchos elementos y compuestos simples, y establecieron principios básicos importantes como la distinción entre cristales moleculares y no moleculares. Fueron mostrando que había grandes diferencias en las fuerzas de enlace químico que mantienen juntos a los átomos en diferentes tipos de sustancias. Con el progreso en el desarrollo de técnicas de análisis estructural a partir de rayos X se ha hecho posible determinar estructuras de sustancias más y más complejas, culminando con la determinación de estructura de proteínas, constituidas por miles de átomos. Junto con este avance, se tiene también el aumento en la precisión para determinar las distancias exactas y también las relaciones angulares entre los átomos en las moléculas.

Los valores que pueden resultar de utilidad para este trabajo, son los radios iónicos, covalentes y de Van der Waals, relacionados con el tipo de interacción que resulta haber en los compuestos que se presentarán, que se muestran en la Tabla 1.7.

Conviene mencionar los criterios para identificar a los puentes de hidrógeno. Denominando al átomo donador de hidrógeno como D y al aceptor como A, se considerará que existe un puente de hidrógeno si la distancia H. A es menor a la correspondiente a la suma de radios covalentes más 2 Å, lo cual resulta más o menos

equivalente a la suma de radios de Van der Waals. En cuanto al ángulo D-H...A, el intervalo que lo hace más efectivo va de 175° a 120°, aunque se considera que existe a partir de ángulos mayores de 110°. Si el ángulo es de 90°, la interacción es cero.

Tabla 1.7. Valores de radios en Å³⁹

Elemento	Radio iónico (N.C.)	Radio Covalente	Radio de VdW
O	(en OH) ^a 1.18(2); 1.2(3)	0.73	1.50
N	(en N ³⁻) ^b 1.32 (4); (en N ⁵⁺) ^c 0.044(3)	0.75	1.55
Pb (II)	1.33 (6); 1.37 (7); 1.43 (8)		2.00
Ca	1.14 (6); 1.20 (7); 1.26 (8)		
Zn	0.88 (6); 1.04(8)	1.20	1.40
Cd	1.09 (6); 1.17 (7); 1.24 (8)		1.60
H		0.37	1.45

^aConsiderando oxígeno monoaniónico que puede coordinarse a un centro metálico (N C =2) o a 2 (N C =3);

^bpara el grupo amino; ^cpara el nitrato

Resulta de suma utilidad reunir información de otros métodos de análisis acerca de compuestos caracterizados por rayos X, comprendiendo así fenómenos observables con las espectroscopias y viceversa, de tal manera que es posible caracterizar con mayor precisión compuestos de los cuales no se cuenta con estructura cristalina

1.7. IR mediano y lejano

La espectroscopia vibracional⁶⁰ se basa en el efecto de la radiación -principalmente en el intervalo de la luz infrarroja-, en la vibración de enlaces y ángulos presentes en las moléculas. Por su parte, las vibraciones dependen de la fuerza del enlace y de la masa de los elementos involucrados, al igual que dos cuerpos unidos por un resorte, como un oscilador armónico

En la mayoría de los casos, un mismo ligante o los mismos grupos funcionales presentarán frecuencias de vibración muy similares en una amplia gama de complejos y

moléculas diferentes. Estas frecuencias características proveen una forma directa de obtener información estructural a través de estudios vibracionales

Así, la caracterización primaria de los compuestos sintetizados se puede desarrollar recurriendo a la espectroscopia infrarroja en el intervalo del mediano ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), comparando el espectro del producto con el de los reactivos o posibles subproductos. En la región del mediano se pueden observar las bandas características de los contraiones utilizados, además de las bandas correspondientes a aminoácidos y péptidos,⁶⁸ es decir, a carbonilos y carboxilos y las correspondientes a las aminas y amidas. Las más intensas se presentan en la Tabla 1.8.

Cuando la coordinación del metal al aminoácido se hace a través del grupo amino desprotonado, las bandas del NH_3^+ desaparecen dando lugar a tres o cuatro bandas características de una amina primaria NH_2 ($3400-3100\text{ cm}^{-1}$)

Tabla 1.8. Señales características en el espectro de IR mediano de los grupos presentes en este trabajo

Grupo	Bandas
COO^-	Banda intensa en $1600-1580\text{ cm}^{-1}$
$\text{CO}_{(\text{amida})}$	Entre 1695 y 1615 cm^{-1} se considera una de las bandas más anchas entre las correspondientes a grupo carbonilo
NH_3^+	Banda muy ancha entre $3400-2400\text{ cm}^{-1}$ A ambos lados de la banda intensa del COO^- , el NH_3^+ tiene dos bandas. La izquierda ($1640-1600\text{ cm}^{-1}$) aparece como un hombro sobre la banda del carboxilato mientras que la ubicada a la derecha ($1550-1510\text{ cm}^{-1}$) es delgada y bien definida. Ambas son de intensidad media a fuerte.
$-\text{NH}_2$	Tres o cuatro bandas intensas en el intervalo $3400 - 3100\text{ cm}^{-1}$
$\text{NH}_{(\text{amida})}$	Dos bandas en el intervalo $3500 - 3100\text{ cm}^{-1}$
NO_3^-	Muy intensa $1380 - 1320\text{ cm}^{-1}$
ClO_4^-	Muy intensa $1100 - 1025\text{ cm}^{-1}$
CO_3^{2-}	Muy intensa $1450 - 1410\text{ cm}^{-1}$

Cuando el metal está coordinado a través de uno o ambos oxígenos del carboxilato su banda sufre desplazamientos y variaciones en su intensidad, que difieren en cada caso. Para todos los experimentos se asume que el carboxilo está desprotonado y que al menos

un oxígeno participa en la coordinación, pero no se puede predecir si es monodentado, bidentado o incluso si está puenteando dos metales o si su interacción es eminentemente iónica

Por otra parte, dada la dependencia de la frecuencia de vibración con las masas de los elementos enlazados, se puede aprovechar el efecto del cambio isotópico para la asignación de señales observando cuáles se desplazan y en qué magnitud. Esto será observable tanto en el enlace que directamente esté formando este isótopo intercambiable, como por ejemplo $-\text{NH}_2$ que pasa a ser $-\text{ND}_2$, como cuando el átomo al que está enlazado se encuentra involucrado en otro enlace, como por ejemplo $-\text{NH}_2\text{-M}$ que cambia a $-\text{ND}_2\text{-M}$. Este último efecto es observable en el espectro IR lejano, y se utilizarán las siguientes ecuaciones para el estudio de dicho intercambio

$$\frac{\mu_{M-\text{NH}_2} = \frac{(m_M \times m_{\text{NH}_2})}{(m_M + m_{\text{NH}_2})}}{\mu_{M-\text{ND}_2} = \frac{(m_M \times m_{\text{ND}_2})}{(m_M + m_{\text{ND}_2})}} \left| \begin{array}{l} \omega_{M-\text{ND}_2} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu_{M-\text{ND}_2}}} \\ \omega_{M-\text{NH}_2} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu_{M-\text{NH}_2}}} \end{array} \right. = \frac{\mu_{M-\text{NH}_2}}{\mu_{M-\text{ND}_2}}$$

1.8. RMN CP/MAS de ^{13}C , T_1 de ^1H , ^{111}Cd

1.8.1. ^{13}C

Aunque los estudios de resonancia más comúnmente realizados son en estado líquido o disolución, los sólidos pueden ser estudiados también haciendo una variación a la técnica. Ya que en los sólidos los átomos y moléculas están bloqueados en una cierta configuración, el tiempo de relajación espín-red (T_1) es muy largo, y esto, combinado con el gran número de posibles acoplamientos a sistemas anisotrópicos resulta en picos muy anchos. Sin embargo, el término que origina este ensanchamiento tiene una dependencia

angular, y haciendo girar la muestra muy rápidamente a un ángulo de 54.7° respecto al campo magnético -y eje del portamuestras- (el denominado **ángulo mágico**), esta contribución se elimina, resultando en un espectro con líneas estrechas

Se estudiará el desplazamiento químico de las señales de ^{13}C en los espectros de estado sólido, que responde al mismo comportamiento que el desplazamiento químico en disolución, como fue explicado con anterioridad

Además, ya que el espectro de CP/MAS se adquiere aprovechando la transferencia de polarización de los núcleos de ^1H (Figura 1.18), se podrá desarrollar un experimento para medir el T_1 promedio de los ^1H en la molécula del ligante con espectros de ^{13}C , y que, como se vio en la sección 1.5.1, en circunstancias de extremadamente baja movilidad como es el estado sólido, tiene un comportamiento proporcional al tiempo de correlación. Así, T_1 dependerá de la movilidad de la molécula, y podemos relacionar los valores obtenidos para las diferentes moléculas con su rigidez,⁶⁹ a su vez afectada por la quelatación en los ligantes al coordinarse al catión, y con la cristalinidad de la muestra

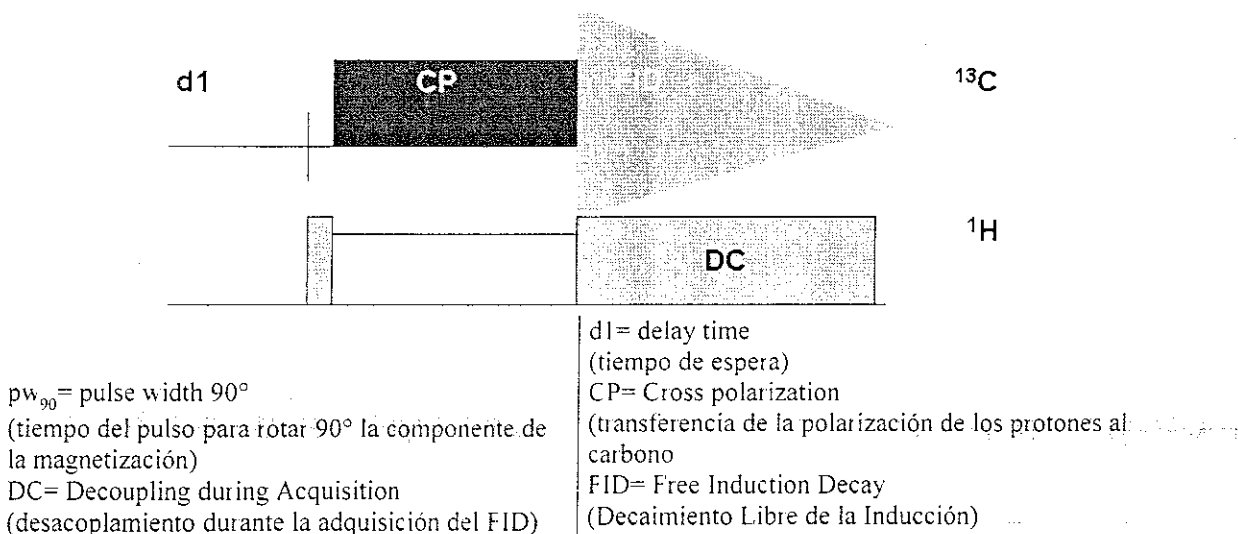


Figura 1.18. Esquema de pulsos y adquisición de espectros CP-MAS (estado sólido)

1.8.2. ^{111}Cd

Para los espectros que se han de realizar con ^{111}Cd será útil tener en cuenta que su desplazamiento químico teniendo como referencia al perclorato de cadmio puede dar un indicio sobre el entorno de coordinación:^{70 71}

- existe una contribución positiva, es decir disminuye el apantallamiento, al haber coordinación por nitrógeno
- existe una contribución negativa, es decir se incrementa el apantallamiento, cuando está unido a oxígeno,
- de haber formación de anillos quelato, el núcleo se desprotege, es decir, presenta una contribución positiva al desplazamiento químico.

También el patrón de acoplamiento resulta elocuente pues el nitrógeno ^{14}N presenta un acoplamiento cuadrupolar, desdoblado de manera asimétrica la señal⁷²

Habiendo introducido las características de los cationes en su química y bioquímica, y las técnicas a emplearse en este trabajo, pasamos a la sección experimental para posteriormente discutir los resultados para cada tipo de ligantes

Sección Experimental

2.1. Estudio en disolución

2.1.1. Determinaciones Potenciométricas

Todas las calibraciones del pH se realizaron con disoluciones acuosas de HCl estandarizado para medir directamente concentraciones de ion hidrógeno ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$). Se impuso fuerza iónica a 0.1 M con KNO_3 . Las titulaciones del ligante ya sea en ausencia o presencia de iones metálicos en disolución acuosa fueron llevadas a cabo de acuerdo a lo descrito en el anexo 1. Para las constantes de formación de complejos, se trabajó en condiciones 1:1 M:L, para investigar la formación de complejos mononucleares. El intervalo de pH considerado para obtener medidas precisas es de 2-11 en los casos de las disoluciones de ligante libre y de ligante con calcio; para los otros cationes, el límite superior de pH se estableció según la observación de precipitación de los hidróxidos. El valor de pK_w para el sistema acuoso, definido como $-\log([\text{H}^+][\text{OH}^-])$ se considera 13.78 dadas la fuerza iónica y la temperatura de trabajo, como indican Jameson y Wilson ¹

Se utiliza un equipo Metrohm 702 Titrino que incluye pHmetro digital acoplado a una PC, con un electrodo combinado Metrohm de Ag/AgCl. Cada disolución problema se analizó en una celda de vidrio de 75 mL termostatada a 25.00 (± 0.05) °C por la circulación de agua proveniente de un baño de temperatura constante.

A partir de los datos obtenidos se calcularon las constantes de protonación de acuerdo con el procedimiento descrito en el anexo 2 a través del programa Hyperquad 2000NT®.

El error en las constantes que se generan en el presente trabajo se estima como ± 0.04 unidades logarítmicas con base en el valor de σ_{fit} que mide la desviación entre la curva experimental y la curva calculada a partir de las constantes de equilibrio. Esta desviación es menor de 0.01 unidad del pH en todas las determinaciones potenciométricas.

La precisión de las mediciones es como sigue: El electrodo posee una precisión de 0.003 unidades de pH; el dosificador, de 0.0005ml; el volumen inicial, de 0.03ml.

La concentración de los analitos para las titulaciones debe ser conocida con exactitud y mayor que 1mM. Se trabajó en concentración 5mM para los aminoácidos y el dipéptido. Para los tripéptidos y el dodecapéptido se usaron concentraciones 2mM.

Para la determinación de constantes de formación se agrega el volumen necesario para tener condiciones equimolares con el ligante de la disolución de un estándar equivalente a 1g del metal en 100ml (preparado a partir de una ampolleta de Titrisol®-Merck- para absorción atómica)

La concentración de las disoluciones patrón de los cationes en uso para este trabajo quedan como sigue:

Ca ²⁺	0.2495M (+HCl 1M) [^]	Pb ²⁺	0.0483M	Zn ²⁺	0.1529M	Cd ²⁺	0.0890M
------------------	--------------------------------	------------------	---------	------------------	---------	------------------	---------

Las disoluciones para la determinación de constantes de equilibrio deben tener un valor de pH extremo, 2 ó 12, lo que se logra mediante la adición de un volumen conocido de HCl, HNO₃ o NaOH normalizados respectivamente. Se llevan a aforo con disolución de KNO₃ 0.1M.

[^] La ampolleta contiene HCl para imponer un pH ácido y así evitar la formación de carbonato de calcio.

Los valores de ajuste estadístico obtenidos en la determinación de las constantes a partir de los datos de valoración potenciométrica se presentan a continuación en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Valores estadísticos del ajuste de las constantes acumulativas de formación determinadas

Ligante	Asp		Glu		GlyGlu		DGE		DGEa		Dodeca	
Catión	χ^2	σ	χ^2	σ	χ^2	σ	χ^2	σ	χ^2	σ	χ^2	σ
H ⁺ (pKa)					37.45	0.88	10.33	0.62	9.78	0.73	43.62	0.62
Ca ²⁺	6.84	2.02			10.64	0.89	2.81	1.89	3.80	1.46	105.1	1.72
Pb ²⁺	11.71	0.13			12.56	0.23	14.49	0.18	4.83	0.56	9.38	0.16
Zn ²⁺			14.22	1.00	36.91	1.16	13.56	0.65	3.36	0.73	10.44	0.31
Cd ²⁺	6.81	1.22	15.34	2.73	12.61	0.24	19.57	1.07	13.88	1.33	13.20	0.40

Probablemente el elevado valor de χ^2 para el ligante Dodeca libre y con calcio se deba a la movilidad del ligante que hace que la cinética de los equilibrios ácido base se haga más lenta, de cualquier manera se consiguen valores de constantes que permiten que la curva de titulación se adecue como se muestra a continuación en la Figura 2.1, donde los rombos azules representan a los valores experimentales y la línea roja a la curva calculada con las constantes dadas. Las curvas negras representan a las especies que contienen calcio.

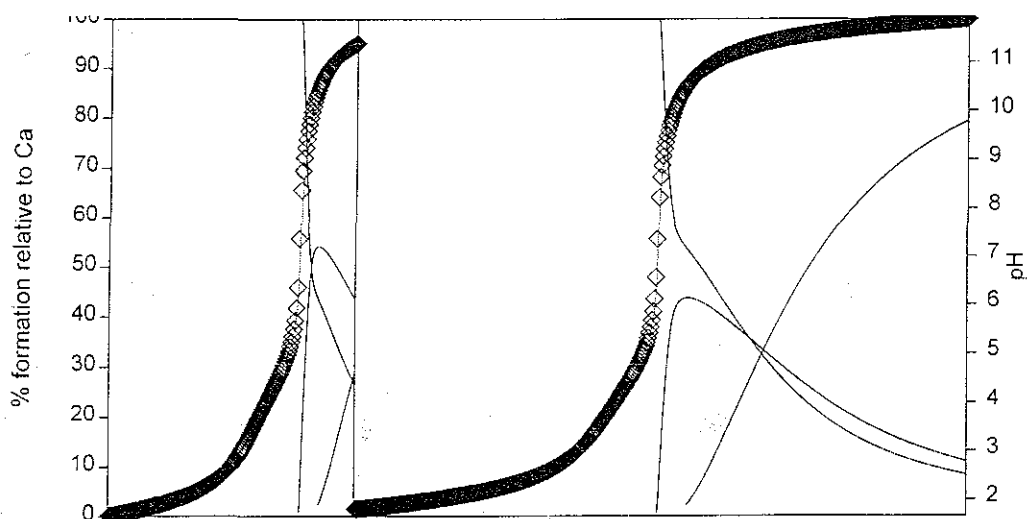


Figura 2.1. Puntos experimentales (◇), curva teórica de valoración (—) y especies (—) de Ca+Dodeca

Se generaron diagramas de distribución de especies a partir de las constantes de equilibrio medidas y se trazaron a través del programa MEDUSA² -Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms-

2.1.2. RMN: ¹H, NOE; 2D: NOESY; pH variable

La resonancia magnética nuclear en disolución fue realizada principalmente en equipos Varian UNITY-plus a 299 950 MHz con un probe VT-Switchable de banda ancha. Se utilizaron pulsos de 45° (7.5 μs) con un tiempo de adquisición de 2.503 s. Se procesaron los espectros usando apodización por ensanchamiento de banda de 1 Hz. Los experimentos típicos fueron hechos con la colección de 32 transientes. Como disolvente se utilizó D₂O y se fijó el pD con DCl o NaOD. Se midió el pH en el tubo con un electrodo RMN Orion.

Para analizar al dodecapéptido, fue necesario elaborar los espectros en un espectrómetro con mayor campo magnético. Se utilizó entonces un equipo Varian de 600 MHz, cortesía del grupo de trabajo del Profesor Thomas James en UCSF.

Se preparan las disoluciones de acuerdo a la solubilidad de los analitos y el análisis de predominio de especies se hace considerando fuerza iónica → 0.

Las sales de los cationes que se utilizaron tanto para los estudios en disolución como para la síntesis son comerciales, marca ALDRICH. Todos los ligantes son, también, de origen comercial. Los aminoácidos y el dipéptido Glyglu comprados a SIGMA. Los oligopéptidos fueron sintetizados por compañías especializadas en síntesis de péptidos. Todos se entregan en estado catiónico teniendo como contraión al trifluoroacetato. El tripéptido DGE-TFA y el Dodecapéptido TFA se compraron a Commonwealth Biotechnologies, Inc. El tripéptido DGEa-TFA a American Peptide Co. Se utilizaron sin someterlos a purificación posterior.

2.2. Síntesis

2.2.1. Derivados de aminoácidos

2.2.1.1. Síntesis de $\text{Ca}(\text{aspH})_2$

Se sintetizó de acuerdo con la técnica mencionada por Schmidtbaur.³ A 5mmol de ácido aspártico en 25 ml de agua se le añadieron 10 ml de agua mientras se agregaba CaCO_3 que pasó de ser un sistema heterogéneo a ser una mezcla homogénea con un $\text{pH}=7$. Se extrajo lentamente el disolvente por vacío, quedando un polvo blanco. Análisis calculado para $\text{Ca}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{N})_2$: C, 31.58; H, 3.98; N, 9.21. Experimental: C, 32.18, H, 4.2, N, 8.81%

2.2.1.2. Síntesis de $\text{Pb}(\text{aspH})(\text{NO}_3)$

3.31 g (10 mmol) de nitrato de plomo se disolvieron en 50 ml agua y se combinaron con 1.55 g (10 mmol) de aspartato monosódico hidratado también en 50 ml de agua. Se ajustó el pH a 4.0 con una disolución de NaOH 0.1 M y la solución se dejó cristalizar.

Se recolectaron agujas incoloras al día siguiente. Análisis calculado para $\text{Pb}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{N})(\text{NO}_3)$: C, 11.97; H, 1.49; N, 6.98. Experimental: C, 12.11, H, 1.55, N, 6.84%.

2.2.1.3. Síntesis de $\text{Pb}(\text{asp})$

1.33 g (10 mmol) de ácido aspártico se disolvió en 300 ml agua. A esta solución se agregaron 2.23 g de polvo de PbO (litargirio). El vaso de la reacción se puso en un baño de ultrasonido por 15 min. durante los cuales el polvo amarillo se disolvió, dando lugar a un precipitado blanco. Análisis calculado para $\text{Pb}(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4\text{N})$: C, 14.20, H, 1.47, N, 4.14. Experimental: C, 14.10; H, 1.42, N, 3.98%

2.2.1.4. Síntesis de $Cd(aspH)(NO_3)$

A 5 mmol de $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ disueltos en 25 ml de agua, se le agregan 5 mmol de NaAspH previamente disueltos en 25 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 4.3 con NaOH 1M. La disolución se deja cristalizar obteniéndose después de algunas semanas unos cristales prismáticos incoloros. Análisis calculado para $Cd(C_4H_6N_2O_7)$: C, 15.68, H, 1.96, N, 9.15. Experimental: C, 15.63; H, 2.08; N, 8.89%.

2.2.1.5. Síntesis de $Cd(asp)$

Se disolvieron 5 mmol de $AspH_2$ en 150 ml de agua tibia se le agregaron poco a poco 2.5 mmol de CdO finamente molido, permitiendo que el óxido sólido se disolviera después de cada adición. La disolución se evaporó al vacío dando por resultado un material vidrioso que resultó según el análisis elemental ser $Cd(Asp) \cdot 1.5H_2O$. Análisis calculado para $CdC_4H_6O_5 \cdot 1.5N$: C, 17.76, H, 2.96, N, 5.18. Experimental: C, 17.32; H, 2.81; N, 5.02%.

2.2.1.6. Síntesis de $Zn(aspH)(NO_3)$

A 5 mmol de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ disueltos en 25 ml de agua, se le agregan 5 mmol de NaAspH previamente disueltos en 25 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 6.4 con NaOH 1M. Con el tiempo precipita un polvo blanco, se filtra y lava con metanol frío. Análisis calculado para $Zn(C_4H_6N_2O_7) \cdot H_2O \cdot MeOH$: C, 19.40, H, 3.91, N, 9.05. Experimental: C, 19.60; H, 3.20; N, 8.42%. Esta composición refleja la adsorción del metanol de lavado.

2.2.1.7. Síntesis de $Ca(gluH)_2$

Mediante una síntesis análoga a la correspondiente al derivado de aspártico, a 10mmol de ácido glutámico en 100ml de agua se le agrega lentamente 5mmol de $CaCO_3$ en polvo dando lugar a una mezcla homogénea de pH=7. Se extrae el disolvente con vacío y se acaba

por obtener un polvo blanco. Análisis calculado para $\text{Ca}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4\text{N})$: C, 36.14; H, 4.85; N, 8.43. Experimental: C, 35.96; H, 5.49; N, 8.32%.

2.2.18. Síntesis de $\text{Pb}(\text{glu})$

10 mmol de ácido glutámico se disolvieron en 300 ml agua. A esta disolución se agregaron 2.23 g de polvo de PbO (litargirio). La reacción se puso en un baño de ultrasonido por 15 min durante los cuales el polvo amarillo se disolvió, dando lugar a un precipitado blanco. Análisis calculado para $[\text{Pb}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4\text{N})] \cdot \frac{1}{5}\text{PbO}$: C, 15.09, H, 2.03, N, 3.52. Experimental: C, 15.17; H, 1.67, N, 3.44%.

2.2.19. Síntesis de $\text{Cd}(\text{glu})$

A 5 mmol de CdCO_3 disueltos en 25 ml de agua por efecto de ácido perclórico, se le agregan 5 mmol de NaGluH previamente disueltos en 25 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 6 con NaOH 1M. Precipita un polvo blanco. Análisis calculado para $\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 20.39, H, 4.11, N, 4.76. Experimental: C, 22.45; H, 4.00; N, 4.46%. Aparentemente prevalece una cantidad de carbonato.

2.2.10. Síntesis de $\text{Zn}(\text{glu}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A 5 mmol de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 25 ml de agua, se le agregan 5 mmol de NaGluH previamente disueltos en 25 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 4.6 con NaOH 1M. Con el tiempo cristaliza a manera de agujas hiperfinas no apropiadas para difracción. Análisis calculado para $\text{Zn}(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 24.26, H, 4.89, N, 5.66. Experimental: C, 24.58; H, 4.67; N, 5.69%.

2.2.2. Derivados de Glyglu

2.2.2.1. Síntesis de $\text{Ca}(\text{GEH})\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Se disolvieron 5mmol de cloruro del calcio en 10ml de agua y se agregaron 5mmol de ácido glicilglutámico. El pH se ajustó a 5 con NaOH 1M. El metanol se agregó en una proporción 5:1 para forzar la precipitación del producto. Se filtra un polvo higroscópico blanco. *Anal. Experimental:* C, 27.48, H, 4.76, N, 8.62%. *Calc para $\text{Ca}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}_2)\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$:* C, 26.71, H, 4.8, N, 8.9%

2.2.2.2. Síntesis de $\text{Pb}(\text{GEH})(\text{ClO}_4)$

Se disolvieron 5 mmol de perclorato de plomo en 50 ml agua y también se combinó con 5 mmol de ácido glicilglutámico en 50 ml de agua. El pH se ajustó a 4.3 con NaOH 0.1 M y la disolución se dejó cristalizar. Las agujas incoloras fueron recolectadas después de una semana. *Anal. Experimental:* C, 16.04, H, 2.3, N, 5.33%. *Calc para $\text{Pb}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}_2)\text{ClO}_4\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$:* C, 16.21, H, 2.33, N, 5.4%

2.2.2.3. Síntesis de $\text{Pb}(\text{GE})$

Se disolvieron 5 mmol de ácido glicilglutámico en 300 ml agua. A esta disolución se le agregó gradualmente 1.115 g de PbO (litargirio). El vaso de la reacción se puso en un baño de ultrasonido por 15 min durante los cuales el polvo amarillo se disolvió dando lugar a un precipitado blanco. *Anal. Experimental:* C, 17.99, H, 2.10, N, 5.79%. *Calc para $[\text{Pb}(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5)]\cdot\frac{1}{4}\text{PbO}$:* C, 18.01, H, 2.17, N, 6.02%

2.2.2.4. Síntesis de $\text{Cd}(\text{GE})$

Se disolvieron 5 mmol de nitrato del cadmio en 50 ml de agua combinándose con 5 mmol de ácido glicilglutámico también disueltos en 50 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 7 con NaOH 0.1 M con lo que se forma un precipitado. El filtrado se somete a 100°C por una

noche. *Anal* Experimental: C, 26.61, H, 3.33, N, 8.68% Calc. para $\text{Cd}(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5\text{N}_2)$: C, 26.73, H, 3.2, N, 8.91%.

2.2.2.5. Síntesis de $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Se disuelven 5 mmol de ácido glicilglutámico en 300 ml de agua. A esta disolución, se le agregan gradualmente 1.665 mmol de CdO pulverizado, que se disuelve al someter periódicamente el sistema de reacción en un baño de ultrasonido por 15 minutos hasta que resulte imposible disolver el óxido color café en la disolución, sino que solamente se torna blanco. El sólido se filtra y la disolución se deja cristalizar durante dos días bajo vacío, tras los cuales se obtienen cristales incoloros irregulares. *Anal* Experimental: C, 28.7, H, 5.04, N, 9.71%. Calc. para $\text{Cd}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C 29.35, H 4.93, N 9.78%

2.2.2.6. Síntesis de $\text{Zn}(\text{GE})$

Se disuelven 5 mmol de nitrato de zinc en 50 ml de agua y se combinan con 5 mmol de ácido glicilglutámico también en 50 ml de agua. Se ajusta el pH a un valor de 7 con NaOH 0.1 M, formándose un precipitado. *Anal*. Experimental: C, 29.56, H, 4.1, N, 9.88%. Calc. para $\text{Zn}(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5\text{N}_2)$: C, 29.44, H, 4.24, N, 9.81%.

2.3. Estudio en estado sólido

2.3.1. Análisis Elemental

Los análisis elementales fueron llevados a cabo por Desert Analytics, Tucson, AZ y en la USAI, Facultad de Química

2.3.2. IR mediano y lejano

Se hicieron espectros de IR en la región de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ usando pastillas de KBr en un espectrofotómetro Nicolet 540. Los espectros de IR lejanos se registraron en un Nicolet 740

FTIR en la región de $700\text{--}70\text{ cm}^{-1}$ usando pastillas de polietileno. Los protones del grupo amino se intercambiaron por deuterio aislando los compuestos de disoluciones en D_2O .

2.3.3 RMN ^{13}C , T_1 de ^1H , ^{111}Cd

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear por polarización cruzada en ángulo mágico (CP/MAS) se desarrollaron en un espectrómetro Varian Unity-plus 300 MHz que opera a 75.429 MHz para ^{13}C y 63.602 MHz para ^{111}Cd , y se usaron pulsos de 30° . Se utilizó un rotor de 7 mm diámetro de nitruro de silicio con tapa kel-F. Para los espectros de ^{13}C , la velocidad de giro del rotor se mantuvo entre 3.5 y 4.5 kHz para todos los experimentos, con un tiempo de espera de 7 s, y se acumularon entre 128 y 516 transientes. Se utilizó Adamantano como referencia externa. Para los espectros de ^{111}Cd , la velocidad de giro de rotor se mantuvo entre 3.5 y 5 kHz en todos los experimentos, con un tiempo de espera entre 5-10s y se acumularon entre 500 y 10000 transientes. Se utilizó 1-2.5ms como tiempo de contacto para la polarización cruzada, con 0.05s de tiempo de adquisición. Se usó CdCO_3 como referencia externa y los valores transformados a la referencia de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$. Se registraron los espectros usando supresión total de banda lateral cuando las bandas laterales no pudieron ser removidas por el giro. Se procesaron los espectros con una apodización (*line broadening*) de 20 a 40 Hz.

2.3.4. Difracción de Rayos X de monocristal

Los datos de difracción de rayos X en monocristal fueron obtenidos a 298 K, en un difractómetro Bruker P4 usando procedimientos comunes.⁴ Las estructuras se resolvieron y refinaron usando los procedimientos estándar,⁵ sin restricciones.

Los átomos de H se ubicaron en mapas diferenciales y fueron refinados usando el modelo de montaje con parámetros térmicos isotrópicos fijos.

Tabla 2.2: Datos cristalográficos para los derivados de aspártico

Fórmula Empírica	C ₄ H ₆ N ₂ O ₇ Pb	C ₄ H ₆ Cd N ₂ O ₇
Peso molecular	401.30	306.51
Sistema cristalino	Ortorrómbico	Ortorrómbico
Color, hábito	Incoloro, agujas regulares	Incoloro, prismas regulares
Tamaño del cristal (mm)	0.74 x 0.16 x 0.06 mm ³	0.28 x 0.22 x 0.14 mm ³
Grupo Espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria		
a (Å °)	4.5894 (5)	7.1577(3)
b (Å °)	11.6164 (9)	7.2892(5)
c (Å °)	15.476 (2)	14.9510(10)
Z	4	4
Coefficiente de absorción	20.467 mm ⁻¹	2.819 mm ⁻¹
Radiación	Mo-K _α (λ = 0.71073 Å)	Mo-K _α (λ = 0.71073 Å)
Intervalo de 2θ (°)	3 - 55 °	5.44 - 59.98 °
Reflexiones colectadas	1472	2675
Reflexiones independientes ^a	1335 (R _{int} = 3.33 %)	2276 (R _{int} = 2.15%)
Factores de Transmisión (min, max)	0.0113, 0.0373	0.257, 0.281
Índices finales de R (I > 2 σ(I)) (%) ^a	R ₁ = 3.83 %, wR ₂ = 9.77 %	R ₁ = 2.61 %, wR ₂ = 6.74 %
Índices finales de R [todos los datos] (%) ^a	R ₁ = 4.27 %, wR ₂ = 10.76 %	R ₁ = 2.81 %, wR ₂ = 6.88 %
Certeza del ajuste, S ^a	1.175	1.042
Relación datos/parámetros	1335 / 128	2276/128

^(a) R_{int}, R₁, wR₂ y S se definen como sigue:

$$R_{int} = \frac{\sum |F_o^2 - \langle F_o^2 \rangle|}{\sum F_o^2}, R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, wR_2 = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w(F_o^2)^2}}, S = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{m - n}}$$

Tabla 2.3. Datos Cristalográficos de los derivados de GlyGlu

Fórmula Empírica	PbC ₇ H ₁₂ ClN ₂ O _{9.5}	CdC ₁₄ H ₂₈ N ₄ O ₁₃
Peso molecular	518.83	572.80
Sistema cristalino	Monoclínico	Trigonal
Color, hábito	Agujas incoloras	Bloques incoloros
Tamaño del cristal (mm)	0.42 x 0.06 x 0.04	0.70 x 0.70 x 0.52
Grupo Espacial	C2	P3 ₂ 21
Dimensiones de la celda unitaria		
a (Å °)	18.865(2)	13.1931(7)
b (Å °)	4.9210(10)	-
c (Å °)	14.197(2)	11.3498(8)
β (°)	103.720(10)	-
Z	4	3

Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	13 438	1 027
Radiación	Mo-K _α (λ = 0.71073 Å)	Mo-K _α (λ = 0.71073 Å)
Intervalo de 2θ (°)	4.44–60.00	3.56–60.00
Reflexiones colectadas	2660	4957
Reflexiones independientes ^a	2460 (R _{int} = 3.46%)	3261 (R _{int} = 2.74%)
Factores de Transmisión (min, max)	0.100, 0.153	0.509, 0.608
Índices finales de R (I > 2 σ(I)) (%) ^a	R ₁ = 3.65, wR ₂ = 8.06	R ₁ = 2.70, wR ₂ = 7.43
Índices finales de R [todos los datos] (%) ^a	R ₁ = 4.86, wR ₂ = 8.59	R ₁ = 2.78, wR ₂ = 7.49
Certeza del ajuste, S ^a	1.030	1.042
Relación datos/parámetros	2460 / 187	3261 / 161

^(a) R_{int}, R₁, wR₂ y S se definen como sigue:

$$R_{int} = \frac{\sum |F_o^2 - \langle F_o^2 \rangle|}{\sum F_o^2}, R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, wR_2 = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w(F_o^2)^2}}, S = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{m - n}}$$

2.3.5. Difracción de Rayos X de polvos

La difracción de rayos X de polvos se realizó en un SIEMENS D5000 que utiliza radiación de Cu de λ=1.5406nm y detector de centelleo.

Interacción con Aminoácidos

-Aspártico y Glutámico-

Ciertamente es muy remota la relación que pueda encontrarse entre el tipo de coordinación que presenten los aminoácidos con los cationes metálicos, y el tipo de coordinación en *oligo* y *polipéptidos*. Sin embargo resultan ser ligantes ilustrativos para evaluar la preferencia de un catión por los átomos donadores a su disposición, ya que los aminoácidos cuentan con la versatilidad de ser donadores por oxígeno de carboxilo y por nitrógeno de amina.

El pH de reacción es un factor muy importante, debido a que marca la disponibilidad de los átomos donadores y del catión en disolución, de ahí que se realicen estudios de equilibrios en disolución.

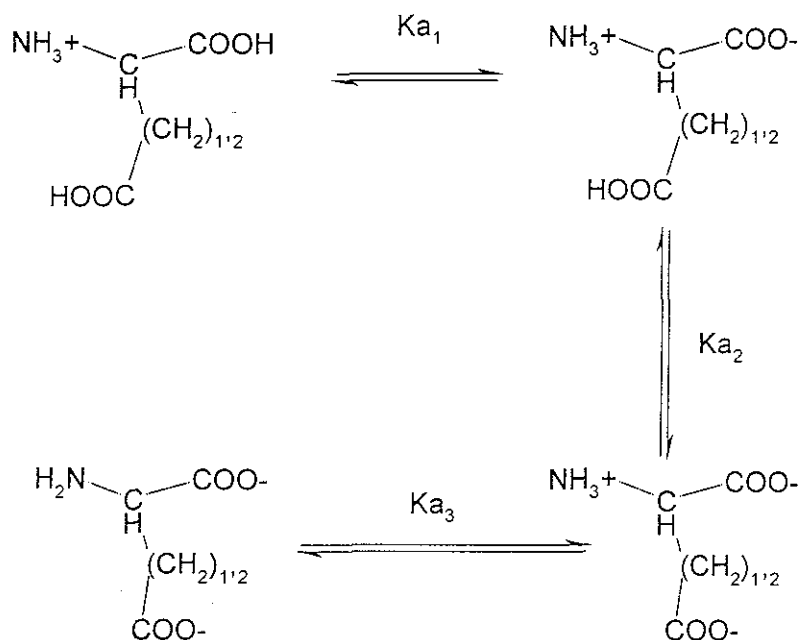
El efecto quelato parece no ser un factor de estabilización muy relevante en todos los casos, especialmente en los valores de pH en los que el grupo amino se encuentra aún protonado y los sitios de coordinación disponibles son únicamente los carboxilos. En el caso de aspártico y glutámico, además de los carboxilos α están los pertenecientes a la cadena lateral, con los que se daría lugar a anillos de 7 y 8 miembros respectivamente. En estado sólido, los cationes en estudio muestran una marcada tendencia a formar polímeros *bi* y *tridimensionales*, donde se llegan a observar grupos carboxilato con interacciones de tipo bidentado, que dan lugar a anillos de 4 miembros.

A continuación se presentan tanto información antecedente como estudios propios de complejos de aminoácidos con los cationes Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} , relevantes para este trabajo.

3.1. Estudios potenciométricos.

En principio se trabajó con los aminoácidos determinando las constantes de acidez y formación de complejos para estandarizar el método por comparación con la información disponible en la literatura.^{1,2} Sin embargo, un gran número de los valores de constantes de formación de los complejos de la literatura fueron obtenidos a partir de métodos polarográficos a un valor de pH impuesto, en condiciones de trabajo diseñadas para la formación de complejos con diferente proporción metal:ligante, pero en los modelos no se incluyó la posibilidad de diferentes grados de protonación en los ligantes y los complejos.^{3,4} Así mismo, algunos valores se obtuvieron en condiciones de fuerza iónica y temperatura diferentes a las empleadas en el trabajo presente.^{5,6,7,8} Dadas estas circunstancias se presentan valores de formación de compuestos de coordinación obtenidas en este trabajo que serán utilizadas con fines de comparación, tanto por haberse obtenido valores que difieren, como para complementar la información, y se toman los valores de la literatura para zinc con aspártico.

Los valores de primero segundo y tercer pKa de los ligantes según lo que se encuentra en la literatura⁹ en las condiciones en que se trabaja son, para aspártico: 1.95(5), 3.71(6), 9.66(6); y para glutámico: 2.16(4), 4.15(8), 9.58(9). Los equilibrios correspondientes se esquematizan a continuación:



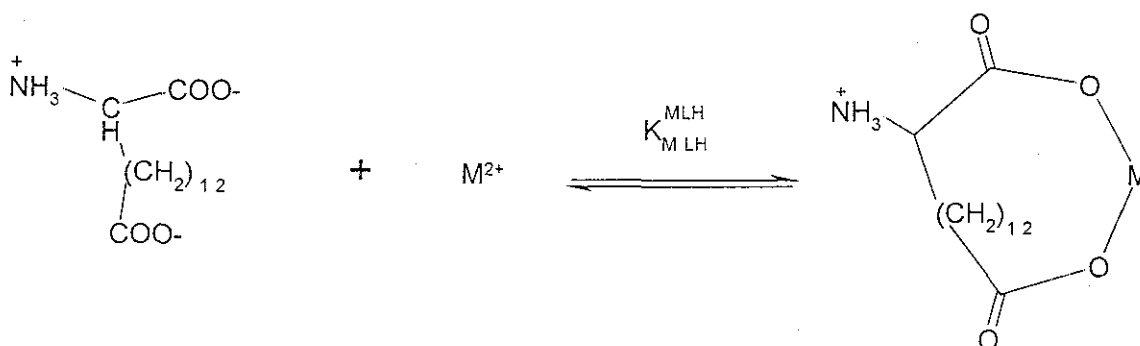
Para la determinación de constantes de formación de los complejos metálicos, se hicieron estudios en condiciones estequiométricas prácticamente 1:1. En la fase de cálculo de las constantes, aún incluyendo en los modelos la posibilidad de formación de complejos 1:2, se consiguió un ajuste satisfactorio de los datos de la titulación (con valores de χ^2 menores a 12.6, es decir con un valor de confianza de 95%, y que se presentan en la sección experimental) con aquellos modelos que únicamente incluían los complejos 1:1, es decir, $[\text{MH}_x\text{L}]^x$ ($x=0-1$). El programa eliminó las constantes correspondientes a estequiometría 1:2

La presencia del ligante no afecta apreciablemente al valor del pH de precipitación del hidróxido del metal (ver Figura 3.2 y Figura 3.3) Sólo se analizaron datos potenciométricos hasta una unidad de pH anterior a la aparición evidente de turbidez en el sistema

Tabla 3.1. Constantes de equilibrio calculadas de datos experimentales.

L	Catión	log β_{101}	log β_{111}
Aspártico	Ca ²⁺	2.67(2)	11.73(3)
	Pb ²⁺	6.395(3)	12.029(5)
	Zn ²⁺⁽⁹⁾	5.82	11.25
	Cd ²⁺	5.07(2)	11.99(2)
Glutámico	Ca ²⁺	1.93(1)	11.15(7)
	Pb ²⁺	5.27(3)	11.96(6)
	Zn ²⁺	6.33(4)	11.65(5)
	Cd ²⁺	5.14(3)	11.95(4)

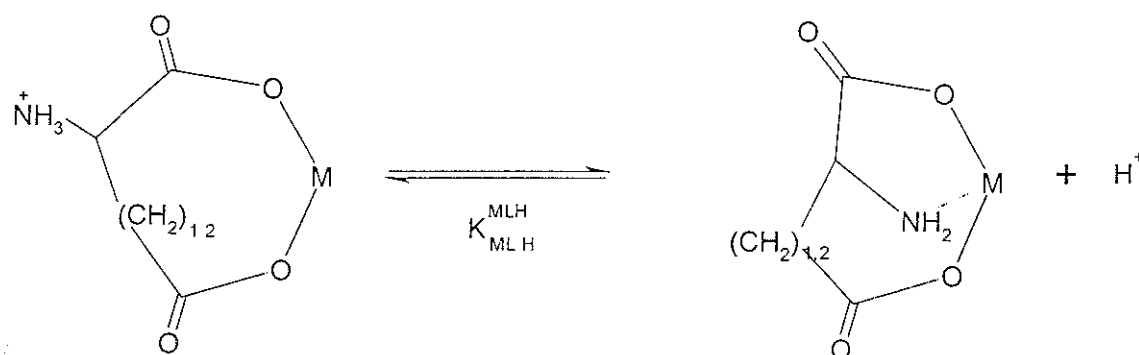
Como se planteó en los antecedentes (1.4.2), de los valores de constantes de acidez y complejación es posible obtener algunos valores para constantes de equilibrios diversos, como por ejemplo $\log K_{MLH}^{MLH}$, calculada como $\log \beta_{111} - pK_{a(\text{ligante})}$ y que para aspártico - (CH₂)₁- y glutámico -(CH₂)₂- representa el equilibrio:



Por lo tanto, puede relacionarse con la afinidad de estos cationes hacia los donadores de oxígeno aislada de la interacción con el grupo amino.

También es posible estimar el valor del pKa del grupo amino en el ligante al coordinarse a cada uno de los cationes. Este valor proporciona información de la afinidad de los cationes por el grupo amino, ya que al aumentar ésta, implica aumento en la acidez del grupo amonio. Este pKa (equivalente a $\log K_{MLH}^{MLH}$), como se explicó en la sección 1.4.2,

se obtiene mediante la diferencia $\log \beta_{111} - \log \beta_{101}$ y corresponde a la reacción que se esquematiza a continuación en la que se sugiere una interacción grupo amino-cation metálico



La constante que se ha definido en los antecedentes como $\log K(N)$ resulta útil para discriminar la afinidad de los cationes por el nitrógeno, al estar dada por la diferencia $(\log \beta_{101} - \log K_{M LH}^{MLH})$

En la Tabla 3.2 se muestran estos valores para ambos aminoácidos con cada uno de los cationes de estudio. Puede verse entonces que Ca^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} exhiben una afinidad muy similar hacia O mientras que Zn^{2+} presenta valores menores.

Tabla 3.2. Constantes calculadas: pKa del grupo amino en el complejo, constante de formación con el grupo amino protonado y contribución de la interacción con N a la estabilidad de los complejos.

L	Catión	pKa _(amino complejo) $\log K_{MLH}^{MLH}$	$\log K_{MLH}^{MLH}$	$\log K(N)$
Aspártico	Ca^{2+}	9.06(5)	2.03	0.7
	Pb^{2+}	5.63(8)	2.32	4.1
	Zn^{2+}	5.43	1.55	4.27
	Cd^{2+}	6.92(4)	2.29	2.81
Glutámico	Ca^{2+}	9.22(8)	1.35	0.61
	Pb^{2+}	6.69(9)	2.16	3.14
	Zn^{2+}	5.32(9)	1.85	4.48
	Cd^{2+}	6.81(7)	2.15	2.99

En el caso del derivado de glutámico con calcio, la contribución debida a la interacción de los oxígenos de carboxilato es menor que para los demás cationes lo cual puede deberse a que la interacción sea con un solo grupo carboxilo para la formación de un quelato, y dos en el caso del derivado de aspártico, como reflejan las estructuras cristalinas presentes en la literatura (Figura 3.5 y Figura 3.6), probablemente relacionado a la separación entre átomos donadores en cada ligante.

Por otro lado se observa que, para Cd^{2+} y Zn^{2+} las especies con mayor abundancia son aquellos derivados de la forma totalmente desprotonada del ligante, lo cual se refleja en los diagramas de distribución de especies (Figura 3.2 y Figura 3.3) Incluso, la acidez del grupo amonio terminal aumenta apreciablemente con la formación de los complejos de Zn^{2+} y Cd^{2+} , es decir, la presencia de especies en que el ligante se encuentra desprotonado se da a valores de pH menores en presencia del catión al formarse el complejo de coordinación (ver Tabla 3.2 y diagramas de distribución de especies, Figura 3.2 y Figura 3.3) Esto está de acuerdo con el hecho de que en condiciones de síntesis similares se aíslan los derivados del ligante totalmente desprotonado con estos dos cationes mientras que para el Pb^{2+} el producto aislable e incluso cristalizable, es el derivado monoprotonado.

En la Figura 3.1 se encuentran graficados los valores que caracterizan independientemente las afinidades de los cationes por los donadores de oxígeno ($\log K_{M LH}^{MH}$ denominada $\log K(O)$) y de nitrógeno ($\log K(N)$) Aquí puede verse una afinidad del Pb^{2+} por el N de aspártico que resulta sorprendentemente alta. Lamentablemente en disolución acuosa no es posible obtener al complejo desprotonado a partir de cualquier sal subiendo el pH, sino que se debe recurrir a una reacción

heterogénea con óxido de plomo, como se describe en la sección experimental (2.2.1.3), para evitar la precipitación del hidróxido.

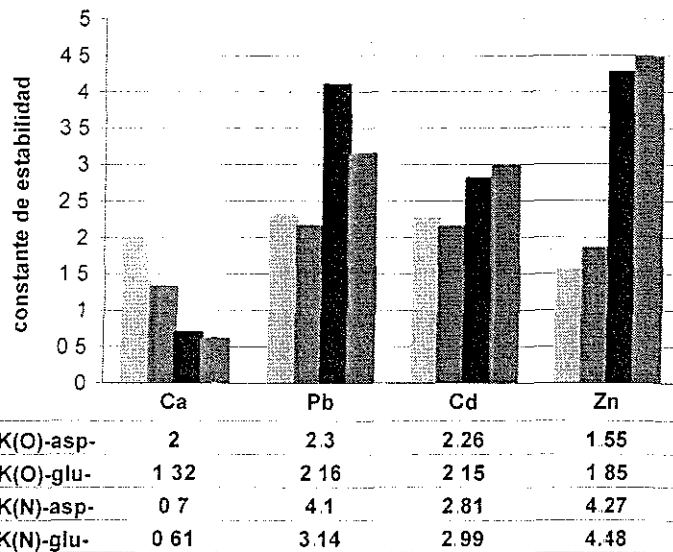
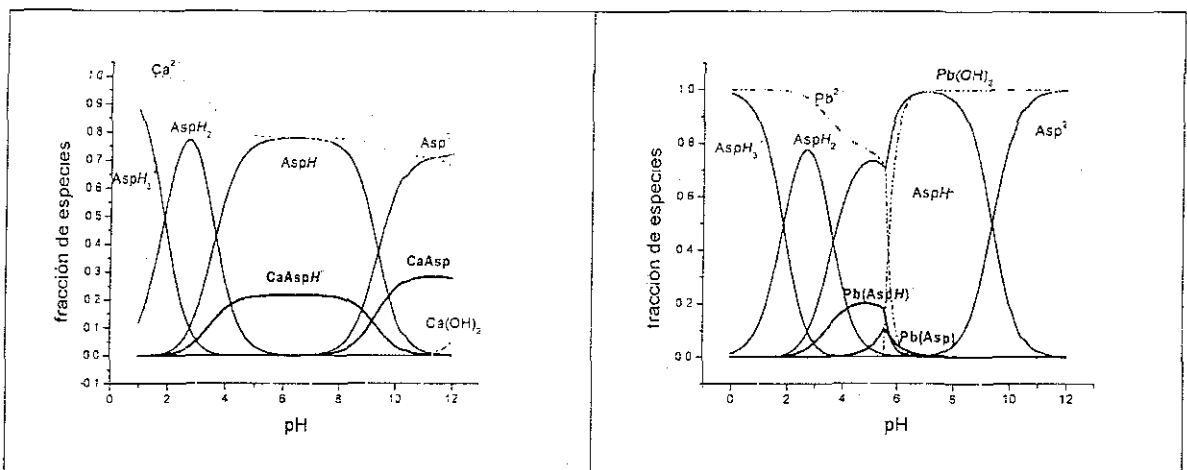


Figura 3.1. Contribución de la interacción con el átomo donador involucrado con los átomos donadores a la estabilidad de los compuestos de coordinación

La contribución más alta a la estabilidad de los complejos debida a la interacción con N (log K(N)) la presenta el Zn^{2+} (Figura 3.1). Esto se relaciona directamente a la afinidad que el Zn^{2+} muestra hacia N. Pb^{2+} y Cd^{2+} muestran una contribución del mismo orden de magnitud en el caso del glutámico, que a su vez corresponde a la del cadmio con aspártico. Por su parte la afinidad del calcio por el nitrógeno es muy escasa, y menor que la que presenta por oxígeno.



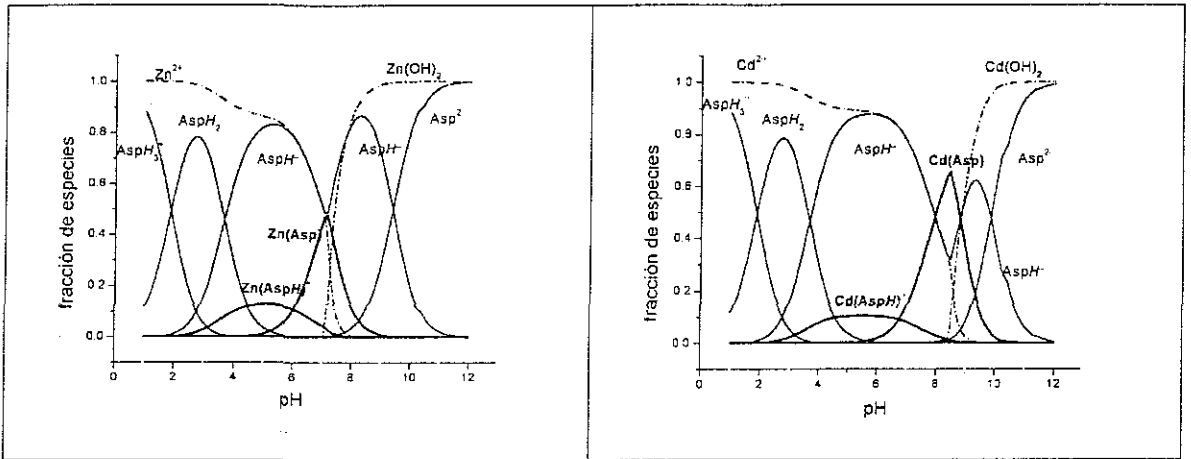


Figura 3.2. Diagramas de distribución de especies de los cationes con Aspártico

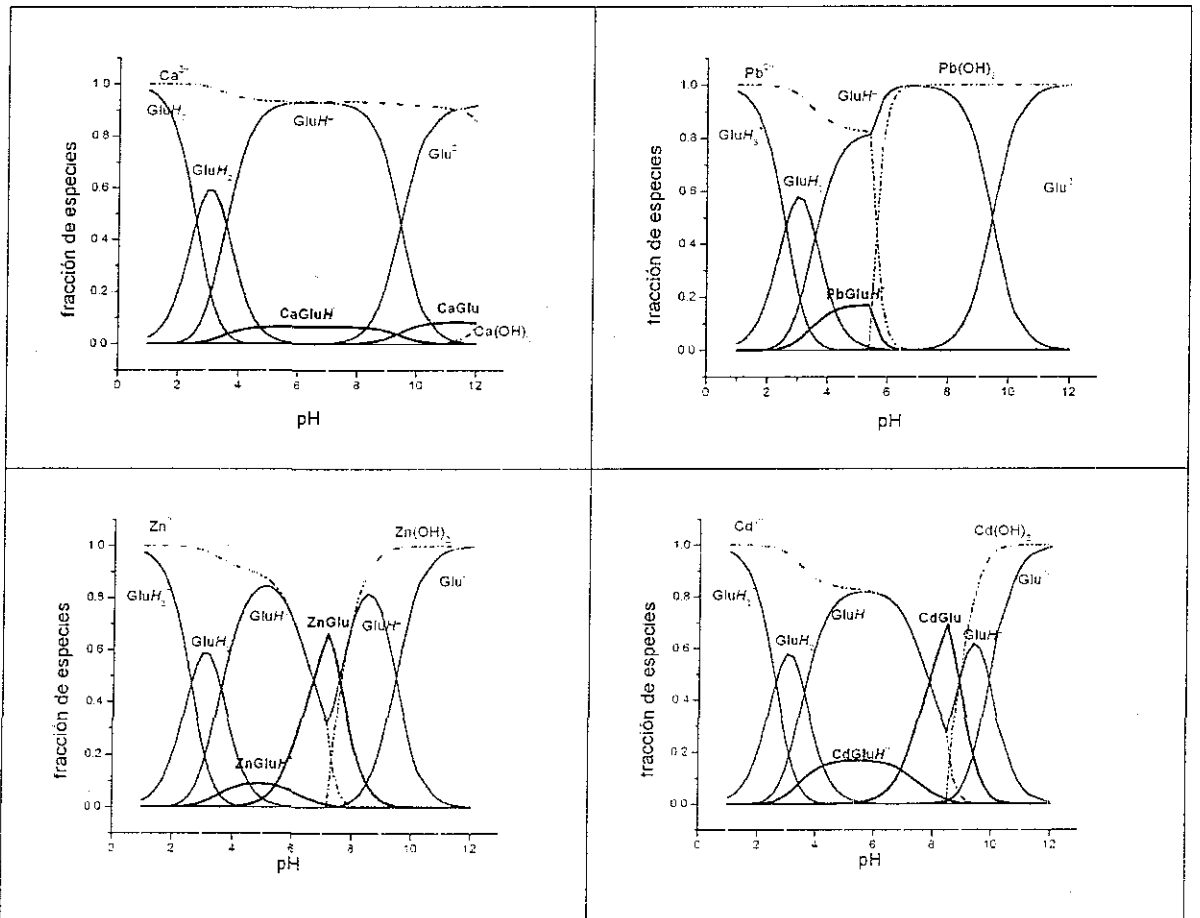


Figura 3.3. Diagramas de distribución de especies entre los cationes y Glutámico

La observación del comportamiento de estos compuestos de coordinación lleva a plantear una hipótesis respecto al tipo de coordinación que será posible encontrar con los ligantes más grandes que también contarán con O y N como átomos donadores: Será más sencillo

aislar compuestos con grupo amino desprotonado derivados de Cd^{2+} y de Zn^{2+} que de Pb^{2+} y Ca^{2+} . La contribución de la interacción con los carboxilos a la estabilidad de los complejos será más evidente con estos dos últimos cationes

3.2. Resonancia Magnética Nuclear. Espectros de ^1H a pH variable

Por la observación de espectros de resonancia de protón en disolución, RMN ^1H de los aminoácidos con los cationes en estudio, y según los ejemplos encontrados en la literatura¹⁰ parece ser posible detectar la forma de coordinación en la formación del compuesto a partir de la multiplicidad de la señal del ^1H enlazado al C_α . Como se muestra en la Figura 3.4, dicho H_α presenta un triplete –sistema de espín AB_2 -¹¹ cuando el C_β tiene mayor libertad de rotación, pues a pH bajo, sólo un carboxilo se encuentra desprotonado y la coordinación monodentada permite la rotación del ligante. Con el incremento del pH, se presenta un patrón doble de dobles al ser posible una quelatación por ambos carboxilos, volviendo a la molécula más rígida diferenciándose los Hs del C_β , al presentarse un sistema de espín ABC. Posteriormente, conforme sigue aumentando el pH, al hacerse posible la coordinación del grupo amino, se prefiere la formación de un anillo de 5 miembros respecto a uno de 7, por lo que se libera el carboxilo γ y se hace posible la rotación nuevamente de la cadena lateral del aminoácido y los protones β se vuelven indistintos - AB_2 -

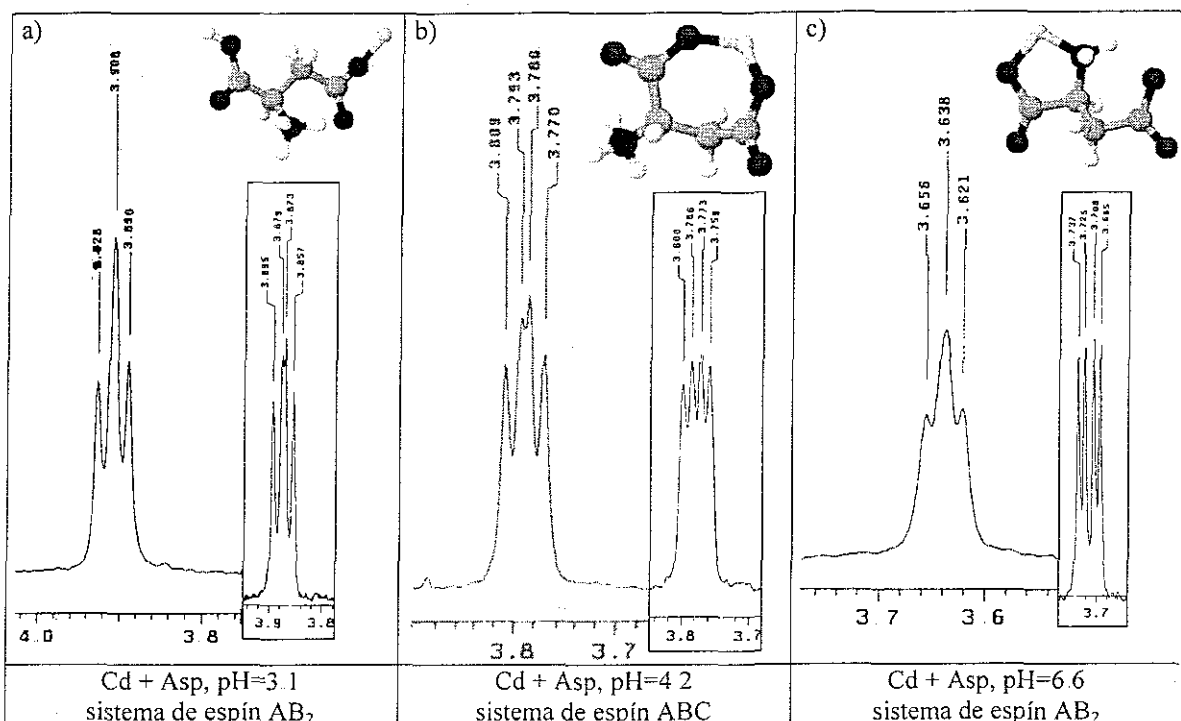


Figura 3.4. Efecto del pH en la formación de los complejos observado vía RMN ¹H.

Se muestra: el espectro del H α en el sistema con cadmio, el correspondiente al ligante libre en un valor de pH similar -enmarcado- y una propuesta de coordinación con el catión cadmio, responsable del patrón de acoplamiento

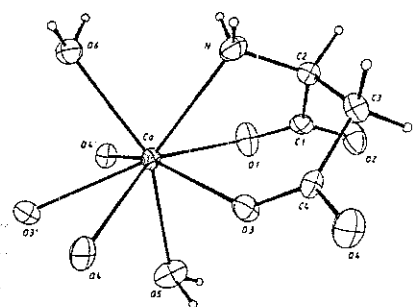
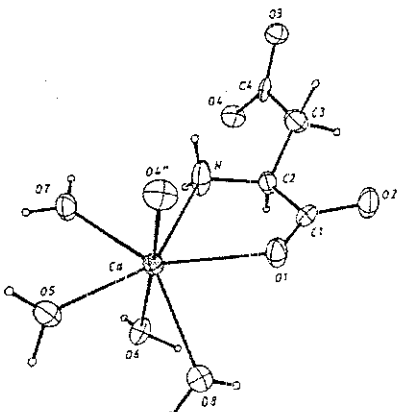
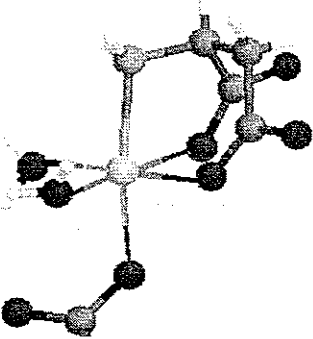
Como se verá más adelante, en la sección 3.3.2, el compuesto que se aísla alrededor de pH=4, no presenta ningún anillo quelato de 7 miembros como el sugerido por la resonancia, formado por 2 carboxilatos, sino que tiende a la formación de un polímero tridimensional.

3.3. Cristalografía

Se pueden encontrar en la literatura las estructuras cristalinas de varios de los derivados de interés para este trabajo*. Se incluyen complejos de iones que no son el objeto principal del trabajo pero ilustran la versatilidad de modos de coordinación de los ligantes en estudio. Podemos además relacionar el tamaño de los iones complejados con la

* Las estructuras que no se presentan como elipsoides térmicos, fueron tomadas del Cambridge Crystallographic Data Centre, dado que el artículo no incluía imágenes claras o útiles.

facilidad de la formación de los anillos quelato con el grupo amino, ya que en el caso del complejo de estroncio con glutamato, a pesar de obtenerse el complejo en un valor de pH muy elevado -11.5- (de tal manera que el grupo amino se encuentra desprotonado), no se forma el quelato de 5 miembros, sino que únicamente se forman los quelatos de 4 miembros correspondientes a la coordinación bidentada de los carboxilos.

 <p>Ca(Asp) 2H₂O¹²</p>	<p>Ca-N: 2.56 Å Ca-O1(quelato-5): 2.43 Å Ca-O3(quelato-6): 2.396 Å Ca-O4'(puente): 2.337 Å Ca-O3'(quelato-4): 2.56 Å Ca-O4'(quelato-4): 2.6 Å Ca-O5(agua): 2.56 Å Ca-O6(agua): 2.54 Å</p>
 <p>Ca(Asp) 4H₂O¹²</p>	<p>Ca-N: 2.53 Å Ca-O1(quelato-5): 2.41 Å Ca-O4'(monodentado): 2.314 Å Ca-O5(agua): 2.393 Å Ca-O6(agua): 2.435 Å Ca-O7(agua): 2.398 Å Ca-O8(agua): 2.461 Å</p>
 <p>Zn(Asp) 3H₂O¹³</p>	<p>Zn-N: 2.08 Å Zn-O1(quelato-5): 2.2 Å Zn-O3(quelato-6): 2.18 Å Zn-O4(monodentado): 2.06 Å Zn-O5(agua): 2.106 Å Zn-O6(agua): 2.173 Å</p>

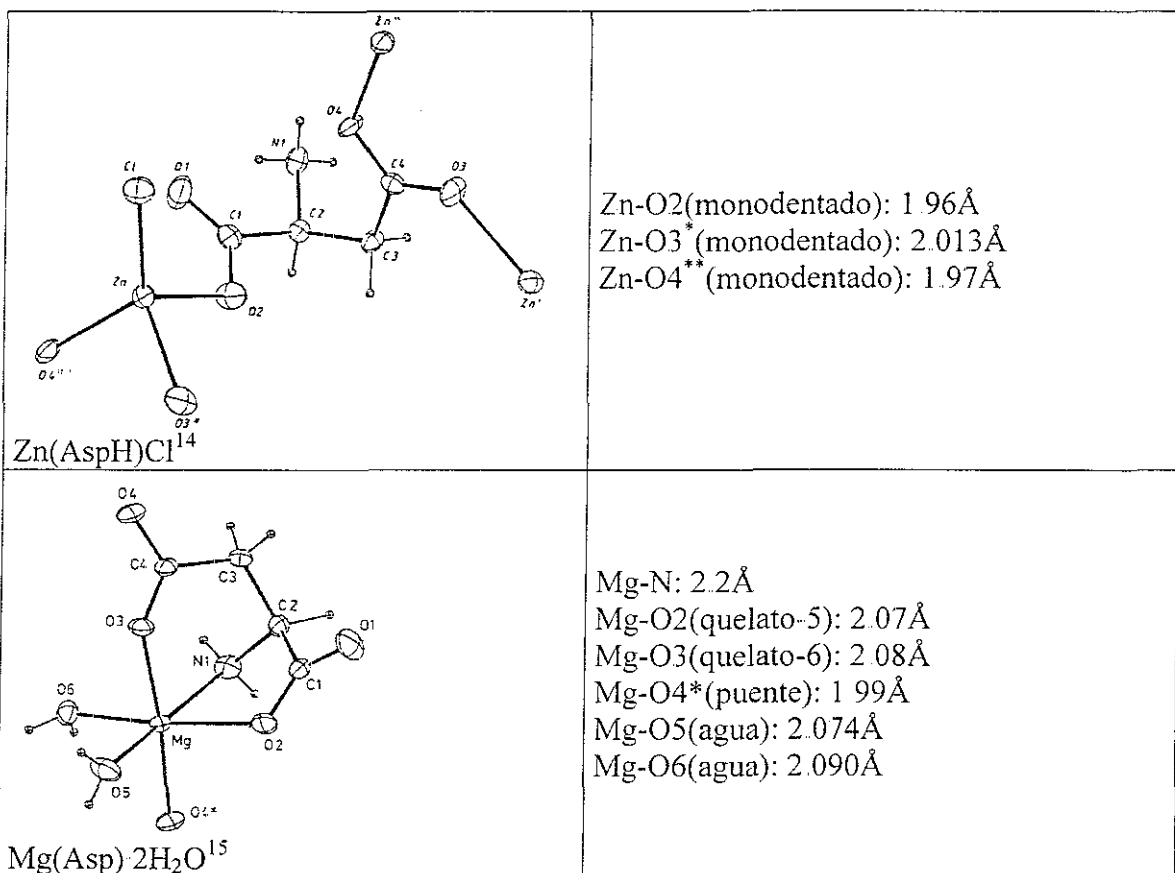


Figura 3.5. Estructuras de complejos de M^{2+} con aspártico presentes en la literatura. Distancias del entorno de coordinación.

En general se puede observar que en tanto que en los compuestos de los metales alcalinotérreos las distancias M-N son mayores que las correspondientes M-O, en el caso de los derivados de Zn y de Cd, las distancias son casi equivalentes o incluso menores para M-N que para M-O, lo cual se puede atribuir a la escasa posibilidad de los metales alcalinotérreos para presentar una interacción de tipo orbital con un grupo no cargado como el amino, favoreciéndose la interacción de tipo electrostático con los grupos carboxilato, mientras que por el otro lado los cationes Zn^{2+} y Cd^{2+} presentan una mayor posibilidad de interacción de tipo orbital con átomos donadores menos duros

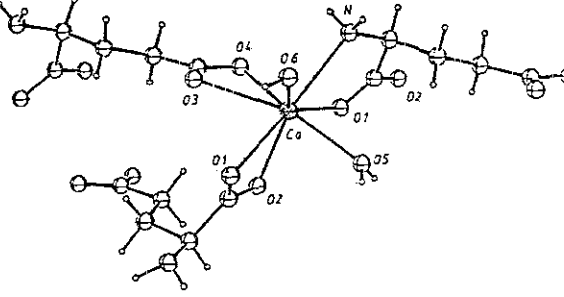
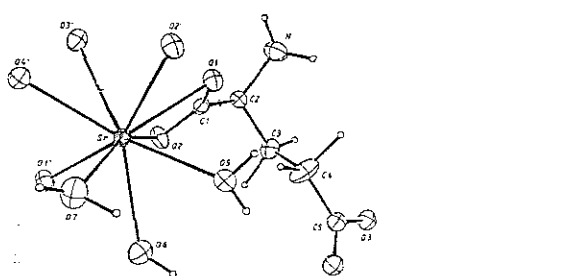
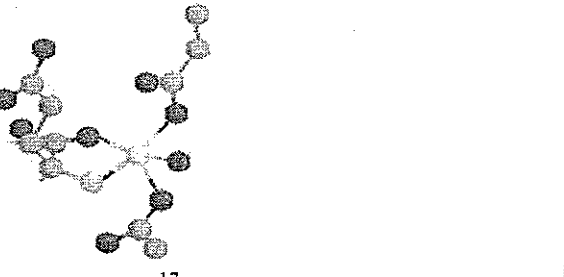
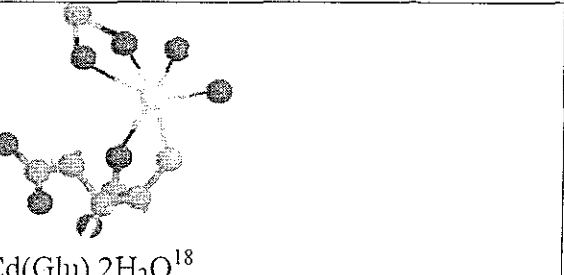
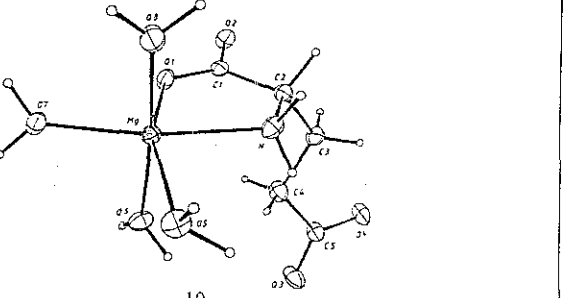
 <p>Ca(Glu) 3H₂O¹⁶</p>	<p>Ca-N: 2.556Å Ca-O1(quelato-5): 2.437Å Ca-O3(quelato-4): 2.6Å Ca-O4(quelato-4): 2.45Å Ca-O1'(quelato-4,puente): 2.581Å Ca-O2'(quelato-4): 2.44Å Ca-O5(agua): 2.385Å</p>
 <p>Sr(Glu) 6H₂O¹⁰</p>	<p>Sr-O1(quelato-4): 2.72Å Sr-O2(quelato-4): 2.685Å Sr-O1'(puente): 2.642Å Sr-O2'(puente): 2.651Å Sr-O3'(quelato-4): 2.68Å Sr-O4'(quelato-4): 2.66Å Sr-O5(agua): 2.66Å Sr-O6(agua): 2.7Å Sr-O7(agua): 2.64Å</p>
 <p>Zn(Glu) H₂O¹⁷</p>	<p>Zn-N: 2.10Å Zn-O1(quelato-5): 2.11Å Zn-O3'(quelato-4): 2.18Å Zn-O4'("quelato"-4): 2.58Å Zn-O2'(puente): 2.03Å Zn-O5(agua): 2.07Å</p>
 <p>Cd(Glu) 2H₂O¹⁸</p>	<p>Cd-N: 2.29Å Cd-O1(quelato-5): 2.28Å Cd-O3'(quelato-4): 2.30Å Cd-O4'(quelato-4): 2.45Å Cd-O2'(puente): 2.25Å Cd-O5(agua): 2.25Å</p>
 <p>Mg(Glu) 4H₂O¹⁰</p>	<p>Mg-N: 2.211Å Mg-O1(quelato-5): 2.09Å Mg-O5(agua): 2.13Å Mg-O6(agua): 2.05Å Mg-O7(agua): 2.05Å Mg-O8(agua): 2.03Å</p>

Figura 3.6. Estructuras de complejos de M²⁺ con glutámico presentes en la literatura. Distancias del entorno de coordinación.

Los derivados de plomo y cadmio con aspártico no se habían aislado para su caracterización por cristalografía, pero en este trabajo se logró obtenerlos, y se describirán a continuación.

3.3.1 $Pb(AspH)NO_3$

La estructura cristalina de este compuesto se encuentra constituida por una red tridimensional debido a la capacidad del ligante aspartato de coordinar dos átomos de plomo a través de cada carboxilato, además de que un mismo átomo de oxígeno del carboxilato puede fungir como puente entre dos cationes.

Los enlaces comentados resultan en la formación de anillos de 18 miembros que contienen a 3 iones y tres moléculas del ligante. Los iones plomo quedan entonces a distancias de 4 589 y 4 706 Å (ver Figura 3.7).

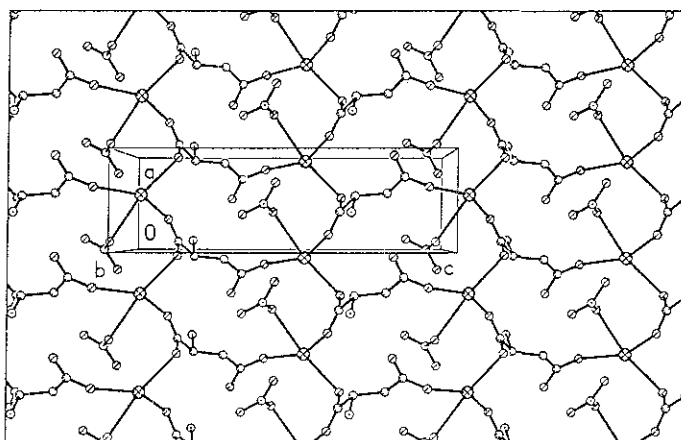


Figura 3.7. Anillos de 18 miembros que contienen 3 iones Pb (⊗)

La geometría de coordinación alrededor de cada ion Pb^{2+} puede describirse como un prisma triangular (Figura 3.8), donde una arista se encuentra ocupada por dos átomos de oxígeno del grupo β -carboxilo (C1(O1)O2) que, comportándose como anisobidentado, se encuentra formando un anillo quelato de cuatro miembros, generando un ángulo O1-Pb-O2=49.8°; y las distancias de enlace C1-O1=1.264(19) y C1-O2=1.24(2) Å, así como Pb-

O1=2.706(12) y Pb-O2=2.500(11)Å (Tabla 3.3). El hecho de que cada oxígeno se encuentre formando un enlace distinto probablemente se debe a que uno de ellos, O1, también actúa como puente (Figura 3.9).

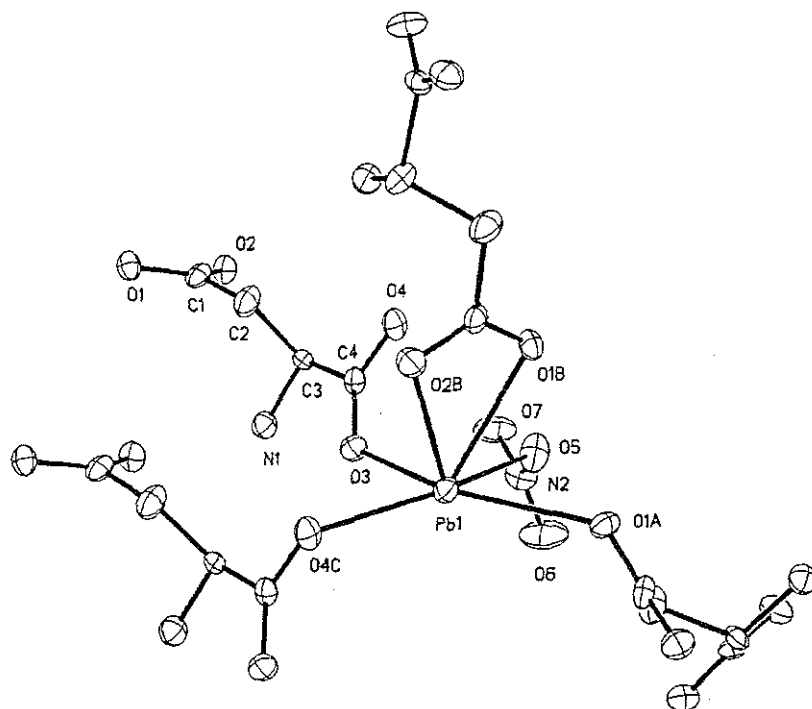


Figura 3.8. Entorno de coordinación del ion Pb^{2+} en $Pb(AspH)NO_3$.

El átomo de plomo se ubica 0.13Å por encima de una cara del prisma que se encuentra definida por cuatro átomos de oxígeno, todos ellos aportados por diferentes moléculas. Dos provienen de α -carboxilatos de dos aspartatos relacionados por simetría con distancias Pb-O3=2.493(12) y Pb-O4=2.536(12)Å, cuya diferencia es mínima. La tercera posición de la base de la pirámide la ocupa el oxígeno O1 del carboxilo β de un ligante relacionado por simetría al formar el puente ya mencionado y que se muestra en la Figura 3.9

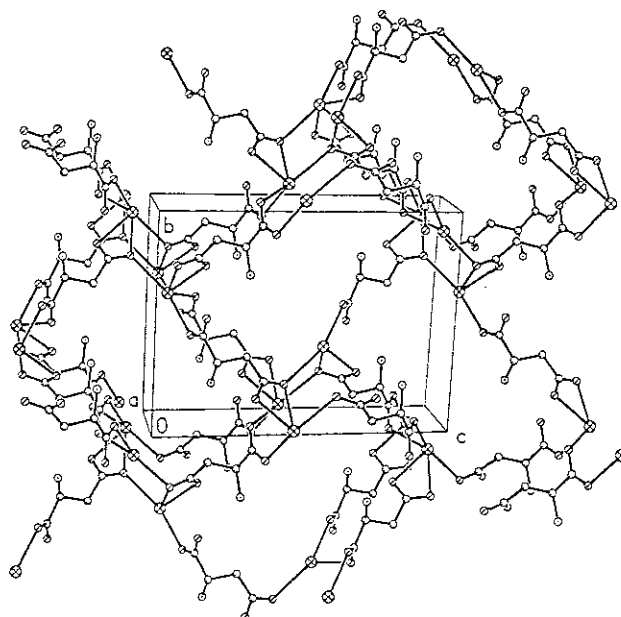


Figura 3.9. Papel de O1 en la formación de la red tridimensional de $Pb(AspH)NO_3$.

Completando la base, se enlaza de forma monodentada un oxígeno del anión nitrato con una distancia $Pb-O5=2.730(17)\text{\AA}$, muy similar a la que se encuentra en el nitrato de plomo (2.81\AA^{19}). Esto concuerda con la observación en el infrarrojo mediano de un comportamiento iónico del nitrato. También el carboxilato α es disimétrico con distancias $C4-O3=1.20(2)$ y $C4-O4=1.257(19)\text{\AA}$.

Esta geometría deja un amplio espacio debajo de la base de la pirámide disponible para ser ocupado por el par estereoactivo. Debería decirse, en realidad, que esta geometría es causada por la presencia del par estereoactivo del $Pb(II)$, en un comportamiento que sería denominado como hemidireccionado según la clasificación de Shimon-Livni y Glusker²⁰ Como se comentó en los antecedentes (1.3.3), esto es frecuente, para números de coordinación 6, donde los átomos del entorno se encuentran interactuando principalmente por enlaces iónicos. Las distancias de $Pb-O$ en este compuesto, de 2.493 a 2.743\AA , concuerdan con la suma de radios iónicos presentados en la sección 1.6 de los antecedentes (de 2.5 a 2.63\AA)

Tabla 3.3. Longitudes de enlace (Å) y ángulos (°) para el complejo Pb(AspH)NO₃

Longitudes de enlace			
Pb(1)–O(3)	2.493(12)	Pb(1)–O(2)#1	2.500(11)
Pb(1)–O(4)#2	2.536(12)	Pb(1)–O(1)#1	2.706(12)
Pb(1)–O(5)	2.730(17)	Pb(1)–O(1)#3	2.743(10)
C(1)–O(2)	1.24(2)	C(1)–O(1)	1.264(19)
C(1)–C(2)	1.53(2)	C(2)–C(3)	1.52(2)
C(3)–N(1)	1.47(2)	C(3)–C(4)	1.56(2)
C(4)–O(3)	1.20(2)	C(4)–O(4)	1.257(19)
O(1)–Pb(1)#4	2.706(11)	O(1)–Pb(1)#5	2.743(10)
O(2)–Pb(1)#4	2.500(11)	O(4)–Pb(1)#6	2.536(12)
N(2)–O(6)	1.19(2)	N(2)–O(7)	1.25(2)
N(2)–O(5)	1.289(19)		
Ángulos de enlace			
O(3)–Pb(1)–O(2)#1	91.4(4)	O(3)–Pb(1)–O(4)#2	79.2(4)
O(2)#1–Pb(1)–O(4)#2	77.8(4)	O(3)–Pb(1)–O(1)#1	99.2(4)
O(2)#1–Pb(1)–O(1)#1	49.8(4)	O(4)#2–Pb(1)–O(1)#1	127.6(4)
O(3)–Pb(1)–O(5)	73.5(4)	O(2)#1–Pb(1)–O(5)	112.9(5)
O(4)#2–Pb(1)–O(5)	150.7(3)	O(1)#1–Pb(1)–O(5)	68.3(4)
O(3)–Pb(1)–O(1)#3	155.3(4)	O(2)#1–Pb(1)–O(1)#3	99.0(4)
O(4)#2–Pb(1)–O(1)#3	124.8(4)	O(1)#1–Pb(1)–O(1)#3	71.7(3)
O(5)–Pb(1)–O(1)#3	81.8(4)	C(1)–O(1)–Pb(1)#4	88.3(10)
O(2)–C(1)–O(1)	123.0(15)	O(3)–C(4)–O(4)	128.5(14)
Pb(1)#4–O(1)–Pb(1)#5	119.5(4)	C(1)–O(1)–Pb(1)#5	122.9(9)
C(4)–O(3)–Pb(1)	117.6(11)	C(1)–O(2)–Pb(1)#4	98.7(9)
O(6)–N(2)–O(7)	122.0(18)	C(4)–O(4)–Pb(1)#6	122.3(9)
O(7)–N(2)–O(5)	118.0(17)	O(6)–N(2)–O(5)	119.5(18)
N(2)–O(5)–Pb(1)	127.9(12)		

Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 - x - 1, y - 1/2, - z + 3/2; #2 x + 1, y, z; #3 - x - 1/2, - y + 2, z + 1/2; #4 - x - 1, y + 1/2, - z + 3/2; #5 - x - 1/2, - y + 2, z - 1/2; #6 x - 1, y, z

3.3.2. Cd(AspH)NO₃

Mientras que la unidad asimétrica contiene un ion cadmio un aspartato y un nitrato, al igual que la estructura de plomo, la geometría de coordinación cambia absolutamente al “sustituir” plomo por cadmio. Y es que el cadmio no presenta el efecto de par estereoactivo. El entorno de coordinación tiene una geometría que puede ser descrita como de octaedro distorsionado (Figura 3.10) al encontrarse el cadmio en realidad heptacoordinado, pues uno de los vértices del octaedro lo ocupan dos átomos de oxígeno del nitrato que en este caso se coordina de modo bidentado (O11 y O12).

Los otros sitios de coordinación se encuentran ocupados, en principio por un átomo de oxígeno de un nitrato cristalográficamente equivalente al descrito primero en posición *trans*. Se trata del O11, que será responsable entonces de puentear a los átomos de cadmio en una de las dimensiones, dirigiendo a la estructura polimérica.

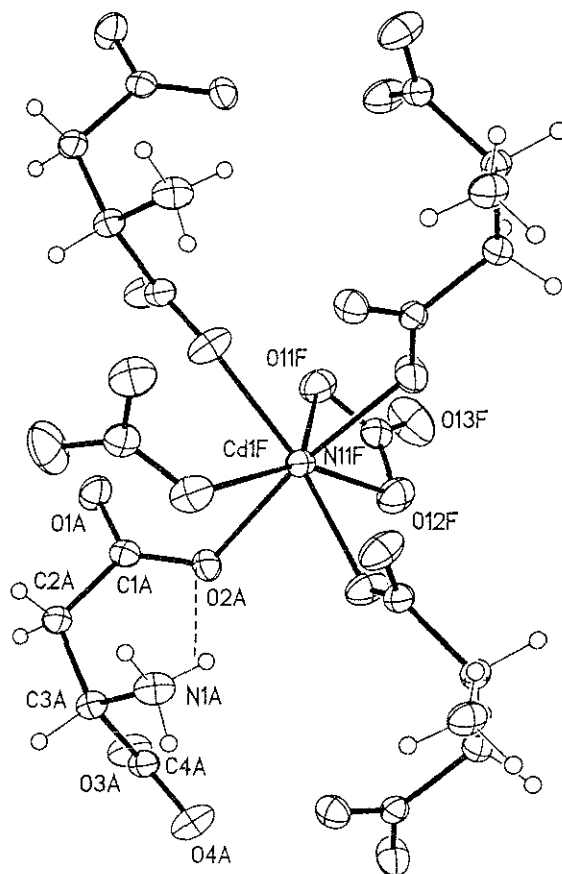


Figura 3.10. Entorno de coordinación del ion Cd^{2+} en $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$. Elipsoides al 50%. La línea punteada muestra el puente de hidrógeno del grupo amonio con el carboxilo β

En los cuatro sitios restantes (ecuatoriales), se ubican los 4 diferentes átomos de oxígeno de los carboxilos existentes, cada uno proveniente de una molécula distinta pero relacionada por simetría con las demás. Así, las distancias Cd-O van de 2.213(3) a 2.273(2) Å en el plano ecuatorial y de 2.464(3) a 2.600(3) Å en las interacciones del ion nitrato con el cadmio (Tabla 3.4) que constituyen las posiciones apicales. Estos son intervalos normales para los compuestos de coordinación de cadmio.²¹ La distorsión

respecto a la geometría octaédrica se hace muy evidente en los valores de los ángulos que forman los átomos donadores con el cadmio: desde 51.02° en el anillo de cuatro miembros, resultado del ángulo de mordida del nitrato; los que debieran ser ángulos de 90° , tienen valores que van de 72.2° a 93.7° , y entre los ligantes en posición *trans*, en lugar de un ángulo de 180° , ángulos de 149° a 171° .

Tabla 3.4. Longitudes de enlace (Å) y ángulos ($^\circ$) para el complejo Cd(AspH)NO₃

Longitudes de enlace			
Cd(1)-O(1)	2.213(3)	Cd(1)-O(4)#1	2.242(2)
Cd(1)-O(2)#2	2.258(2)	Cd(1)-O(3)#3	2.273(2)
Cd(1)-O(12)	2.464(3)	Cd(1)-O(11)	2.529(3)
Cd(1)-O(11)#4	2.600(3)	C(1)-O(1)	1.254(4)
C(1)-O(2)	1.273(4)	C(4)-O(3)	1.250(4)
C(4)-O(4)	1.248(4)	N(11)-O(13)	1.219(4)
N(11)-O(12)	1.258(4)	N(11)-O(11)	1.272(4)
Ángulos de enlace			
O(1)-Cd(1)-O(4)#1	87.15(10)	O(1)-Cd(1)-O(2)#2	171.03(9)
O(4)#1-Cd(1)-O(2)#2	101.38(10)	O(1)-Cd(1)-O(3)#3	91.27(10)
O(4)#1-Cd(1)-O(3)#3	149.38(10)	O(2)#2-Cd(1)-O(3)#3	82.81(10)
O(1)-Cd(1)-O(12)	85.36(10)	O(4)#1-Cd(1)-O(12)	127.67(9)
O(2)#2-Cd(1)-O(12)	87.19(10)	O(3)#3-Cd(1)-O(12)	82.56(10)
O(1)-Cd(1)-O(11)	85.49(10)	O(4)#1-Cd(1)-O(11)	76.80(9)
O(2)#2-Cd(1)-O(11)	93.70(9)	O(3)#3-Cd(1)-O(11)	133.58(10)
O(12)-Cd(1)-O(11)	51.02(9)	O(1)-Cd(1)-O(11)#4	105.87(10)
O(4)#1-Cd(1)-O(11)#4	72.22(9)	O(2)#2-Cd(1)-O(11)#4	79.67(9)
O(3)#3-Cd(1)-O(11)#4	78.87(10)	O(12)-Cd(1)-O(11)#4	158.40(9)
O(11)-Cd(1)-O(11)#4	146.20(6)	O(1)-C(1)-O(2)	125.5(3)
O(1)-C(1)-C(2)	115.8(3)	O(2)-C(1)-C(2)	118.6(3)
O(3)-C(4)-O(4)	128.5(3)	O(3)-C(4)-C(3)	117.6(3)
O(4)-C(4)-C(3)	113.8(3)		

Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1, $-x+1, y+1/2, -z-1/2$; #2, $-x, y+1/2, -z-1/2$; #3, $x-1, y, z$; #4, $-x, y-1/2, -z+1/2$

El complejo se encuentra formando una red polimérica bidimensional, por un lado, como ya se comentó, por el puente que forma el átomo O11 perteneciente al nitrato, y por el otro lado, debido a que cada uno de los oxígenos de los carboxilos en el aspartato enlaza a un átomo de cadmio diferente (Figura 3.11), formándose así, además de anillos de 6

miembros con dos iones cadmio, un nitrato y un aspártico, anillos de 4 miembros con 2 cadmios y dos aspárticos

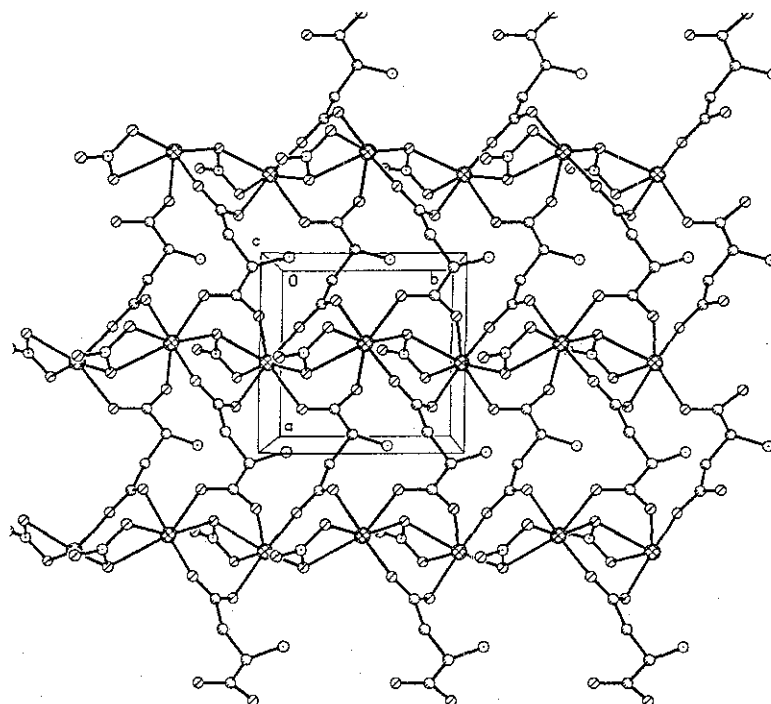


Figura 3.11. Polímero bidimensional formado por $Cd(AspH)NO_3$. Se observa la formación de anillos de 14 miembros.

Estas capas bidimensionales se mantienen unidas entre sí debido a la existencia de interacciones de puente de hidrógeno en las que interviene el grupo amonio, al interactuar con el nitrato de otra capa (Figura 3.12).

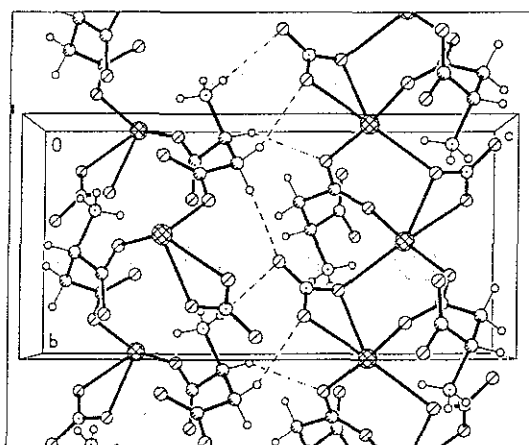


Figura 3.12. Interacción entre capas poliméricas a través de puentes de hidrógeno.

Otro puente de hidrógeno digno de mencionarse es el más fuerte dentro de la estructura (Tabla 3.5), que se forma entre el amonio y el carboxilo β de una misma molécula de aspártico (señalado en la Figura 3.10 como una línea punteada).

Tabla 3.5. Puentes de hidrógeno en Cd(AspH)NO₃.

D	H	A	Simetría del átomo A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N1	H1A	O11(nitrato)	x, y-1, z	0.890	2.462	2.985	117.96
N1	H1A	O13(nitrato)	x+1/2, -y+3/2, -z	0.890	2.561	3.139	123.24
N1	H1A	O12(nitrato)	x+1/2, -y+3/2, -z	0.890	2.637	3.320	134.26
N1	H1B	O2(COO β)		0.890	2.259	2.838	122.48
N1	H1B	O3(COO α)	-x+1, y-1/2, -z+1/2	0.890	2.559	3.401	158.19
N1	H1C	O12(nitrato)	x+1, y-1, z	0.890	2.310	3.103	148.31
N1	H1C	O2(COO β)	-x+1, y-1/2, -z+1/2	0.890	2.568	3.193	127.95

Donde H...A < (r+2)Å y D-H...A > 110°. D, átomo donador de H; A, átomo aceptor de H.

3.4. Espectroscopia Infrarroja

3.4.1. IR mediano

Esta espectroscopia se utilizó para constatar que se dio la síntesis diseñada, observando la presencia del contraíón en aquellos compuestos desarrollados en un pH en el que el grupo amino se mantiene protonado y es necesario el contraíón para neutralizar la carga.

El estado de protonación del ligante en el complejo no se puede llegar a observar mediante el patrón de dos bandas anchas²² que presenta el grupo amonio en la región de 3400-2000cm⁻¹, debido a que la presencia de aguas de hidratación las oculta. En el caso de los complejos cuyo grupo amino se encuentra desprotonado, es más frecuente poder distinguir el patrón de 3 bandas en el intervalo de 3400 a 3000 cm⁻¹. Para constatar el intercambio isotópico en las muestras que se sometieron a estudios de IR lejano, se observa el desplazamiento de las bandas mencionadas en aproximadamente 800cm⁻¹ con la deuteración, coincidente con lo calculado al considerar la diferencia en masa reducida cuando RNH₂ se torna RND₂.

3.4.2. IR lejano

Se estudia además, la espectroscopia en la región del IR lejano, en que los espectros de los productos originales se comparan con el espectro del mismo producto después de haber sido *deuterado*. La deuteración se consigue agitando en agua deuterada el compuesto ya aislado, o sintetizándolo de agua deuterada siguiendo el procedimiento que descrito en la sección experimental para la síntesis original, intercambiando así los hidrógenos enlazados a heteroátomos (en este caso, únicamente a N, ya que los carboxilos están desprotonados en todos los casos). Como se explica en los antecedentes, de estos espectros se puede inferir si el catión se encuentra unido al NH₂, pues por ejemplo, para el derivado de óxido de plomo con ácido aspártico la banda que se asigna a ese enlace ($\omega=325\text{cm}^{-1}$) sufre un desplazamiento a 313cm^{-1} (ver Figura 3.13). Esta variación es proporcional al cambio en la masa reducida (μ) al intercambiar ¹H por ²D, asumiendo que el átomo de plomo perciba al nitrógeno como grupo amino en conjunto, y que la constante de fuerza del enlace (k) no se altera, de acuerdo a las ecuaciones presentadas en los antecedentes (1.7), que adquieren entonces los siguientes valores:

$$\begin{aligned} \mu_{\text{Pb-NH}_2} &= \frac{(m_1 \times m_2)}{(m_1 + m_2)} \approx 207 \times 16 / (207 + 16) = 14.85 \\ \mu_{\text{Pb-ND}_2} &= \frac{(m_1 \times m_2)}{(m_1 + m_2)} \approx 207 \times 18 / (207 + 18) = 16.56 \end{aligned} \quad \left| \quad \begin{aligned} \omega_{\text{Pb-ND}_2} &= \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu_{\text{Pb-ND}_2}}} = \frac{\omega_{\text{Pb-NH}_2}}{\sqrt{\frac{\mu_{\text{Pb-NH}_2}}{\mu_{\text{Pb-ND}_2}}}} \approx (14.85/16.56)^{1/2} = 0.947 \\ \omega_{\text{Pb-NH}_2} &= \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu_{\text{Pb-NH}_2}}} \end{aligned} \right.$$

$\omega_{\text{PbND}_2} \approx 0.947 \omega_{\text{PbNH}_2} = [0.947(325\text{cm}^{-1}) = 308] \approx 313$

Esta banda no se presenta en el producto con el grupo amino protonado, que por lo mismo se encuentra deshabilitado para la coordinación (Figura 3.13).

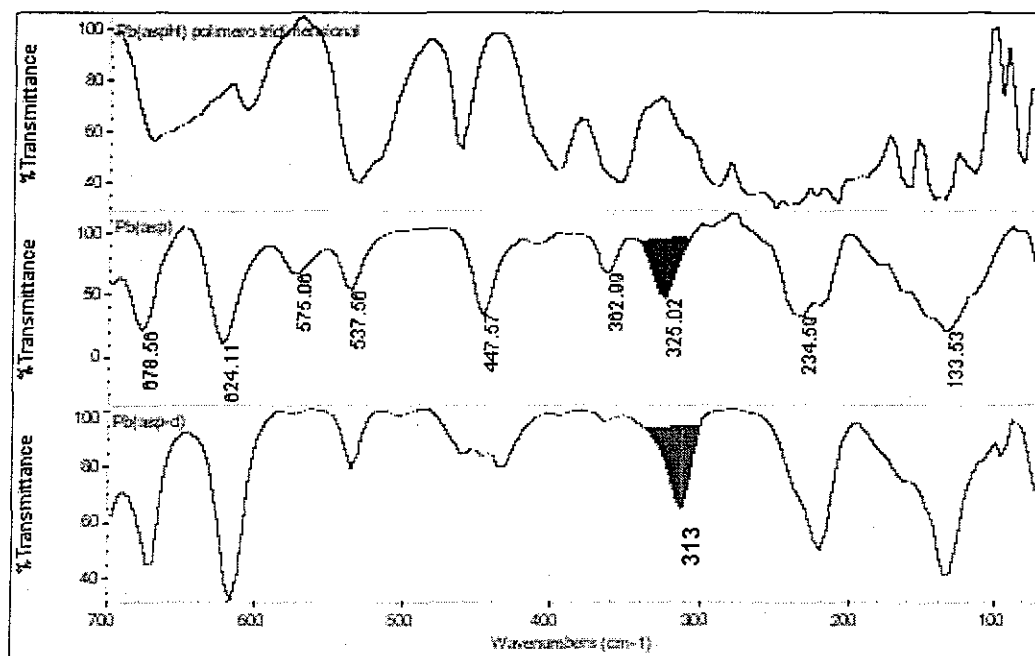


Figura 3.13. Espectros de IR-lejano de los derivados de aspártico con plomo.

En todo caso la asignación de bandas requiere de un trabajo más sistemático, analizando familias de compuestos, pues no hay información relevante en la literatura al respecto de la asignación de bandas en la región del IR lejano de Pb^{2+} en compuestos con O y N como átomos donadores ^{23(a)} A lo largo de este trabajo, sin embargo parece constatar que la asignación es correcta.

Los derivados aislados de aspártico con Zn^{2+} y Cd^{2+} corresponden a complejos cuyo grupo amino se encuentra protonado, por lo que no se observa en ninguna banda el desplazamiento correspondiente.

En el caso de los derivados de ácido glutámico, la tendencia en la posición de las señales alrededor de los valores observados para el derivado de plomo con aspártico, coincide con el cambio en las masas del catión divalente de trabajo, para aquellos compuestos cuyas condiciones de síntesis permiten que el ligante se encuentre desprotonado, como se puede ver en la Figura 3.14.

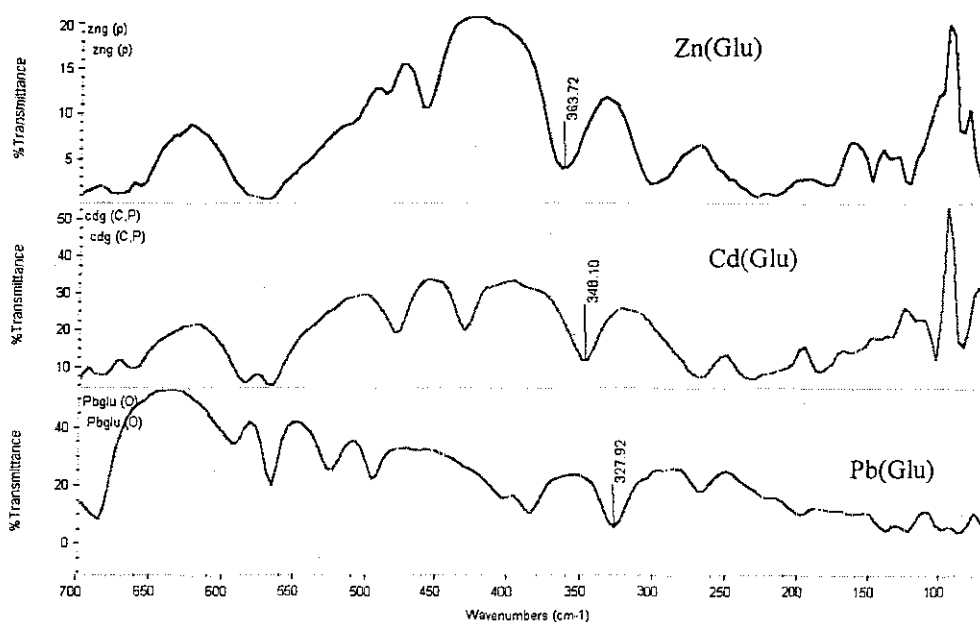


Figura 3.14. Señales asignadas a la interacción Metal-Amino en los espectros de IR lejano de M^{2+} con glutámico.

Se puede observar que existe correspondencia banda a banda entre los espectros, lo cual concuerda con la observación cristalográfica de que los derivados de glutámico con zinc y cadmio generan compuestos de estructura muy similar (Figura 3.6).

Los compuestos de calcio se enlazan mediante una interacción de tipo principalmente iónico, lo cual se refleja en la ausencia de bandas importantes en el espectro de IR-lejano de sus complejos, aun en el de aquellos sintetizados a valores altos de pH. De cualquier manera, de acuerdo con lo observado en las constantes de formación, la interacción con nitrógeno prácticamente no contribuye a la formación de los complejos de Ca^{2+} .

3.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS

3.5.1. CP/MAS de ^{111}Cd

Además de estudiar los espectros de sólidos de ^{13}C , se intentó hacer un estudio de RMN de sólidos observando el núcleo ^{207}Pb . Para ello se sintetizó una serie de compuestos de coordinación con átomos donadores O y N que permitiera establecer una especie de curva

patrón donde se relacionara el desplazamiento químico con el átomo donador. La ventana espectral de dicho núcleo es de una amplitud 6 veces mayor al ancho que logra el aparato con el que se trabajó (Espectrómetro Varian Unity Plus con un magneto de 7.5 T), lo cual dificulta mucho localizar la señal, además de que resulta ser un núcleo muy susceptible a la anisotropía, por lo que las más ligeras variaciones en una simetría esférica alrededor del plomo provocan la aparición de un gran número de señales que se confunden con el ruido, ni qué decir cuando se presenta el efecto de par estéreóactivo (ver 3.3.1). De manera que se descartó el análisis de resonancia de sólidos del plomo como herramienta para este trabajo.

Sin embargo, en los compuestos derivados de cadmio sí es factible obtener mediante esta técnica, una señal que puede dar información del entorno de coordinación.

3.5.1.1. *Cd(AspH)NO₃*

El cadmio en el complejo $Cd(AspH)NO_3$ (ver Figura 3.15-a) tiene un desplazamiento químico de -78.6ppm referido a $Cd(ClO_4)_2$. Esto, de acuerdo a los factores que influyen al desplazamiento químico que se presentaron en los antecedentes (1.8.2), denota un ambiente oxigenado con baja quelatación. Esto se confirma con la estructura cristalina discutida (3.3.2) en la que se observan 7 átomos de oxígeno conformando la esfera de coordinación, dos de ellos pertenecientes a un ion nitrato, generando un anillo quelato de 4 miembros. Esto puede ser la causa del acoplamiento de segundo orden entre ^{111}Cd y ^{14}N mencionado en la literatura como alrededor de 150Hz .²⁴ El espectro tiene un sorprendente patrón 1:2:1 con un desdoblamiento de 125Hz que resulta alto para un acoplamiento a 2 enlaces, pero la distancia Cd-N en este anillo resulta ser muy corta:

2.916Å

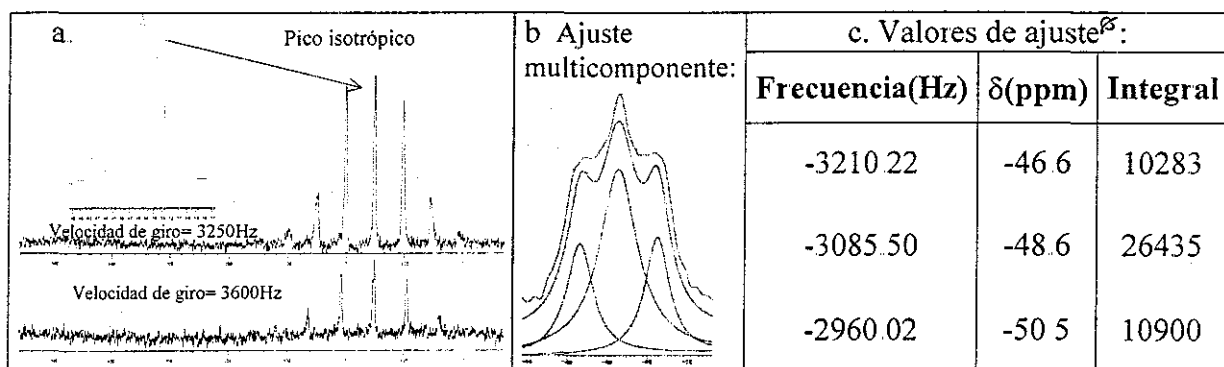


Figura 3.15. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd del compuesto $\text{Cd}(\text{AspH})\text{NO}_3$ y su ajuste matemático.

3.5.1.2. *Cd(Asp)*

Por otro lado, desafortunadamente, el espectro del compuesto derivado del óxido de cadmio y ácido aspártico, presenta una señal muy ancha e irregular. Posee un desplazamiento químico positivo, indicando coordinación de un átomo de nitrógeno. Es imposible observar el patrón de acoplamiento. Existen ejemplos en la literatura de ambientes nitrogenados alrededor del cadmio,²⁵ en que la amplitud de la señal dada en Hertz supera al valor de la constante de acoplamiento. En este caso es posible que la señal que se observa sea causada por la existencia de más de una especie en el polvo. Dados los resultados de análisis elemental (sección 2.1.1.5.), puede tratarse de residuos de CdO hidratado.

3.5.1.3. *Cd(Glu)*

Para este compuesto se observa un espectro en el cual se confirma la presencia de un enlace metal nitrógeno, ya que la señal se encuentra a un desplazamiento de 99.57 ppm referido a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ que implica la interacción con nitrógeno, ya vislumbrada por el

[Ⓕ] Valores registrados con CdCO_3 como referencia.

espectro de IR lejano. También se confirma esta interacción por el patrón de triplete no simétrico, que se presenta debido al acoplamiento entre el ^{111}Cd y un ^{14}N (ver Figura 3.16). La interacción cuadrupolar aparta al eje de cuantización del ^{14}N de la dirección del campo magnético aplicado y así el acoplamiento dipolar no se elimina completamente con la aplicación del giro en el ángulo mágico.²⁶ Los valores de J y S pueden calcularse a partir de la separación de las señales, dando por resultado $J=99.44\text{Hz}$ y $S=12\,43\text{Hz}$. Dado que el análisis elemental de este compuesto coincide con el de la estructura presente en la literatura¹⁸, se puede ver que además de la interacción con nitrógeno, la presencia de un quelato de 5 miembros y otro de 4 contribuirá al desplazamiento positivo, de acuerdo a lo planteado en los antecedentes.

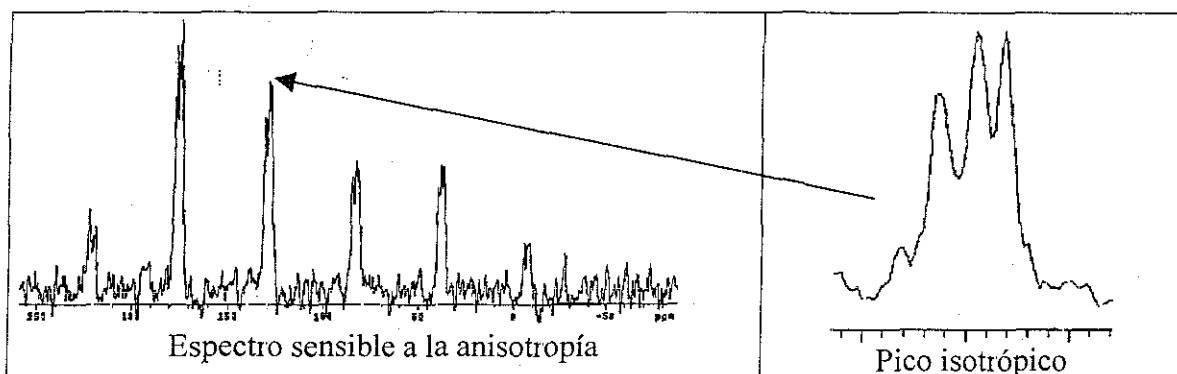


Figura 3.16. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd del compuesto $\text{Cd}(\text{Glu})$

3.5.2. CP/MAS de ^{13}C

La Tabla 3.6 muestra los desplazamientos químicos de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C en estado sólido tanto para los complejos aislados como para las formas ácida y monobásica del ligante.

El derivado de calcio presenta una marcada diferencia en el desplazamiento químico del carboxilo α así como en el $\text{CH}\alpha$ comparándolos con el ligante. Se puede proponer entonces que ese grupo carboxilo está más involucrado en la interacción con el ion calcio

Tabla 3.6. Desplazamientos químicos de ^{13}C en estado sólido para aspártico y sus derivados.

Núcleo	AspH ₂	NaAspH	Ca(AspH) ₂	Pb(AspH)NO ₃	Pb(Asp)	Cd(AspH)NO ₃	Cd(Asp)	Zn(AspH)NO ₃
COO α	176.32	174.24	177.39	176.51	188.34	174.56	180.67	179.16
CH	54.11	48.9	53.04	56.76	56.71	55.16	52.23	52.04
CH ₂	38.29	34.85	38.26	42.05	41.96	34.76	40.50	37.66
COO β	175.25	174.24	176.51	183.41	181.49	182.75	180.67	178.03

Mientras los valores de desplazamiento químico de los átomos de carbono alifáticos en los dos complejos de plomo son muy similares, aquellos correspondientes a los grupos carboxilato de Pb(asp) se desplazan significativamente a campos bajos lo cual sugiere una interacción cualitativamente diferente con los átomos de plomo. El carboxilo β de Pb(AspH)NO₃, al tener 3 enlaces a plomo, muestra un desplazamiento químico mucho mayor que el carboxilo α que únicamente presenta 2.

En el caso de los derivados de cadmio, Cd(Asp) por un lado, presenta una sola señal para los átomos de carbono de carboxilo, lo cual indica que los ambientes de ambos carboxilos son muy similares. Sin embargo, en el compuesto Cd(AspH)NO₃, cuya estructura se describió en 3.2.1.2, a pesar de que ambos grupos carboxilo se encuentren coordinados al ion metálico, se debe recordar que el carboxilo β se encuentra involucrado en el puente de hidrógeno más fuerte del cristal. Por otro lado, el otro oxígeno del carboxilo β , O1, presenta la interacción más fuerte con cadmio (la distancia de enlace más corta). Ambas interacciones pueden ser responsables de un valor mayor en el desplazamiento de la señal para el átomo de carbono del COO β .

Para el compuesto Cd(Asp), se observa un desplazamiento a bajo campo considerable de los carbonos alifáticos así como de los carboxilatos, lo cual sugiere la formación de un

anillo quelato de 6 miembros al coordinarse el grupo amino y el carboxilo β , en concordancia con lo observado en la resonancia de ^{111}Cd .

El derivado de Zn presenta apenas diferencia en las señales de carboxilos. $\text{COO}\alpha$ y CH presentan desplazamientos químicos equivalentes a los del derivado desprotonado de cadmio, mientras que CH_2 y $\text{COO}\beta$ presentan un menor desplazamiento, lo cual puede ser resultado de una mayor tendencia de iones más pequeños como es el Zn^{2+} a formar quelatos, respecto a todos los demás cationes divalentes. Se propone, entonces un quelato de 7 miembros en el que participan ambos carboxilatos

En cuanto a los derivados del ácido glutámico, aparentemente el glutamato de sodio cuenta con dos estructuras en su seno, que dan origen a la diferenciación de 3 de las señales (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Desplazamientos químicos de ^{13}C en estado sólido para glutámico y sus derivados.

Núcleo	GluH_2	NaGluH		$\text{Ca}(\text{GluH})_2$	$\text{Pb}(\text{Glu})$	$\text{Cd}(\text{Glu})$	$\text{Zn}(\text{Glu})$
$\text{COO}\alpha$	180.5	183.22	181.96	182.35	182.15	182.89	182.86
$\text{CH}\alpha$	54.98	56.15	55.1	53.89	51.57	51.06	50.82
$\text{CH}_2\beta$	26.11	28.64		30	23.45	28.24	28.62
$\text{CH}_2\gamma$	28.35	40.4	36.12	35.83	30.20	30.56	28.62
$\text{COO}\gamma$	178.6	177.193		178.46	175.73	181.99	181.6

El valor del desplazamiento del carboxilato α es muy similar en todos los compuestos estudiados, mientras que el $\text{COO}\gamma$ presenta en los casos de los derivados de Zn^{2+} y Cd^{2+} valores muy altos, similares a los del $\text{COO}\alpha$, probablemente debido a una coordinación análoga, mientras que en el compuesto de Pb^{2+} el $\text{COO}\gamma$ se encuentra mucho más protegido, así como el $\text{CH}_2\beta$. Probablemente esta diferencia sea causada por un estado de

quelatación que hace a la estructura más compacta y rígida, como se discutirá a continuación.

3.5.3. T_1 de 1H a partir de CP/MAS de ^{13}C

Para obtener información estructural del compuesto sintetizado a partir del óxido de plomo y ácido aspártico, se midió el tiempo de relajación T_1 de 1H observando el cambio en intensidad de los espectros de polarización cruzada de ^{13}C en sólidos, como función del tiempo de espera^{27,28} (ver sección 1.8.1). Como punto de partida se contaba con el compuesto $Pb(AspH)NO_3$ del cual se tiene estructura cristalina, discutida en la sección 3.2.1.2.

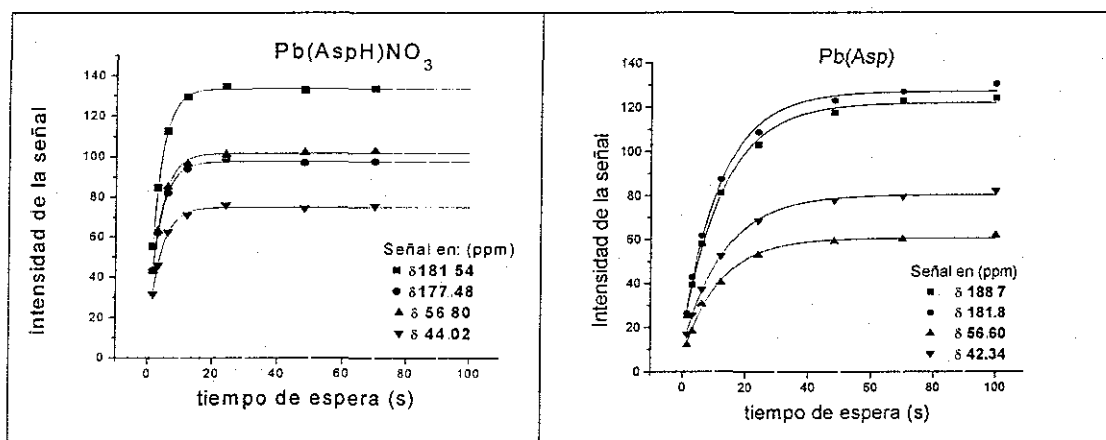


Figura 3.17. Efecto del tiempo de relajación en la intensidad de las señales de ^{13}C CP/MAS en los derivados de Aspártico con plomo.

Tabla 3.8. Valores de $\langle T_1 \rangle$ para los derivados de Aspártico y Glutámico con los cationes Pb^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}

L	Pb(LH)NO ₃	Pb(L)	Cd(LH)NO ₃	Cd(L)	Zn(LH)NO ₃	Zn(L)
Asp	3.60 ± 0.16	12.37 ± 0.68	4.07 ± 0.2	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.06 s	
Glu		21.99 ± 0.45		3.92 ± 0.32		4.38 ± 0.38

También se intentó obtener el tiempo de relajación en el aspartato de sodio, pero la intensidad de la señal se mantuvo constante desde el tiempo mínimo de espera que permite el aparato hasta 70s. Sólo podemos afirmar que el T_1 es menor de 1s.

Considerando lo observado para estos compuestos en conjunción con los estudios de IR se puede afirmar que en el compuesto PbAsp hay quelatación al unirse el átomo de nitrógeno del grupo NH_2 al Pb. En el caso de los derivados de cadmio, la composición del derivado del CdO, parece tener la interferencia del óxido amorfo sin reaccionar, de tal forma que se acelera la relajación. En el caso del derivado de Zn, como se ha visto a través de las constantes de estabilidad, la afinidad por los donadores de oxígeno es mínima, por lo que se generará un “complejo” tan poco ligado como la sal sódica.

En el caso de los derivados con glutámico, los valores de los complejos de Zn^{2+} y Cd^{2+} en que se encuentra identificada la presencia de interacción M-N por IR, los valores de tiempo de relajación resultan bajos, justificados por la presencia de moléculas de agua de hidratación, de acuerdo a lo que se presenta en la sección experimental 2.2.1.9 y 10. Entretanto, el complejo Pb(Glu) presenta un tiempo de relajación muy alto, de *ca* 22s, lo cual sugiere un empaquetamiento compacto y rígido.

3.6. Interacción con aminoácidos. Observaciones relevantes.

A través del trabajo realizado con los aminoácidos se logró identificar herramientas que podrían arrojar información estructural en los complejos con ligantes superiores: desde los que se desarrollan en disolución, como potenciometría y RMN, como los que se desarrollan en estado sólido: infrarrojo, RMN CP/MAS y cristalografía.

Se hizo evidente la versatilidad en modos de coordinación de los ligantes con los que se trabajaría a partir de entonces. Hasta este punto, la precipitación de los hidróxidos de los

metales representa un obstáculo en la capacidad de coordinación de los ligantes, pues el grupo amino requiere de un pH mayor que el de inicio de precipitación de los hidróxidos para su desprotonación, y para estar disponible como grupo donador.

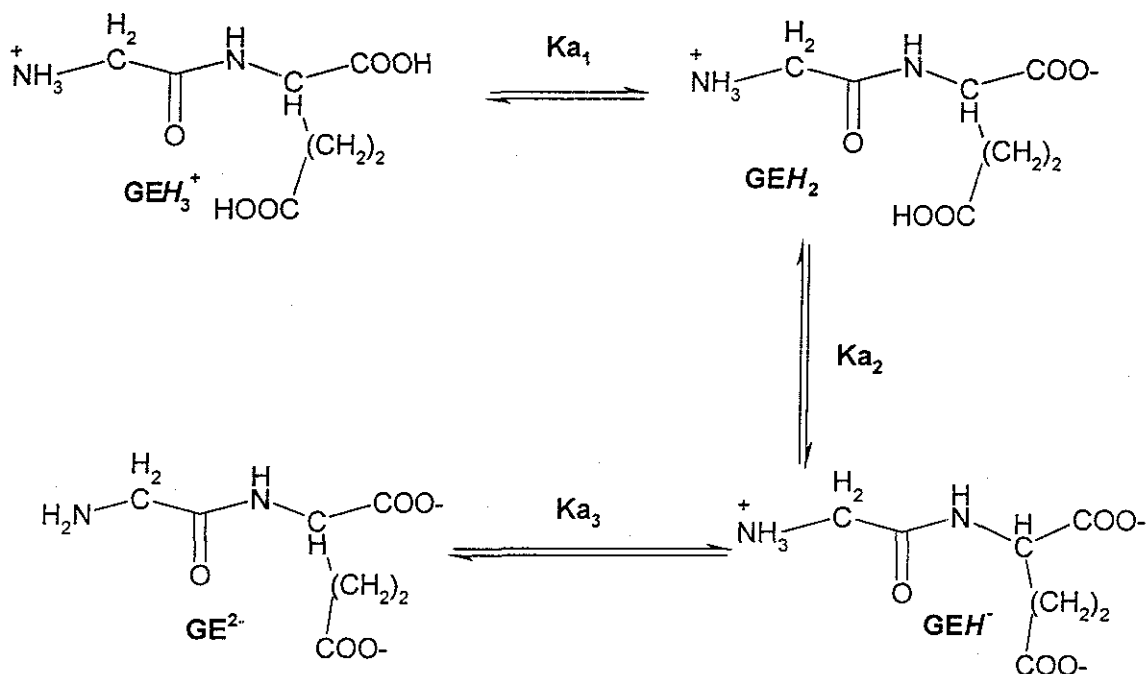
En este punto, el tamaño de los ligantes, y por lo tanto la separación que queda entre los grupos donadores, ya repercute en la diferenciación de afinidades, en la contribución de cada átomo donador a la estabilidad, y por supuesto a la estructura del complejo.

Interacción con Gly-Glu

La secuencia Gly-Glu (o GE) se encuentra en varios de los sitios de enlace a calcio de las proteínas EF. De 276 “horquillas” o lazos de enlace EF *canónicos* examinados -es decir secuencias con 12 aminoácidos- se han encontrado 165 variantes,¹ en éstas, el residuo glicina se conserva en un 89.1% de los casos como ocupante de la 6ª posición de la secuencia. Como siguiente residuo se puede encontrar al glutámico, si bien no en tantas secuencias, sí en un gran número de proteínas tipo S100 (como la calbindina), calmodulinas y troponinas, que por su parte, abarcan la gran mayoría de las proteínas de enlace a calcio.²

4.1. Estudios potenciométricos.

Las especies totalmente protonadas del ligante se designan como GEH_3^+ mientras que la totalmente desprotonada como GE^{2-} . Los valores de pKa 1, 2 y 3 obtenidos en este trabajo, 2.880(4), 4.450(4), y 8.373(2), concuerdan con los valores presentados con anterioridad en la literatura,³ correspondiendo a los equilibrios que se presentan en el siguiente esquema, y que posteriormente se confirmará con RMN (sección 4.2.1)



Las constantes mencionadas dan lugar diagrama de distribución de especies respecto al pH plasmado en la Figura 4.1.

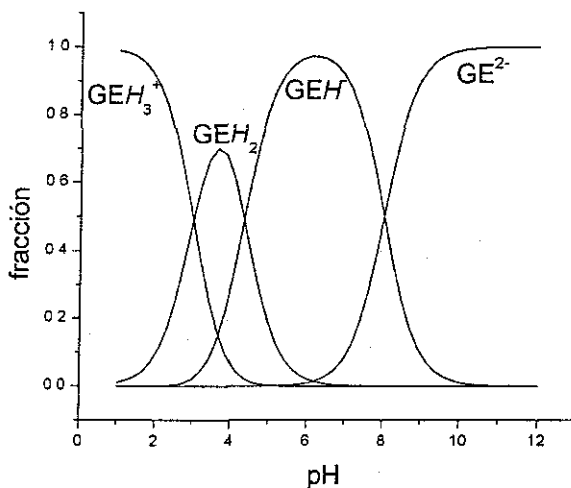


Figura 4.1. Diagrama de distribución de especies del ligante GE

Para la formación de los complejos metálicos, se hicieron estudios en condiciones estequiométricas 1:1 ($\pm 6\%$). Al proceder al cálculo de las constantes de formación, cuando se incluyó en los modelos la posibilidad de complejos 1:2, éstos fueron

eliminados por el programa y se consiguió un ajuste satisfactorio de los datos de pH con los modelos que sólo incluían a las especies MH_xL^x ($x=0-1$), es decir, los complejos 1:1. Como se explicó en los antecedentes y en el capítulo anterior, además de las constantes de formación global, se puede considerar a constantes que dan una idea discriminada de la interacción de los cationes metálicos con los átomos donadores, es decir: $\log K_{MLH}^{MLH}$ (o pKa del grupo amino en el complejo), $\log K_{M.LH}^{MLH}$ (o constante de formación del complejo con el grupo amino del ligante protonado), $\log K(N)$ (contribución de la interacción con el grupo amino a la estabilidad del complejo). Los valores de estas constantes se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Constantes de equilibrio calculadas de datos experimentales

Catión	$\log \beta_{101}$ ^(a)	$\log \beta_{111}$ ^(b)	$\log K_{MLH}^{MLH}$ ^(c)	$\log K_{M.LH}^{MLH}$ ^(d)	$\log K(N)$ ^(e)
Ca ²⁺	2.67(3)	10.57(4)	7.90	2.197(42)	-0.08
Pb ²⁺	3.89(2)	10.70(3)	6.81	2.327(32)	1.84
Zn ²⁺	3.98(2)	9.96(6)	5.98	1.587(62)	2.36
Cd ²⁺	3.426(7)	9.99(1)	6.564	1.617(12)	1.78

^(a) β_{101} : $GE^{2-} + M^{2+} \rightleftharpoons [MGE]$; ^(b) β_{111} : $GE^{2-} + H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(GEH)]^+$; ^(c) K_{MLH}^{MLH} : $[M(GEH)]^+ \rightleftharpoons [MGE] + H^+$; ^(d) $K_{M.LH}^{MLH}$: $M^{2+} + GEH \rightleftharpoons [M(GEH)]^+$; ^(e) $K(N)$: $[M(GEH)]^+ + GE^{2-} \rightleftharpoons [MGE] + GEH$

En el caso de estos sistemas, la presencia del ligante tampoco afecta apreciablemente al valor de pH de precipitación del hidróxido del metal (ver Figura 4.2). Sólo se analizaron los datos potenciométricos hasta una unidad de pH anterior a la aparición evidente de turbidez en el sistema.

Dado que $K_{M.LH}^{MLH}$ puede relacionarse con la afinidad de estos cationes hacia los donadores de oxígeno, se puede observar que tanto Ca²⁺ como Pb²⁺ exhiben una afinidad más alta hacia O que la que presentan Zn²⁺ y Cd²⁺. Para los últimos dos, las especies de mayor abundancia son aquellos derivados de la forma totalmente desprotonada del ligante. La

constante de formación más alta la presenta el Zn. Esto puede relacionarse directamente a la afinidad que estos cationes, Zn^{2+} y Cd^{2+} , muestran hacia N. Es de esperarse que para que se presente una interacción con el grupo amino, el catión debe ser susceptible de presentar traslape orbital, dado que el grupo amino no está cargado y la carga parcial sobre el átomo de nitrógeno no es suficiente para una interacción de tipo electrostático como la que es preferida por los cationes duros.

Es así que la acidez del grupo amonio terminal aumenta con la formación de los complejos de Zn y Cd, efecto observable en el diagrama de distribución de especies en la Figura 4.2, en que las especies desprotonadas del ligante aparecen a un valor de pH inferior al encontrarse coordinado al catión que en su forma libre, debido a que la interacción que se presenta entre el átomo de nitrógeno y el centro metálico es mayor que la que presenta el nitrógeno con el protón. Nuevamente, en condiciones de síntesis similares para este ligante, tal como sucedió con el ácido glutámico, con Zn^{2+} y con Cd^{2+} sólo se aíslan los derivados del ligante totalmente desprotonado, mientras que para el Pb el producto aislable e incluso cristizable, es el derivado del monoprotonado.

Sin embargo, es posible calcular la constante de formación de $Pb(GE)$, aunque esta especie está prácticamente ausente en la disolución en las concentraciones de trabajo (ver Figura 4.2); para aislar esta especie también fue necesario hacer una reacción heterogénea entre una suspensión de PbO y una disolución de GEH_2 (ver 2.2.2.3.). Paradójicamente, la reacción análoga entre CdO y disolución de GEH_2 dio como resultado el derivado monoprotonado en una proporción 1:2 (ver 2.2.2.5.). Los esfuerzos por aislar $MGEH^+$ de la disolución con Zn y con Cd resultaron en sólidos con cantidades no estequiométricas de moléculas de agua.

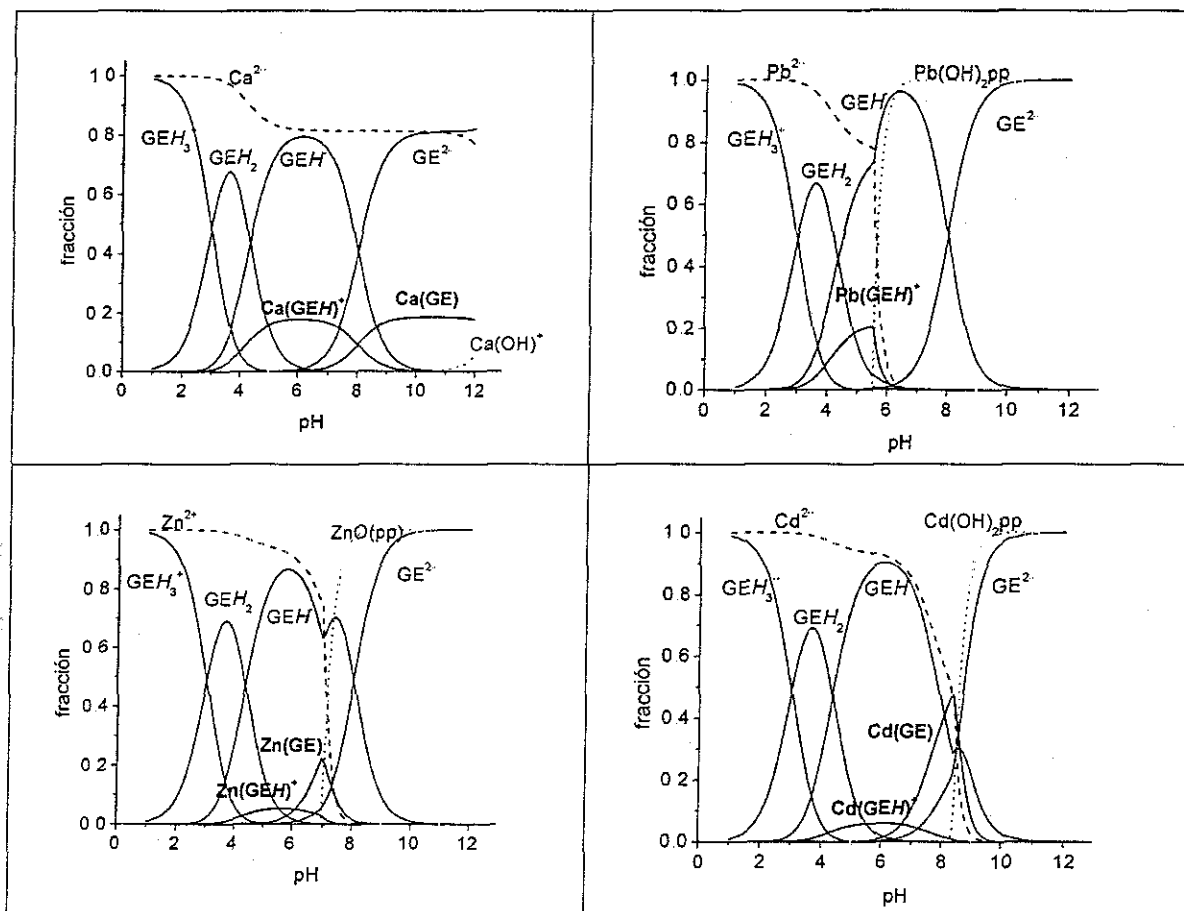


Figura 4.2. Diagrama de distribución de especies de los complejos

4.2. Resonancia Magnética Nuclear en disolución.

4.2.1. Espectros de RMN de ^1H pH variable.

Se desarrollaron titulaciones con NaOD para poder asignar los valores de pKa al grupo involucrado, seguidas por RMN de ^1H . Se muestran las variaciones en desplazamiento químico respecto al pH en la Figura 4.3, donde también se han resaltado los valores de pKa. Es entonces posible sugerir que el primer pKa (2.88) corresponde el grupo carboxílico α , seguido por el carboxílico γ (4.45), y finalmente el grupo amonio (8.373), que coincide con lo que se ilustró en el esquema presentado en la sección 4.1.1. Para observar el efecto del pH en el desplazamiento químico del protón del grupo amida del

péptido, se hizo el experimento en 20% D₂O/H₂O, incrementando el pH por la adición de NaOH acuoso. Este medio de reacción se utiliza para que, por un lado se logre fijar la señal de resonancia con el deuterio de D₂O, pero, por otro lado se mantenga una alta concentración de protones ¹H que en el intercambio con el protón unido al heteroátomo, mantengan una intensidad de señal observable en el espectro.

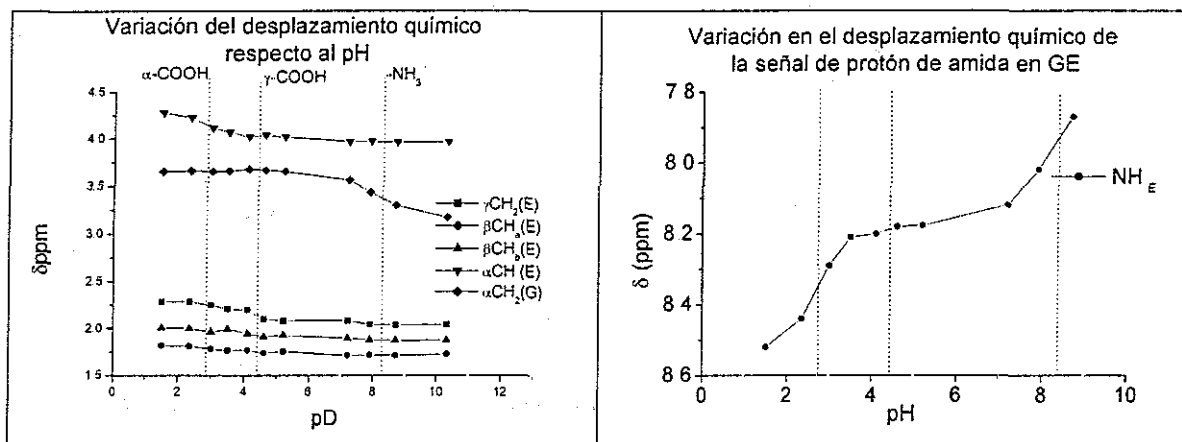


Figura 4.3. Titulaciones seguidas por RMN de ¹H

También se realizaron titulaciones de pH y pD en muestras 1:1 ligante:cación, esperando observar variaciones en los patrones de acoplamiento así como en los desplazamientos químicos, respecto a lo observado en el ligante libre. Esto no fue observado, probablemente debido a la escasa fracción de los complejos formada en el intervalo de pH previo a la precipitación de los hidróxidos (ver Figura 4.2), y también a la cinética sumamente rápida asociada a estos cationes.⁴

Como confirmación de esta situación, se hicieron espectros en disolución de ¹¹¹Cd en los valores de pH en que se predice por los diagramas de distribución de especies (Figura 4.2) que haya una mayor concentración de los complejos Cd(GEH)⁺ y Cd(GE) que de otras especies. No se observó una variación significativa en el desplazamiento químico.

4.2.2. Estudio conformacional mediante NOE diferencial.

Se hicieron estudios de NOE diferencial del dipéptido y sus derivados al pH de disolución del compuesto. En la Figura 4.4 se presentan los espectros de ^1H diferenciales, y se propone una estructura de acuerdo con el efecto en las intensidades de las otras señales en el caso de cada señal saturada, como la conformación presente mayoritariamente en la disolución.

A partir de los primeros espectros presentados (ligante libre y derivado de Pb), se puede observar que la información relevante respecto a los contactos existentes la darían las señales de los hidrógenos α tanto de glicina ($\delta \approx 3.7 \text{ ppm}$) como de glutámico ($\delta \approx 4.1 \text{ ppm}$), ya que es de esperarse que los hidrógenos β tengan interacción con los $\text{H}\gamma$ y viceversa. Por esto, de los compuestos con Ca^{2+} y Cd^{2+} se presentan únicamente los espectros de NOE diferencial al irradiar las señales de los $\text{H}\alpha$. El complejo de Zn^{2+} una vez formado resulta muy insoluble lo cual impide un espectro confiable, ya que la intensidad de las señales es muy baja, así que la repercusión de la irradiación sobre éstas en otras señales vecinas se torna imperceptible. El ligante libre se encuentra en condiciones de formar un anillo por efecto de puente de hidrógeno entre el grupo amonio de la glicina y el carboxilo y del glutámico. En el complejo de plomo se observa que en disolución, al romperse los enlaces que se observarían en la red cristalina a continuación, existe la posibilidad de la formación de un anillo quelato no muy favorecido por contar con 8 miembros.

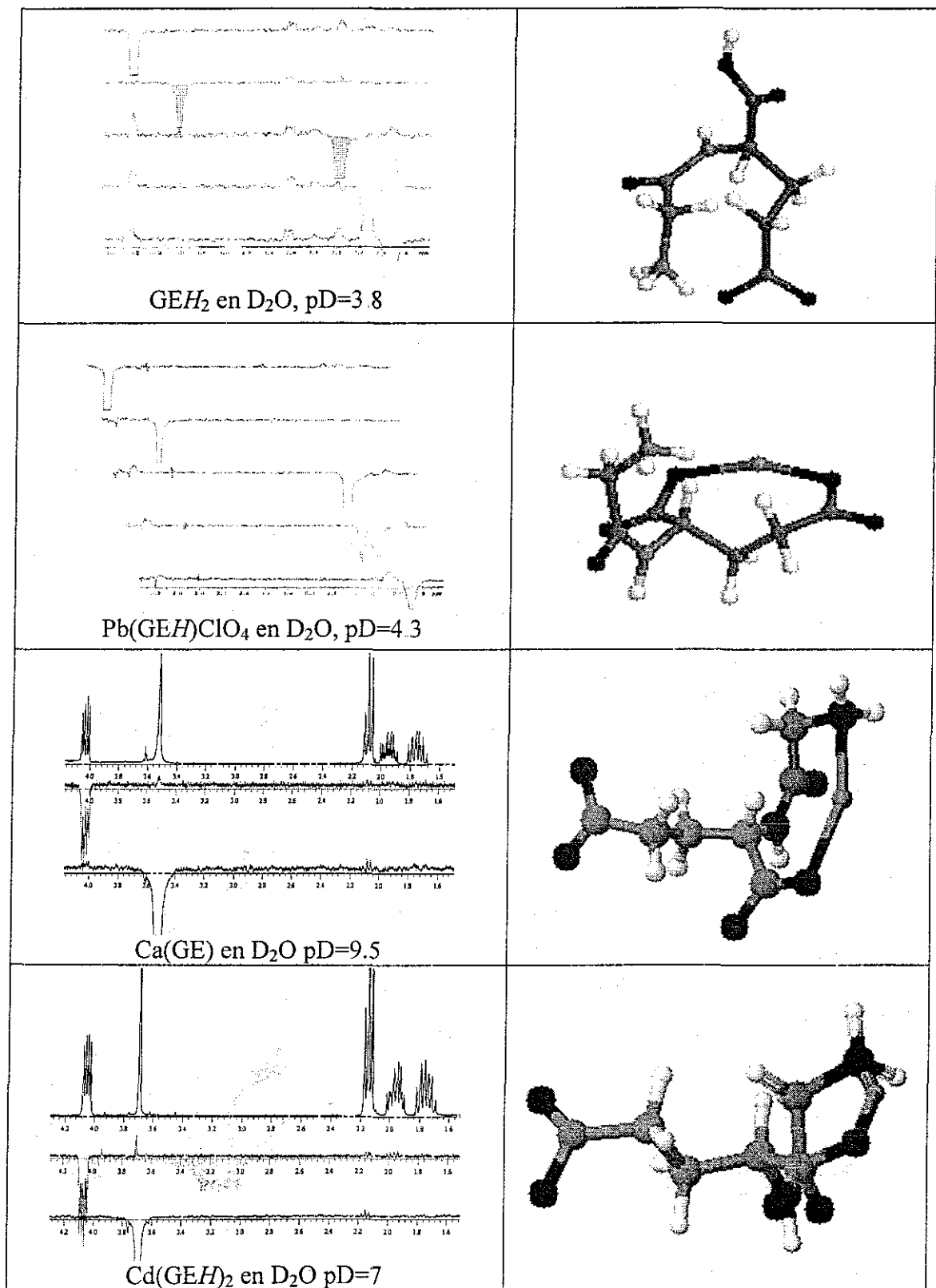


Figura 4.4. Espectros NOE diferencial y estructuras propuestas acorde a las interacciones observadas.

También es de 8 miembros el anillo que se logra formar con la presencia del ion calcio, en este caso, tratándose de un pH más elevado, el grupo amino puede participar, cerrándose el anillo con la participación del COO α del glutámico. De igual manera en el caso del cadmio, lo cual resulta sorprendente puesto que se está estudiando en disolución al compuesto caracterizado por cristalografía en estado sólido (se presentará a continuación en la sección 4.3.2). En el cristal su esfera de coordinación no incluye la formación de un anillo de 8 miembros como el que se puede deducir en este punto, sino que se completa con la participación de carboxilos provenientes de complejos de coordinación vecinos. Ciertamente, el proceso de disolución evita la cercanía de estos ligantes, y probablemente provoca la participación de grupos pertenecientes a una misma molécula de ligante, hasta el punto de provocar la desprotonación del grupo amino.

La baja intensidad en las señales relacionadas con la interacción a través del espacio se debe también a la baja afinidad en los complejos y a la labilidad de los cationes.

4.3. Cristalografía

Se presentan a continuación las estructuras de los complejos de *GEH* con plomo y con cadmio.

4.3.1. $Pb(GEH)ClO_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$

En el compuesto de plomo, el centro metálico se encuentra hexacoordinado: dos grupos carboxilo diferentes de ligantes equivalentes por simetría se enlazan al ion Pb, con el átomo O13 coordinado también a un plomo vecino, formando una red bidimensional con vectores de base [010] y [001]. Esta sub-estructura se basa entonces en anillos de 16 miembros que contienen dos iones Pb²⁺ y dos moléculas de ligante *GEH* (Figura 4.5).

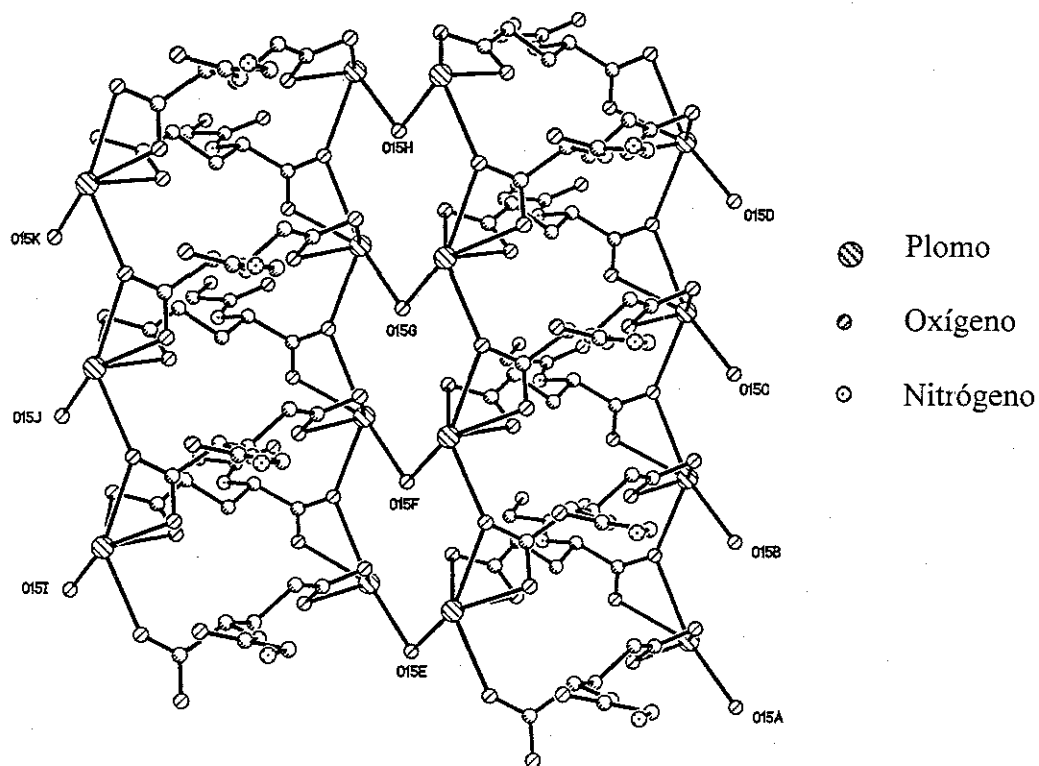


Figura 4.5. Polímero tridimensional $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Se ilustra la interacción de la molécula de agua O15, como puente entre dos iones plomo, y la interacción del oxígeno O3 ($\text{COO}\alpha$ de Glu) también como puente

La esfera de coordinación se completa con una molécula de agua (O15, ubicada en el eje binario del grupo espacial $C2$) que actúa como puente entre dos átomos de Pb relacionados por simetría y permite la formación de una estructura polimérica tridimensional como se muestra en la Figura 4.5. El entorno de coordinación resultante $[\text{PbO}_6]$ puede ser descrito como un prisma cuadrado (Figura 4.6), donde una arista está ocupada por el carboxilato (O10, O11).

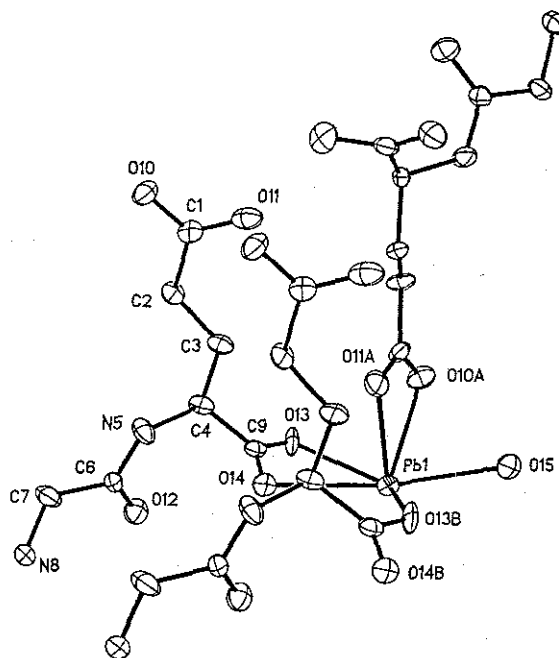


Figura 4.6: Entorno de coordinación del ion Pb^{2+} en $Pb(GEH)ClO_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$.

Elipsoides térmicos a un nivel de probabilidad de 50%. Los códigos de simetría usados para generar átomos equivalentes son los siguientes: A $3/2-x, -1/2+y, 1-z$; B $x, y-1, z$.

La distorsión de la geometría ideal se debe principalmente a los ángulos de mordida de los grupos carboxilato, $51.3(4)$ y $48.2(3)^\circ$, y a la longitud del enlace $Pb1-\mu O13$, $2.734(19)$

Å (ver Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Longitudes de enlace de coordinación (Å) y ángulos ($^\circ$) para el complejo $Pb(GEH)ClO_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$

Longitudes de enlace			
Pb1-O11A	2.451(6)	Pb1-O10A	2.571(8)
Pb1-O13B	2.576(19)	Pb1-O15	2.593(7)
Pb1-O14	2.657(8)	Pb1-O13	2.734(19)
Ángulos de enlace			
O11A-Pb1-O10A	51.3(4)	O11A-Pb1-O13B	77.2(6)
O10A-Pb1-O13B	118.0(3)	O11A-Pb1-O15	82.1(3)
O10A-Pb1-O15	69.6(3)	O13B-Pb1-O15	71.6(3)
O11A-Pb1-O14	78.8(3)	O10A-Pb1-O14	108.5(3)
O13B-Pb1-O14	89.5(3)	O15-Pb1-O14	155.7(2)
O11A-Pb1-O13	81.9(6)	O10A-Pb1-O13	74.2(3)
O13B-Pb1-O13	135.9(2)	O15-Pb1-O13	142.8(3)
O14-Pb1-O13	48.2(3)		

Transformaciones de simetría para generar átomos equivalentes: A $-x+3/2, y-1/2, -z+1$; B $x, y-1, z$

Esta geometría de coordinación se asemeja a la mencionada en el capítulo anterior^{7(a)} para el polímero $\text{Pb}(\text{AspH})\text{NO}_3$, es decir es hemidireccional. Es particularmente notable el amplio espacio disponible debajo del plano de la pirámide, donde probablemente se localiza el par libre esteroquímicamente activo del Pb^{2+} . Es decir, en este caso el átomo de Pb está 0.42 Å debajo de la base, mientras que en el derivado de aspártico este metal se encuentra a 0.13 Å encima de la base de la pirámide.

Tabla 4.3. Puentes de hidrógeno en $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$

D	H	A	Simetría de A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N5(peptídico)	H5A	O18(perclorato)	$x-1/2, y+1/2, z$	0.834	2.395	3.139	148.81
N8(amónio)	H8A	O19(perclorato)	$-x+3/2, y+3/2, -z$	0.890	2.172	2.996	153.66
N8(amónio)	H8A	O17(perclorato)	$-x+3/2, y+1/2, -z$	0.890	2.469	2.907	110.81
N8(amónio)	H8B	O12(peptídico)	$-x+3/2, y-1/2, -z$	0.890	2.037	2.913	167.97
N8(amónio)	H8C	O12(peptídico)	$-x+3/2, y+1/2, -z$	0.890	2.279	3.153	167.00
O15(agua)	H15A	O10(COOγGLU)	$x+1/2, y-3/2, z$	0.624	2.188	2.710	142.51

Donde $\text{H} \cdots \text{A} < (r+2)\text{Å}$ y $\text{D}-\text{H} \cdots \text{A} > 110^\circ$. D, átomo donador de H; A, átomo aceptor de H.

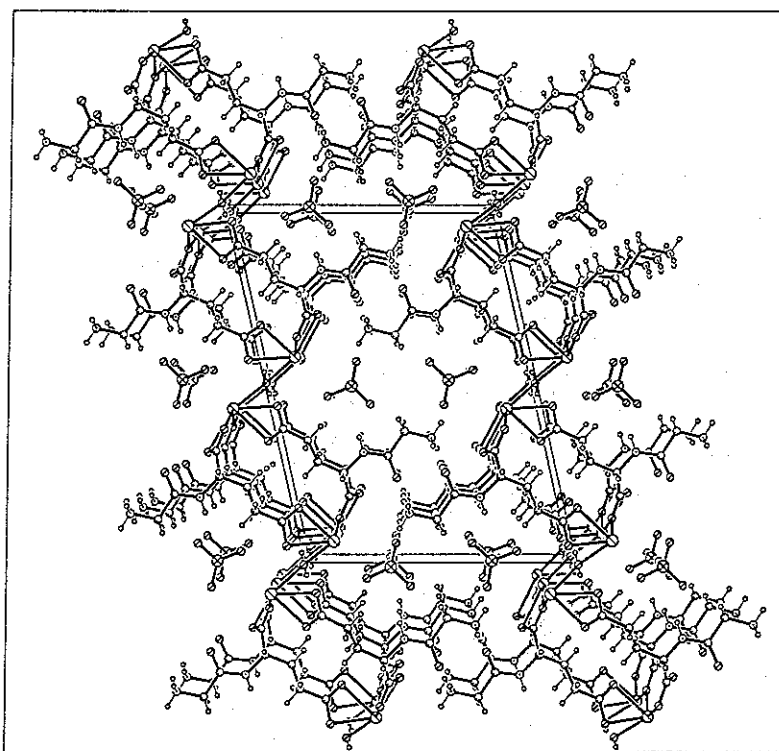


Figura 4.7. Arreglo tridimensional del polímero y ubicación de los iones perclorato.

El ion perclorato no participa en la construcción del polímero, sino que se aloja en los canales que se forman por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amonio y el carbonilo del enlace peptídico. También el ion perclorato participa en puentes de hidrógeno con el grupo amonio (Tabla 4.3).

4.3.2. $Cd(GEH)_2 \cdot 3H_2O$

El compuesto $Cd(GEH)_2$ presenta una estructura muy diferente debido a varias razones:

- i) la relación estequiométrica catión:ligante es 1:2, dadas las condiciones de síntesis (2.2.2.5) mientras que para el compuesto de plomo es de 1:1 (2.2.2.2).
- ii) a pesar de la presencia de moléculas de agua en el cristal, éstas no se coordinan al cadmio, como un reflejo de la diferencia en acidez de los centros metálicos
- iii) la naturaleza del catión es esencial, debido a la presencia de un par libre estéreoactivo en el ion $Pb(II)$, ausente en el ion $Cd(II)$.

En el compuesto de cadmio, cuatro ligantes GEH relacionados por simetría se enlazan al centro metálico siguiendo a los ejes en espiral 3_2 del grupo espacial trigonal. Dos ligantes se coordinan a través del carboxilato γ del residuo glutámico (O10, O11) y los otros dos a través del carboxilo α (O13, O14). La esfera de coordinación (ver Figura 4.8) puede describirse como un antiprisma cuadrado severamente distorsionado.

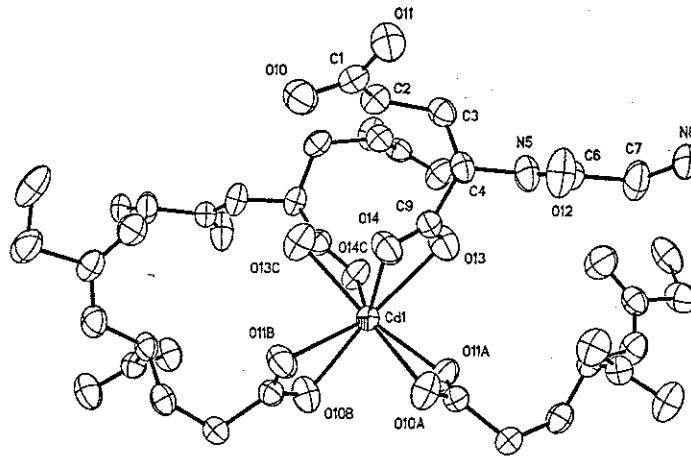


Figura 4.8: Entorno de coordinación para los átomos de Cd en Cd(GEH)₂.

Elipsoides térmicos a un nivel de probabilidad de 50%. Simetría para generar átomos equivalentes: A $1-x, 1-x+y, 5/3-z$; B $-y, -1+x-y, -1/3+z$; C $x-y, -y, 4/3-z$.

Tabla 4.4: Longitudes de enlace de coordinación (Å) y ángulos (°) para el complejo Cd(GEH)₂

Longitudes de enlace			
Cd1-O11A	2.351(2)	Cd1-O11B	2.351(2)
Cd1-O14C	2.416(2)	Cd1-O14	2.416(2)
Cd1-O13C	2.449(2)	Cd1-O13	2.449(2)
Cd1-O10B	2.491(2)	Cd1-O10A	2.491(2)
Ángulos de enlace			
O11A-Cd1-O11B	120.17(12)	O11A-Cd1-O14C	117.59(8)
O11B-Cd1-O14C	94.62(7)	O11A-Cd1-O14	94.62(7)
O11B-Cd1-O14	117.59(8)	O14C-Cd1-O14	113.94(11)
O11A-Cd1-O13C	82.54(8)	O11B-Cd1-O13C	148.15(7)
O14C-Cd1-O13C	53.66(6)	O14-Cd1-O13C	78.83(9)
O11A-Cd1-O13	148.15(7)	O11B-Cd1-O13	82.54(8)
O14C-Cd1-O13	78.83(9)	O14-Cd1-O13	53.66(6)
O13C-Cd1-O13	87.67(13)	O11A-Cd1-O10B	84.73(8)
O11B-Cd1-O10B	53.27(7)	O14C-Cd1-O10B	147.87(6)
O14-Cd1-O10B	84.66(8)	O13C-Cd1-O10B	158.20(7)
O13-Cd1-O10B	93.97(9)	O11A-Cd1-O10A	53.27(7)
O11B-Cd1-O10A	84.73(8)	O14C-Cd1-O10A	84.66(8)
O14-Cd1-O10A	147.87(6)	O13C-Cd1-O10A	93.97(9)
O13-Cd1-O10A	158.20(7)	O10B-Cd1-O10A	92.50(12)

Transformaciones de simetría para generar átomos equivalentes: A $-x+1, -x+y+1, -z+5/3$, B $-y, x-y-1, z-1/3$, C $x-y, -y, -z+4/3$

La distorsión se debe más a la restricción por los ángulos de mordida de los grupos carboxilato, 53.27(7) y 53.66(6)°, que a la disparidad en las distancias de enlace, ya que éstas abarcan un intervalo relativamente pequeño de 2.351(2) a 2.491(2) Å (Tabla 4.4).

En comparación al compuesto de plomo, para formar al polímero tridimensional, no se necesita que ninguno de los átomos de oxígeno de los carboxilatos o alguna molécula de agua actúen como puente μ -O, sino que la molécula de ligante, al enlazar sus carboxilatos a 2 diferentes iones cadmio, extiende la red polimérica en las tres direcciones en el espacio (Figura 4.9). Se presentan moléculas de agua desordenadas cerca del origen de la celda que llenan los huecos del polímero inorgánico, presentando puentes de hidrógeno con el nitrógeno peptídico el carboxilo y del residuo glutámico, y entre sí (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Puentes de hidrógeno en $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

D	H	A	Simetría para A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N5(peptídico)	H5A	O50(agua)	$y+1, x-1, -z+1$	0.860	2.210	3.023	157.61
N8(amonio)	H8A	O13(COO α)	$-x+1, -x+y, -z+2/3$	0.890	2.148	2.785	127.88
N8(amonio)	H8A	O14(COO α)	$-x+y+1, -x, z-2/3$	0.890	2.608	3.254	130.15
N8(amonio)	H8B	O10(COO γ)	$-x+y+1, -x, z-2/3$	0.890	2.071	2.722	129.25
N8(amonio)	H8C	O12(peptídico)	$y+1, x-1, -z+1$	0.890	2.121	2.969	159.16
O50(agua)	H50B	O12(peptídico)	$x-y, -y-1, -z+4/3$	0.850	1.983	2.833	179.27
O50(agua)	H50A	O11(COO γ)		0.851	1.996	2.847	178.83
O51(agua)	H51A	O50(agua)		0.850	1.744	2.594	178.61
O51(agua)	H51B	O51(agua)	$x-y, -y, -z+4/3$	0.850	1.764	2.613	177.33
O52(agua)	H52A	O52(agua)	$y+1, x-1, -z+1$	0.973	1.216	1.911	121.17
O52(agua)	H52B	O50(agua)		1.061	2.264	3.162	141.30

Donde H = A<(r+2)Å y D-H = A>110°. D, átomo donador de H; A, átomo aceptor de H.

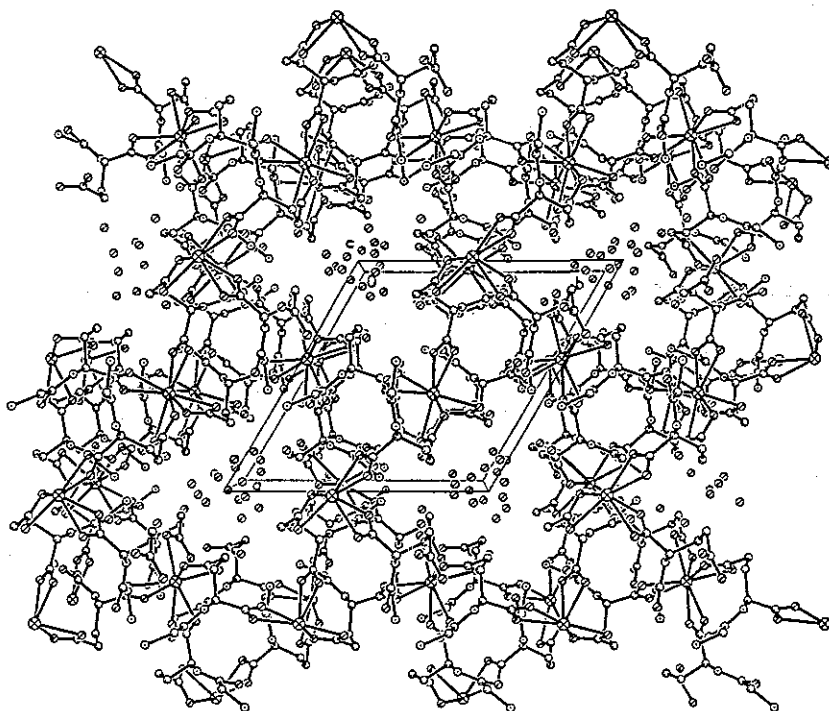


Figura 4.9: Estructura tridimensional de $\text{Cd}(\text{GEH})_2$ vista a lo largo del eje [001].

Se omiten átomos de H para claridad. Se muestran las moléculas de agua contenidas en la red

En ambos complejos, tanto el entorno de coordinación como la construcción de los polímeros es independiente de la intervención de la amina primaria -que se encuentra protonada- y del átomo de nitrógeno del grupo amida de GEH. Los arreglos tridimensionales que se observan se deben entonces, a la habilidad de coordinación de los dos grupos carboxilo en el ligante GEH que, apuntando a diferentes direcciones en el espacio, actúan como puente. Las estructuras resultantes son excepcionalmente compactas comparadas con otras en el campo de polímeros inorgánicos.⁵ Los índices calculados de empaquetamiento⁶ son respectivamente para el compuesto de plomo y el de cadmio de 77.9 y 75.5%.

4.4. Espectroscopia infrarroja

4.4.1. IR mediano

Como se esperaba, los espectros de IR de aquellos complejos que se sabía estaban formados por el péptido protonado (GEH) muestran el patrón correspondiente a un grupo amonio primario -en la región de $3000\text{-}2500\text{cm}^{-1}$ -, mientras que aquéllos de péptidos desprotonados (GE^{2-} : Pb(GE), Cd(GE) y Zn(GE)) muestran un patrón de 3 bandas de 3400 a 3000 cm^{-1} correspondientes al grupo NH_2 , contiguo a la asignada al grupo NH de amida, alrededor de 3350cm^{-1} . Todas estas bandas se desplazan con la deuteración aproximadamente 800cm^{-1} , coincidente con lo calculado al considerar la diferencia en masa reducida (μ) al cambiar H por D.

4.4.2. IR lejano

Los espectros de IR lejano registrados para los derivados de GE^{2-} presentan bandas importantes que sugieren una interacción M- NH_2R (ver Tabla 4.6) ya que estaban ausentes en los espectros de los derivados que contienen al grupo amonio según se constata en la estructura cristalina y las evidencias en espectros de IR mediano. En la muestra deuterada estas bandas se desplazan según lo esperado por el cambio en la masa reducida (μ). Estos valores resultan similares a nuestras observaciones anteriores ^{7(a)} (ver capítulo 3)

Tabla 4.6. Señales de IR asignadas a la interacción Metal-Amino

Compuesto	Muestra M- NH_2 original	esperado por deuteración	observado en la muestra deuterada M- ND_2
Pb(GE)	338.9 cm^{-1}	320.93 cm^{-1}	318.6 cm^{-1}
Cd(GE)	360.3 cm^{-1}	342.28 cm^{-1}	343.1 cm^{-1}
Zn(GE)	364.5 cm^{-1}	347.83 cm^{-1}	350.6 cm^{-1}

De nuevo, se hace evidente la interacción de tipo iónico en el derivado del calcio, dado que no se presenta ninguna banda importante en el espectro de IR-lejano de este compuesto.

4.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS

4.5.1. Espectros de RMN de ^{111}Cd CP/MAS

4.5.1.1. $\text{Cd}(\text{GE})$

De acuerdo a los factores que influyen en el desplazamiento químico del núcleo de ^{111}Cd , comentados en los antecedentes (1.8.2), se puede determinar el ambiente de coordinación del núcleo de Cadmio.

El compuesto CdGE tiene un desplazamiento químico isotrópico positivo con un valor de 92.83ppm referido a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ que indica coordinación de nitrógeno.⁸ Presenta un patrón de triplete no simétrico, debido al acoplamiento entre el ^{111}Cd y un ^{14}N (Figura 4.10-a).

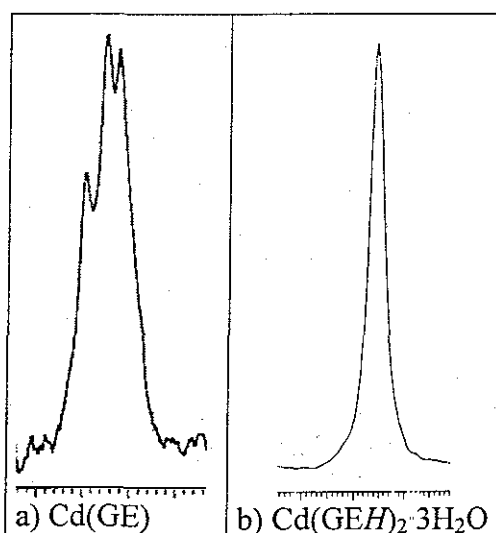


Figura 4.10. Espectro RMN CP/MAS de ^{111}Cd de los derivados de Glyglu

Como se comentó en el capítulo anterior, la interacción cuadrupolar aparta al eje de cuantización del ^{14}N de la dirección del campo magnético aplicado y así el acoplamiento dipolar no se elimina completamente con la aplicación del giro en el ángulo mágico.⁹ Los valores de J y S pueden calcularse a partir de la separación de las señales, dando por resultado $J=110.66\text{Hz}$ y $S=26.08\text{Hz}$.

4.5.1.2. $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Por otro lado, en el espectro CP/MAS de ^{111}Cd del compuesto $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se observa una sola señal con un desplazamiento químico de -66.89ppm (Figura 4.10-b). Esto es coherente con una esfera de coordinación formada únicamente por donadores de oxígeno. De la difracción de rayos X puede verse que este compuesto tiene 8 átomos de oxígeno que forman anillos de cuatro miembros. Dado este ambiente (8O), se esperaría un mayor incremento en la protección del núcleo, pero debido a la formación de los anillos quelatos de 4 miembros, el valor observado no es tan negativo como otros complejos 8O, por ejemplo, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ presenta un desplazamiento $\delta = -100\text{ppm}$ ⁸.

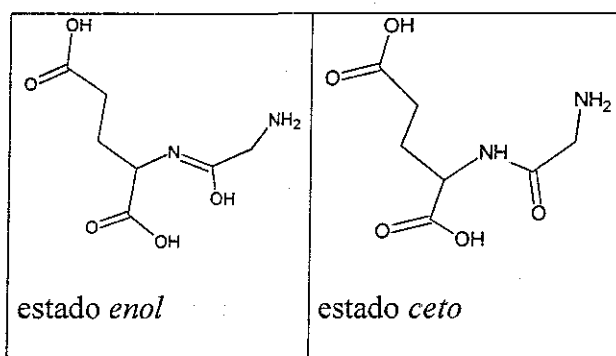
4.5.2 Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS

En la Tabla 4.7, se presentan los desplazamientos químicos de los espectros de ^{13}C de GEH_2 y los complejos aislados de éste con los cationes de estudio. El espectro del ligante libre en estado sólido contiene prácticamente el doble de señales a las esperadas, es decir 13 en lugar de 7. Esto posiblemente puede atribuirse a la presencia de dos especies tautoméricas ceto-enol, los que se esquematizan en la Figura 4.11

Tabla 4.7. ^{13}C CP/MAS NMR $\delta(\text{ppm})$ de GlyGluH₂ y sus derivados

Núcleo	GEH ₂ Ligante libre		CaGEHCl (I)	Pb(GEH)ClO ₄ (II)	PbGE (III)	Cd(GE) (IV)	Cd(GEH) ₂ (V)	ZnGE (VI)
CH _{2G} α	40.8	38.7	42.5	40.8	42.9	41.2	43.1	41.1
CO _G	171.0	167.0	168.9	165.4	174.2	175.4	169.2	174.4
CH _E α	55.1	56.3	56.4	54.0	57.2	57.4	54.9	56.4
COO α _E	176.7	180.2	181.9 ^a	182.5	183.0	183.4	184.1	183.7
CH _{2E} β	25.1	28.0	34.0 ^a	29.8	25.7	30.5	34.0	29.7
CH _{2E} γ	29.2	33.1	34.0 ^a	34.9	37.4 ^d	32.3	34.0	31.4
COO γ _E	176.7	179.3	181.9 ^a	181.4	179.9 ^d	182.4	179.8	180.2

^a= señal ancha; ^d= señal dobleteada

Figura 4.11. Esquema de las especies tautoméricas correspondientes al GlyGluH₂

Pueden encontrarse dos grupos de compuestos (ver Tabla 4.7), uno en que la señal del carbonilo del grupo amida aparece a desplazamientos químicos mayores a 170ppm que corresponde a los compuestos en los que el ligante se encuentra totalmente desprotonado, mientras que los derivados del ligante monoprotonado presentan esta señal en desplazamientos con valores menores a 170ppm. Todos ellos presentan una sola señal en esta área que corresponde a la señal más pequeña en el espectro. Debido a la presencia del metal, el ligante se fija y así presenta una única estructura tautomérica.

Nuevamente, dado que la formación de los complejos de coordinación afecta el proceso de relajación de la molécula, se llevaron a cabo experimentos para medir tiempos de relajación de $^1\text{H} \langle T_1 \rangle$ a través de la observación del cambio en la intensidad de las

señales de los espectros de polarización cruzada de ^{13}C en estado sólido, en función del tiempo de espera antes de adquirir un siguiente espectro^{10,11} (Figura 4.12), y se relacionan los tiempos de relajación de los compuestos con el grado de flexibilidad de las partes de la molécula que contienen protones.

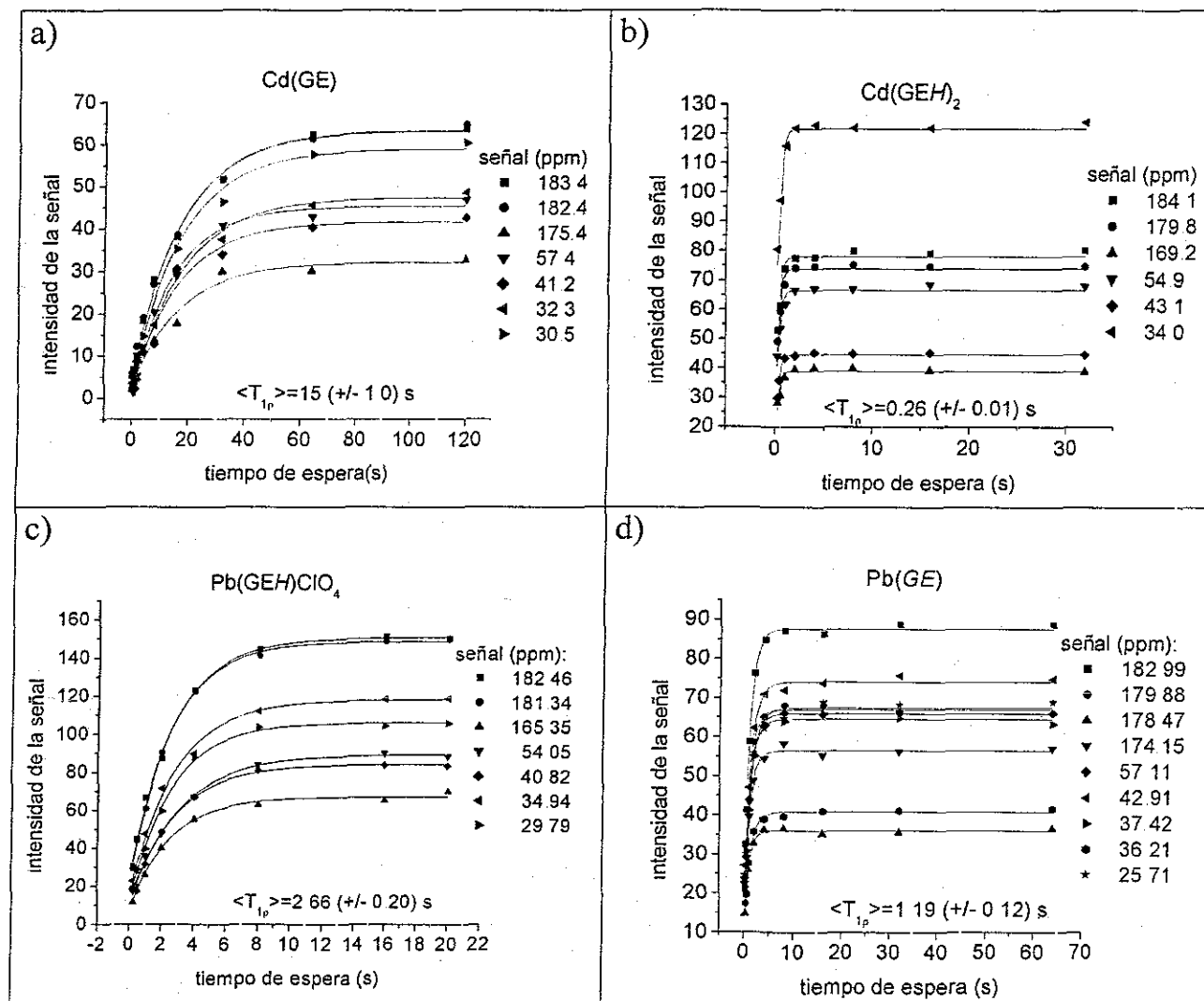


Figura 4.12. Efecto del tiempo de relajación en la intensidad de las señales de ^{13}C CP/MAS.

Para los complejos de cadmio la diferencia entre los tiempos de relajación de ^1H en ambos compuestos es muy elocuente (ver Figura 4.12a) y b)). Para el Cd(GE) que de acuerdo con lo observado por IR lejano se supone, consta de anillos quelato incluyendo a

la interacción metal-amino, el tiempo de relajación es de ^1H $\langle T_1 \rangle = 15 \pm 1\text{s}$, mientras el compuesto $\text{Cd}(\text{GEH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, presenta un $\langle T_1 \rangle$ menor a 1s (de $0.26 \pm 0.01\text{s}$). Para este último compuesto el análisis por difracción de Rayos X (4.3.2) muestra que además de que el ligante actúa como un puente, también se cuenta con moléculas de agua con alto grado de libertad que son capaces de ayudar el proceso de relajación. Los valores por debajo de un segundo están más allá del límite de nuestras determinaciones debido a los poca cantidad de datos colectables en este intervalo.

Para ambas formas del ligante, los tiempos de relajación son también menores de 1s, así como para el complejo de calcio donde se espera una interacción principalmente iónica y bastante débil, lo cual deja al ligante en libertad para lograr una relajación rápida.

Se encontró un resultado un tanto sorprendente en el caso de los derivados de plomo (ver Figura 4.12c-d): para $\text{Pb}(\text{GEH})\text{ClO}_4$ se obtuvo un valor de $2.66 \pm 0.20\text{s}$, mientras que para el complejo $\text{Pb}(\text{GE})$, el valor fue $1.19 \pm 0.12\text{s}$. La espectroscopia de IR lejano sugiere también para este compuesto la formación de un quelato, ya que se observa la coordinación del grupo amino (4.4.2). Por otro lado, este complejo muestra desdoblamiento en las señales en los núcleos ^{13}C que pertenecen a los átomos del carbono β y γ del residuo ácido glutámico. Para comprender la causa del bajo valor de $\langle T_1 \rangle$ en este compuesto que se suponía que mantendría al ligante en una forma más fija, se realizó un estudio de difracción de rayos X de polvo a todos los compuestos. Para todos ellos se encontró un alto grado de cristalinidad, mientras que en el compuesto $\text{Pb}(\text{GE})$ se aprecia una notable cantidad de material amorfo. Esto también es congruente con la presencia de óxido de plomo en este producto, reflejada en el análisis elemental (sección 2.2.2.3).

El experimento para la determinación de $\langle T_1 \rangle$ también se llevó a cabo para Zn(GE) con el objetivo de completar los datos, pero, dado que el derivado del ligante protonado no fue aislado, no hay ningún dato con el cual comparar. No hemos encontrado información respecto a la viabilidad de comparar este parámetro entre los complejos con centros metálicos diferentes. El valor obtenido es $\langle T_1 \rangle = 4.62 \pm 0.22$ segundos.

4.6. Interacción de Gly-Glu con los cationes en estudio. Observaciones relevantes.

La afinidad del dipéptido protonado hacia el calcio es notable si se compara con los otros cationes. Esto resulta raro tanto para donadores de oxígenos mono como bidentados.¹² En este estado de protonación, el ligante puede actuar, a lo sumo, como un donador O,O. Para los otros cationes refleja la tendencia ya descrita por Martin¹³ (ver 1.4.3), donde un donador de O,O presenta una mayor afinidad hacia el plomo, seguido por el zinc y finalmente por el cadmio. La afinidad de un ligante monodentado donador de oxígeno se hace manifiesta con la coordinación de moléculas de agua en la estructura cristalina del derivado de plomo. Esto confirma la hipótesis hecha a partir del trabajo con los aminoácidos (3.1) de que la contribución más importante a la estabilidad de los complejos de Pb^{2+} y de Ca^{2+} sería aportada por la interacción con los grupos carboxilo. Cuando el ligante pierde el protón del grupo amonio y puede comportarse como donador O,N, la tendencia mostrada en las constantes de formación es la esperada para este tipo de ligantes $\log\beta_{Zn} > \log\beta_{Pb} > \log\beta_{Cd} \gg \log\beta_{Ca}$. La afinidad más alta de Cd^{2+} y Zn^{2+} hacia nitrógeno que hacia oxígeno se refleja en los compuestos aislables y en las constantes de formación, lo cual puede relacionarse con el concepto de Pearson¹⁴ de los ácidos y bases.

duros y blandos, y confirma otra hipótesis generada a partir del trabajo con aminoácidos de que sería más sencillo aislar compuestos de coordinación en los que el grupo amino se encuentre desprotonado como derivados de Cd^{2+} y de Zn^{2+} .

Interacción con Asp-Gly-Glu y Asp-Gly-Glu-amida

La secuencia Asp-Gly-Glu (o DGE) se puede encontrar únicamente en 3 sitios de enlace a calcio de las proteínas EF ocupando las posiciones 5, 6 y 7 del dodecapéptido: en el sitio II de la Calbindina D_{9K}, y en otras dos proteínas de tipo S100. Sin embargo, la presencia del aminoácido Aspártico como 5º residuo en la secuencia del sitio de enlace a Ca²⁺, precediendo a glicina es muy constante (en 56% de las variantes).¹ Como se comentó en el capítulo anterior, la posición del residuo glicina (6º residuo de la secuencia) se conserva en un 89.1% de los sitios. La ocurrencia del glutámico en la 7ª posición, sin embargo, no es generalizada, sólo se presenta en un 6% de los casos²

Debido a que estos 3 aminoácidos son los que con más frecuencia componen la secuencia de enlace a Ca²⁺ en posiciones variadas (Asp, 25%, Gly13.3%, Glu13.3%), a que se encuentran juntos en el sitio II de la Calbindina, y a que son capaces de aportar oxígenos como átomos donadores, tanto de los carbonilos provenientes de la cadena peptídica como por parte de los carboxilos de cadena lateral, Asp-Gly-Glu resultó ser un oligopéptido muy interesante como siguiente paso en la modelación. También se utilizó la variante en la que el carboxilo terminal se encuentra amidado ya que inmerso en las

secuencias, ese carboxilo es en realidad carbonilo de amida, con lo que se esperaba ser más fiel a las condiciones originales del sistema a modelarse.

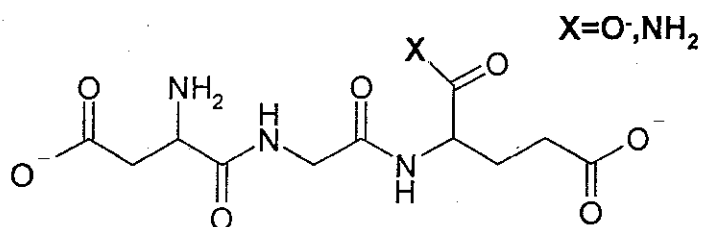


Figura 5.1. Esquema de la estructura de los tripéptidos DGE y DGEa

5.1. Estudios potenciométricos.

Las especies totalmente protonadas del ligante Asp-Gly-Glu se designan como $DGEH_5^+$ mientras que la totalmente desprotonada como DGE^{4-} . Los valores de pKa obtenidos en este trabajo son 2.52(7), 3.5(7), 4.61(6), 8.24(5) y 11.82(3). Para el péptido con el carboxilo terminal amidado, Asp-Gly-Glu-amida, sus especies serán designadas como $DGEaH_4^+$ la totalmente protonada y $DGEa^{3-}$ la completamente desprotonada. Los valores de pKa obtenidos para este ligante son de 2.98(4), 4.4(3), 8.11(1), 12.21(1).

Es notable que se lograra determinar un valor de pKa tan alto como el último que se presenta para ambos ligantes. Este valor se atribuye a la acidez del grupo amido de la glicina (enlace peptídico con el aspártico), por ser el grupo amido que presenta un valor menor de pKa calculado para la formación del anión según el software de ACDlabs (ver anexo 2) y como posteriormente se analizará, porque la señal de ese protón desaparece a un pH no muy elevado (>8) en la titulación seguida por RMN. Así, la asignación completa se discute en la sección 5.2.1

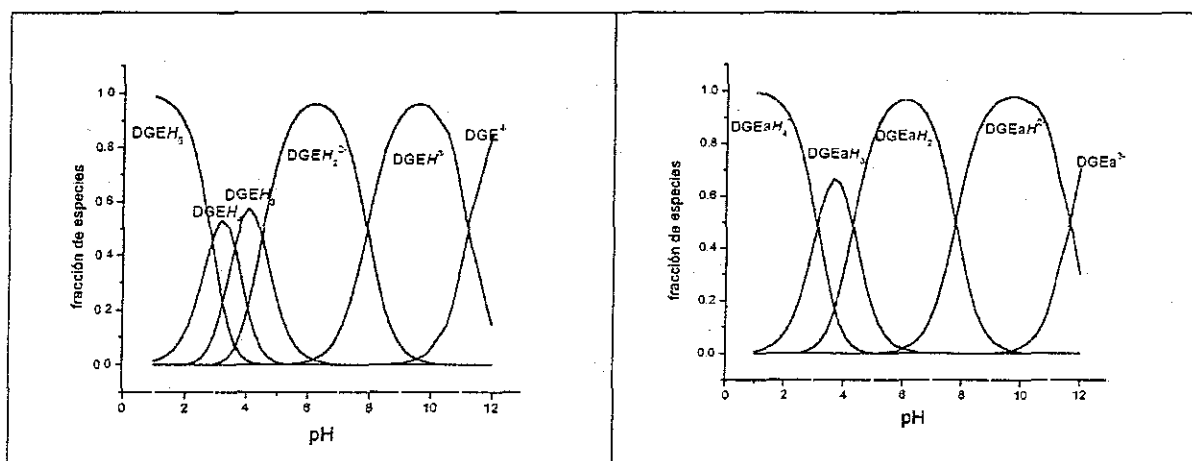


Figura 5.2. Diagrama de distribución de especies de los tripéptidos

Para la formación de los complejos metálicos, se hicieron estudios en condiciones de estequiometría 1:1. El ajuste satisfactorio de los datos de pH se consiguió con los modelos que sólo incluían a las especies MH_xDGE^{x-2} y MH_xDGEa^{x-1} ($x=0-3$), es decir, los complejos 1:1, aún cuando se incluyó en el modelo la posibilidad de la formación de complejos 1:2. En un experimento en el que se tuvo un exceso de Zn de 25% se obtuvieron constantes para Zn_2DGE ($\beta=14.8$) y Zn_2HDGE^+ ($\beta=20.91$) que en condiciones de estequiometría 1:1 no se presentan.

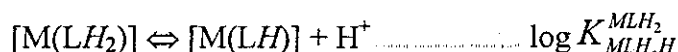
Tabla 5.1. Constantes de formación acumulativas para DGE^+ y $DGEa^3-$

Ligante	DGE^+				$DGEa^3-$			
	$\log\beta_{101}$ ^(a)	$\log\beta_{111}$ ^(b)	$\log\beta_{121}$ ^(c)	$\log\beta_{131}$ ^(d)	$\log\beta_{101}$ ^(e)	$\log\beta_{111}$ ^(f)	$\log\beta_{121}$ ^(g)	$\log\beta_{131}$ ^(h)
Ca^{2+}	5.1 (1)	15.32 (9)	22.6 (1)	27.1 (1)	6.1 (1)	16.7 (1)	24.17 (6)	28.25 (4)
Pb^{2+}	9.13 (8)	17.18 (4)	23.51 (3)	27.46 (2)	8.81 (8)	16.48 (4)	22.53 (5)	
Zn^{2+}	8.59 (4)	16.47 (3)	22.19 (6)		8.98 (2)	17.08 (4)	23.46 (3)	27.50 (3)
Cd^{2+}	7.2 (1)	16.58 (3)	23.41 (2)	27.52 (2)	6.31 (4)	15.87 (4)	22.75 (5)	27.04 (4)

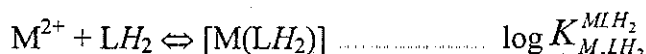
^(a) β_{101} : $DGE^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [MDGE]^{2+}$ (con el grupo amido desprotonado); ^(b) β_{111} : $DGE^+ + H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEH)]^+$; ^(c) β_{121} : $DGE^+ + 2H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEH_2)]^+$; ^(d) β_{131} : $DGE^+ + 3H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEH_3)]^+$; ^(e) β_{101} : $DGEa^{3-} + M^{2+} \rightleftharpoons [MDGEa]^-$ (con el grupo amido desprotonado); ^(f) β_{111} : $DGEa^{3-} + H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEaH)]$; ^(g) β_{121} : $DGEa^{3-} + 2H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEaH_2)]^+$; ^(h) β_{131} : $DGEa^{3-} + 3H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DGEaH_3)]^{2+}$.

Tampoco estos ligantes logran afectar apreciablemente el valor de pH de precipitación del hidróxido del catión (ver Figura 5.4 y Figura 5.5). Los datos potenciométricos se analizaron únicamente hasta una unidad de pH anterior a la aparición evidente de turbidez en el sistema, sin embargo los diagramas de distribución de especies contemplan las constantes de formación de los hidróxidos insolubles.

Dado que el pKa más alto se atribuye al grupo amido, el valor del pKa del grupo amino en el complejo ($\log K_{MLH,H}^{MLH_2}$) se calcula, en estos casos, tanto para DGE como para DGEa, como la diferencia entre $\log \beta_{121}$ y $\log \beta_{111}$.



Así mismo, es $\log K_{M,LH_2}^{MLH_2}$ la constante que puede relacionarse con la afinidad de estos cationes hacia los donadores de oxígeno, que por lo tanto se calcula como la diferencia $\log \beta_{121} - \log \beta_{021}$, representado por la ecuación:



En la Figura 5.3 los valores de la afinidad hacia los donadores de oxígeno de cada ligante por parte de los cationes se denotan como $\log K(O)$.

Por su parte, la participación del nitrógeno de amina en la formación del complejo ($\log K(N)$) puede cuantificarse por la diferencia entre los valores de la constante de formación del complejo con el grupo amino desprotonado ($\log \beta_{111}$) y la constante de formación del complejo con el grupo amino protonado, es decir $K_{M,LH_2}^{MLH_2}$.

Los valores de estas constantes se presentan en la

Tabla 5.2 y en la Figura 5.3 se muestra una gráfica con los valores de las contribuciones a la constante de formación discriminadas por átomos donadores. La contribución de los

átomos donadores a la afinidad con los cationes no sigue el comportamiento de los ligantes estudiados en los capítulos anteriores.

Tabla 5.2. Constantes calculadas para discriminar la interacción con los átomos donadores.

Ligante	DGE ⁺			DGEa ³⁻		
	log K ^{MLH₂_{M,LH,H}}	log K ^{MLH₂_{M,LH₂}}	log K(N)	log K ^{MLH₂_{MLH,H}}	Log K ^{MLH₂_{M,LH₂}}	log K(N)
Ca ²⁺	7.28	2.54(6)	0.96	7.47	3.85(7)	0.65
Pb ²⁺	6.33	3.45(8)	1.91	6.05	2.21(6)	2.06
Zn ²⁺	5.72	2.13(11)	2.52	6.38	3.14(4)	1.73
Cd ²⁺	6.83	3.35(7)	1.41	6.88	2.43(6)	1.23

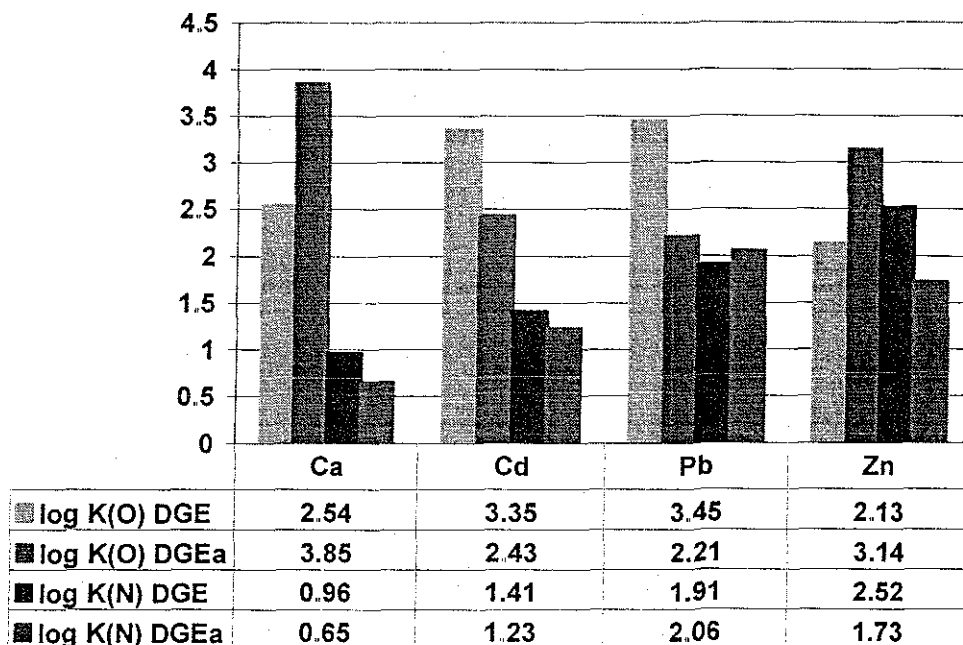


Figura 5.3. Contribución de los átomos donadores a la estabilidad de los complejos

Al parecer la contribución del nitrógeno a la afinidad de los cationes por el ligante no está influido por la disponibilidad del carboxilo terminal, excepto en el caso del zinc, ya que para Ca²⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺, los valores de log K(N) son similares con ambos tripéptidos, es decir, independientemente de la presencia de un grupo carboxilo o amida en la posición α

del glutámico. Esto puede ser un reflejo de la participación de la cadena peptídica en la coordinación al catión.

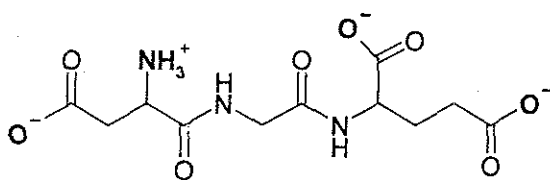
Sin embargo, en la afinidad por los donadores por oxígeno es posible observar una gran diferencia provocada por la sustitución del grupo α -carboxilo del glutámico por un grupo amido. Tanto en el caso de calcio como en el caso del zinc, la estabilidad del complejo se incrementa con la presencia del grupo amido. Esto denotaría la presencia de una interacción poco electrostática con este grupo, ya que a pesar de no ser ionizable, debe recordarse que puede considerarse como portador de una carga de -0.38 mientras que un carboxilato aporta una carga de -1.0 .³ Como se discutió en los antecedentes esto permite la interacción del calcio -más favorecida- con un entorno de coordinación de carga con un valor más cercano al necesario para la neutralización (-3.14) que en el caso del tripéptido con terminal carboxílica (-3.76) -únicamente tomando en cuenta a los donadores por oxígeno-, que a su vez minimiza repulsiones entre los grupos cargados negativamente.

En el caso del Zn^{2+} el comportamiento con DGEa resulta sumamente sorprendente, pues mientras que la contribución a la afinidad por parte de la interacción con nitrógeno llega a ser más baja respecto a la que presenta el Pb^{2+} con el mismo ligante y que la propia con el ligante DGE, la contribución por la interacción con oxígenos resulta más elevada. Podría ser que el efecto del equilibrio de cargas actúe también en este caso, probablemente por su tamaño reducido.

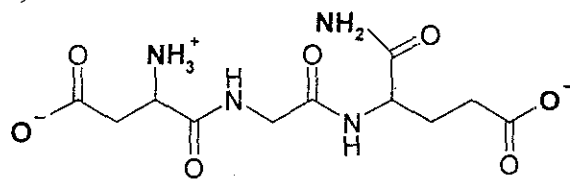
Se observa en la Figura 5.3 que todos los cationes presentan una mayor afinidad por oxígeno que por nitrógeno, probablemente debido a la cantidad de grupos donadores por oxígeno disponibles, es decir de 3 carboxilos y 2 carbonilos en el caso de DGE y 2 carboxilos y 3 carbonilos en DGEa; en tanto que sólo hay un grupo amino en los ligantes.

Es notable la versatilidad de coordinación en estos ligantes, al presentarse un efecto “complementario” entre el derivado amidado y el de carboxilo terminal. Zn^{2+} y Ca^{2+} tienen una afinidad notablemente mayor por el ligante DGEa cuando el grupo amino se encuentra protonado ($DGEaH_2^+$), mientras que Pb^{2+} y Cd^{2+} por el $DGEH_2^{2-}$. Este hecho provoca que se considere la posibilidad de que cada complejo presente una conformación y denticidad muy diversa. A continuación se esquematizan los ligantes con el grupo amino protonado

a) $DGEH_2^{2-}$



b) $DGEaH_2^+$



Observando los diagramas de distribución de especies que resultan de los valores de constantes de equilibrio determinadas, ilustradas en la Figura 5.4 y la Figura 5.5, se puede ver que la distribución de los complejos que involucran a los ligantes con amino protonado, es decir, cuya interacción es mediante donadores de oxígeno, tienen la misma distribución que el ligante libre (las especies presentan el máximo de abundancia en el mismo valor de pH, compartiendo también los valores inicial y final de pH en que se manifiesta su presencia), mientras que aquellos en los que el grupo amino se encuentra disponible para la interacción, el pKa disminuye considerablemente (Tabla 5.2), reflejado en la aparición de la especie desprotonada a un valor de pH menor interactuando con el catión que en su estado libre

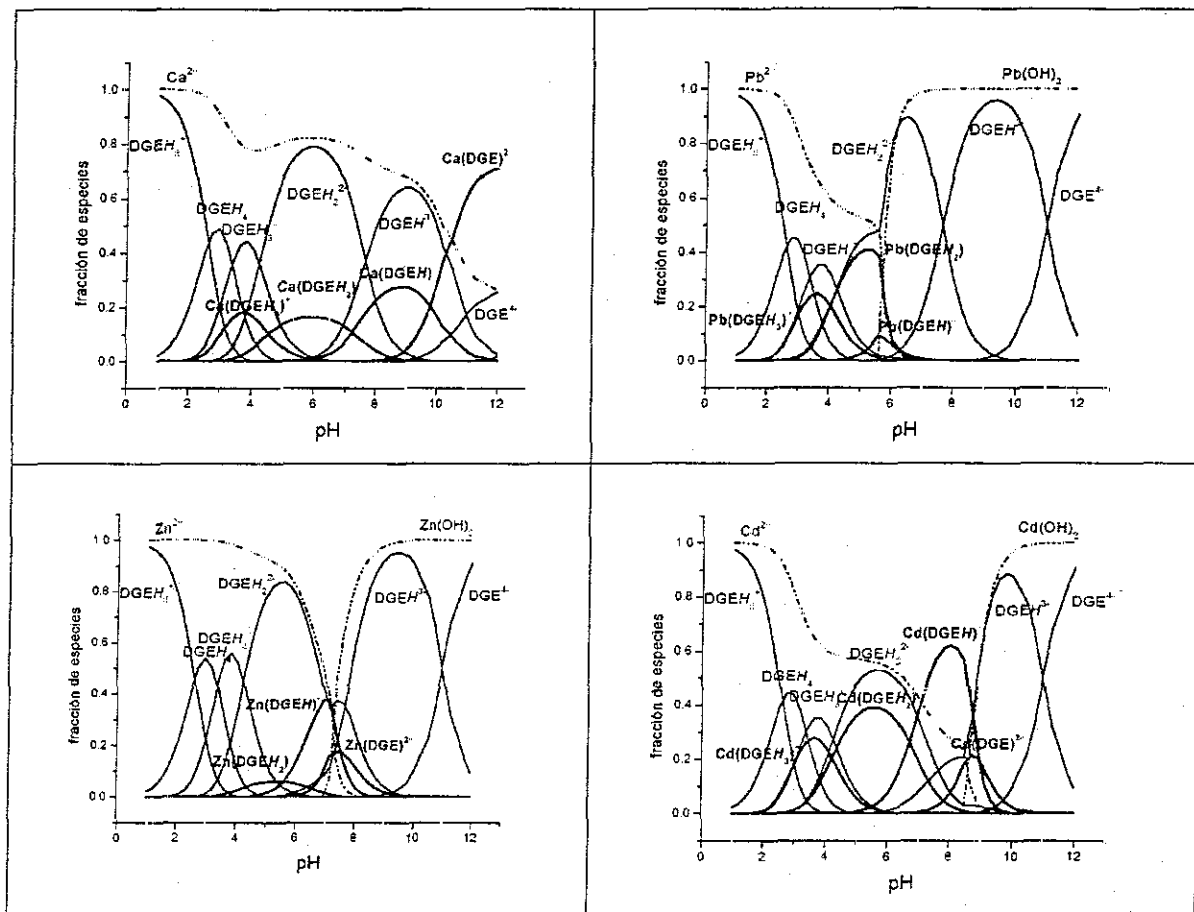


Figura 5.4. Diagrama de distribución de especies de los complejos con DGE

Podría considerarse entonces que la presencia del catión no altera la distribución de las especies cuyas interacciones serán con oxígeno, dándose únicamente una interacción de tipo electrostático. Con el átomo de nitrógeno, la interacción es de tipo orbital, es decir se forma un enlace de carácter covalente, por lo que se debilita la interacción covalente del nitrógeno con el protón ácido.

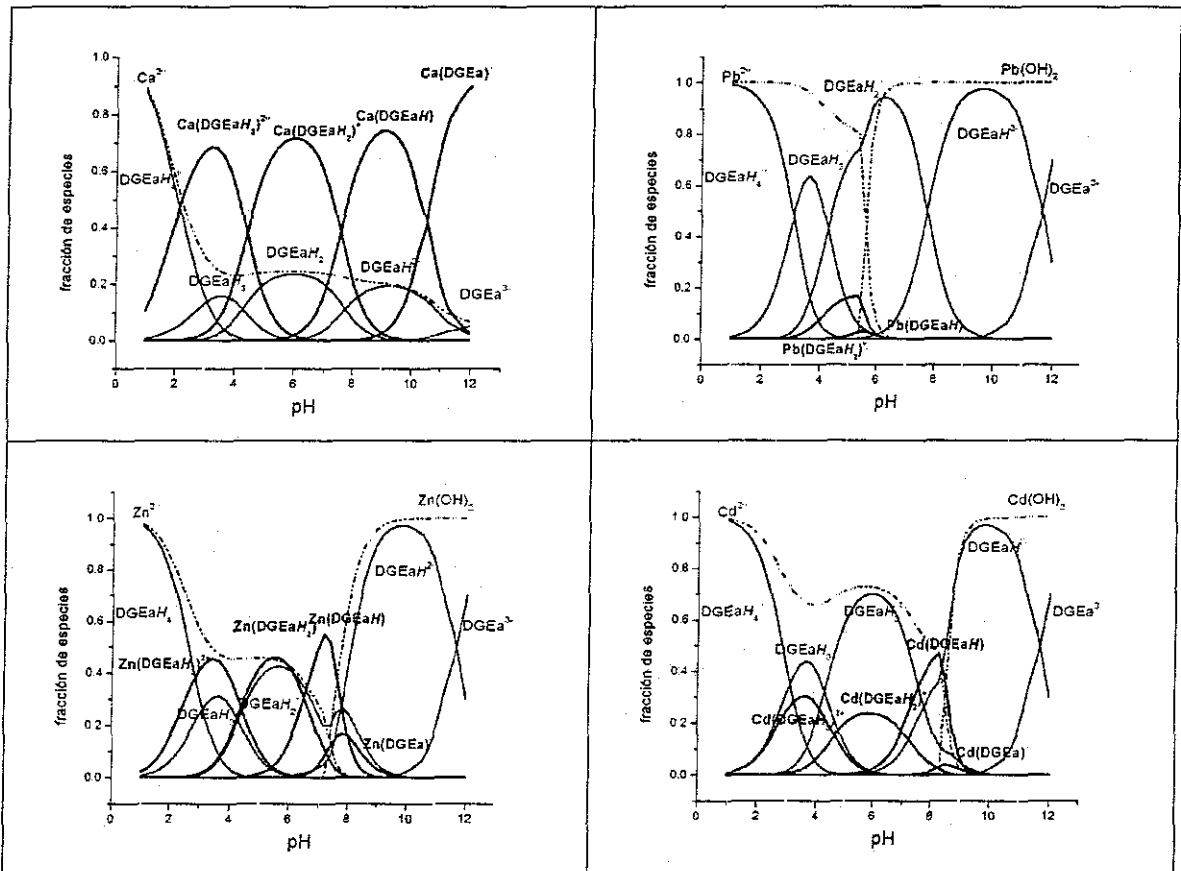


Figura 5.5. Diagrama de distribución de especies de los complejos con DGEa

5.2. Resonancia Magnética Nuclear

5.2.1. Espectros de RMN de 1H de una dimensión, pH variable

Se desarrollaron titulaciones del tripéptido DGE con NaOD para poder asignar los valores de pKa al grupo involucrado, seguidas por RMN de 1H . Se muestran las variaciones en desplazamiento químico respecto al pH en la Figura 5.6, señalando los valores de pKa. La asignación se basa en la respuesta de las señales a la variación en el pH.

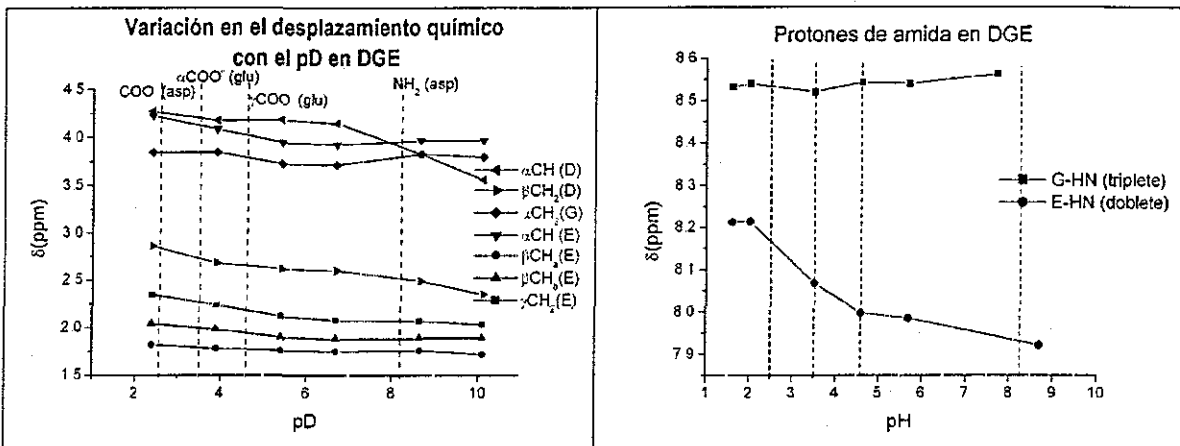


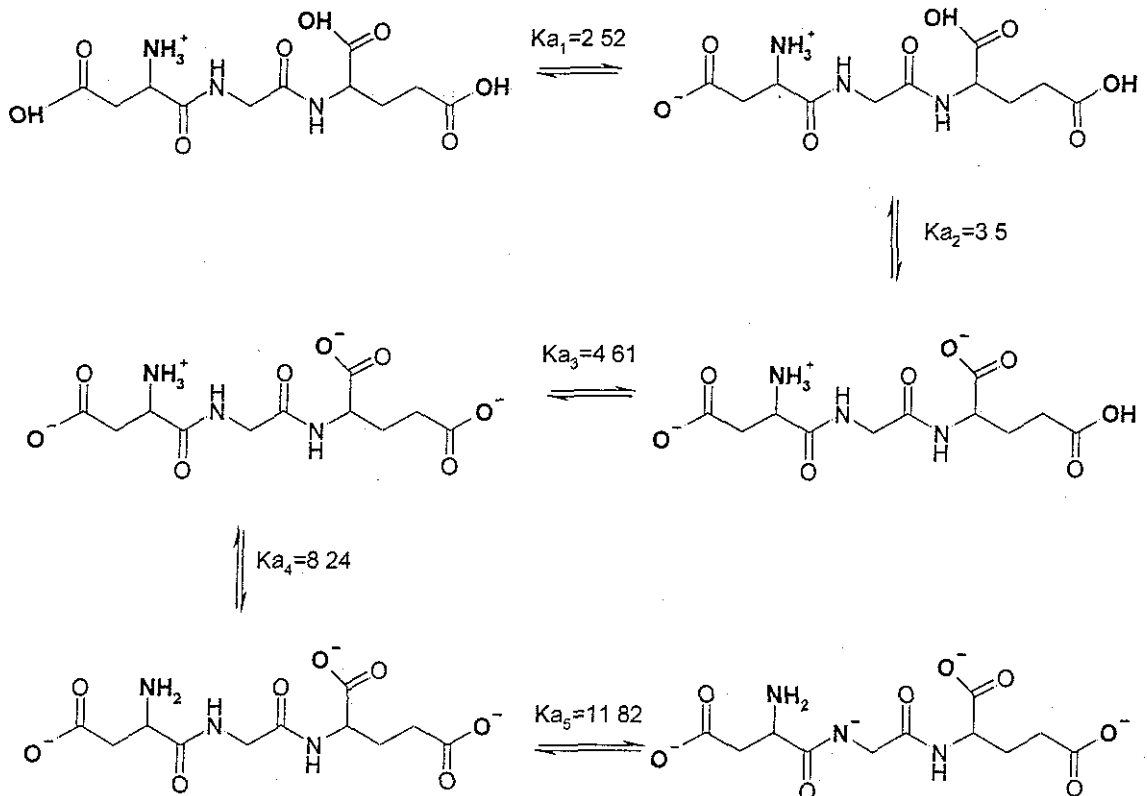
Figura 5.6. Titulaciones seguidas por RMN de ¹H

Es entonces posible asignar el primer pKa (2.52) al grupo carboxílico del aspártico, seguido por el carboxílico α del glutámico (3.5) (valor ausente en el DGEa, hecho que confirma la asignación), posteriormente el γ del glutámico (4.61), el grupo amonio (8.24). Para observar el efecto del pH en el desplazamiento químico del protón del grupo amida del péptido, se hizo el experimento en 20% D₂O/H₂O (para establecer la resonancia de deuterio) y se incrementó el pH agregando NaOH acuoso. El grupo amino o amonio presenta un intercambio mucho más marcado con el D₂O, e incluso con el H₂O de tal manera que es imposible observar la señal correspondiente. Pero sí se observa la desaparición a un pH menor de 9 de la señal correspondiente al protón de amida del enlace peptídico entre el aspártico y la glicina, que presenta un patrón de triplete debido a los dos hidrógenos α de glicina. Al acercarse al valor de pKa, el grupo asociado empieza a presentar una pequeña proporción de especie desprotonada. En un valor de pH=9, aproximadamente una milésima parte de la concentración del ligante se desprotonará, y así, en el equilibrio dinámico, los protones pueden cambiar por deuterios o por hidrógenos del agua, con lo que la señal disminuye y desaparece:

$$\text{pH}=\text{pK}_a + \log \frac{[L]}{[LH]}; 9 = 11.82 + (-2.82); \log \frac{[L]}{[LH]} = -2.82$$

$$\frac{[L]}{[LH]} = 10^{-2.82} = 1.51 \times 10^{-3}$$

Se presenta a continuación la esquematización de los equilibrios ácido-base del ligante DGE.



Se pretendió observar, también con los tripéptidos, el efecto del pH en el desplazamiento químico en presencia de los cationes, pero debido a la precipitación de los hidróxidos no se llega a observar la formación de especies significativas. Se presentan, sin embargo, los valores de desplazamiento de las señales y los acoplamientos en los espectros de alta resolución para mezclas 1:1 de ligante:cación a valores de pH significativos de acuerdo con los diagramas de distribución de especies de la Figura 5.4 y la Figura 5.5). Los valores de δ , J^2 y J^3 se obtuvieron mediante la simulación de espectros desarrollada a

través del programa gNMR como se comenta en el anexo 3 (Figura 5.7, Tabla 5.3, Figura 5.8, Tabla 5.4, Figura 5.9).

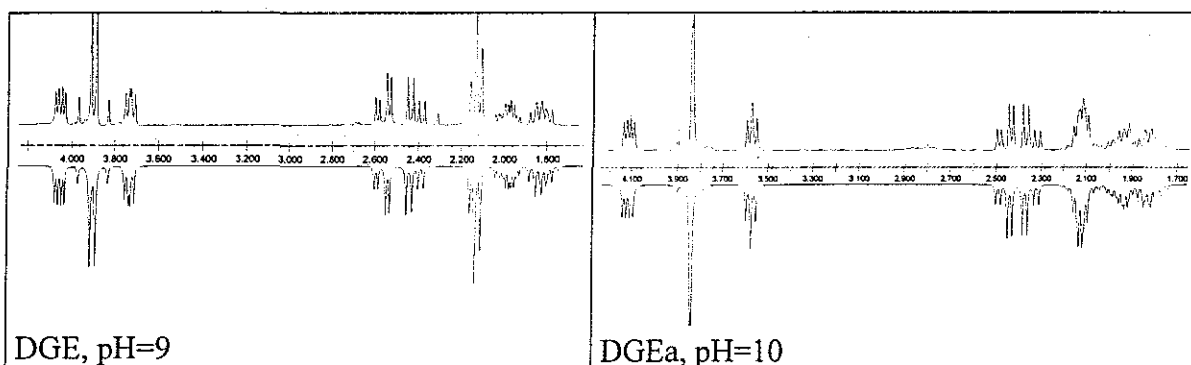


Figura 5.7. Simulación de espectros de los ligantes libres que arrojan los valores de δ , J^2 y J^3 .

Tabla 5.3. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en disoluciones 1:1 DGE: M^{2+} .

Los coeficientes 1,2,3 corresponden a Asp, Gly, Glu respectivamente. Se tratan como sistemas de espín aislados por el carbono cuaternario del enlace peptídico. J(1) se refiere al acoplamiento con el primer núcleo mencionado para el sistema de espín, J(2) con el segundo, etc.

DGE pH=8.5	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.558				
1H β 1	2.417	-16.1			
1H α	3.728	5.23	8.01		
2H α 1	3.869				
2H α 2	3.927	-17.04			
3H α	4.052				
3H β 1	1.816	9.17			
3H β 2	1.981	4.33	-14.97		
3H γ 2	2.128	0	8.17	8.27	
3H γ 1	2.133	0	8.3	6.69	-15.42
CaDGE pH=9	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.549				
1H β 1	2.443	-16.13			
1H α	3.764	5.47	7.61		
2H α 1	3.831				
2H α 2	3.908	-17.09			
3H α	4.025				
3H β 1	1.792	8.81			
3H β 2	1.952	4.62	-14.15		
3H γ 2	2.108	0	7.24	7.59	
3H γ 1	2.107	0	7.56	7.93	-0.46

PbDGEpH=4	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.89				
1H β 1	2.88	-16.3			
1H α	3.963	5.47	7.61		
2H α 1	3.8				
2H α 2	3.944	-17.09			
3H α	4.142				
3H β 1	1.871	8.81			
3H β 2	2.041	4.62	-14.5		
3H γ 2	2.272	0	7.7	7.3	
3H γ 1	2.26	0	7.3	7.2	-15.9
ZnDGEpH=7.5	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.688				
1H β 1	2.588	-17.47			
1H α	4.039	4.13	5.78		
2H α 1	3.722				
2H α 2	3.945	-16.87			
3H α	3.953				
3H β 1	1.784	8.11			
3H β 2	1.902	4.88	-15.36		
3H γ 2	2.072	0	6.86	8.4	
3H γ 1	2.162	0	6.53	6.86	-15.86
CdDGEpH=9	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.649				
1H β 1	2.565	-16.39			
1H α	3.943	4.48	7.84		
2H α 1	3.767				
2H α 2	4.038	-17.24			
3H α	4.05				
3H β 1	1.893	6			
3H β 2	1.995	6	-12.53		
3H γ 2	2.165	0	8.19	6.94	
3H γ 1	2.297	0	7.63	7.72	-18.72

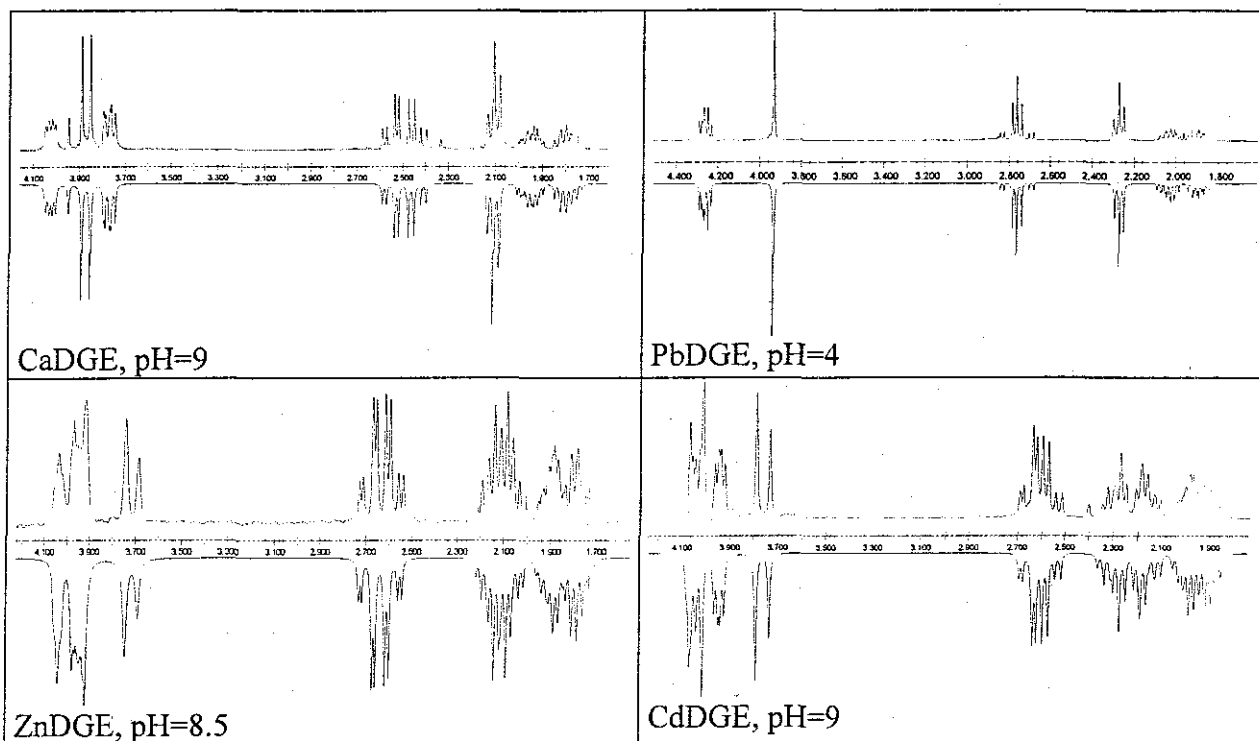


Figura 5.8. Simulación de espectros de disoluciones de DGE con M^{2+} que arrojan los valores de δ , J^2 y J^3

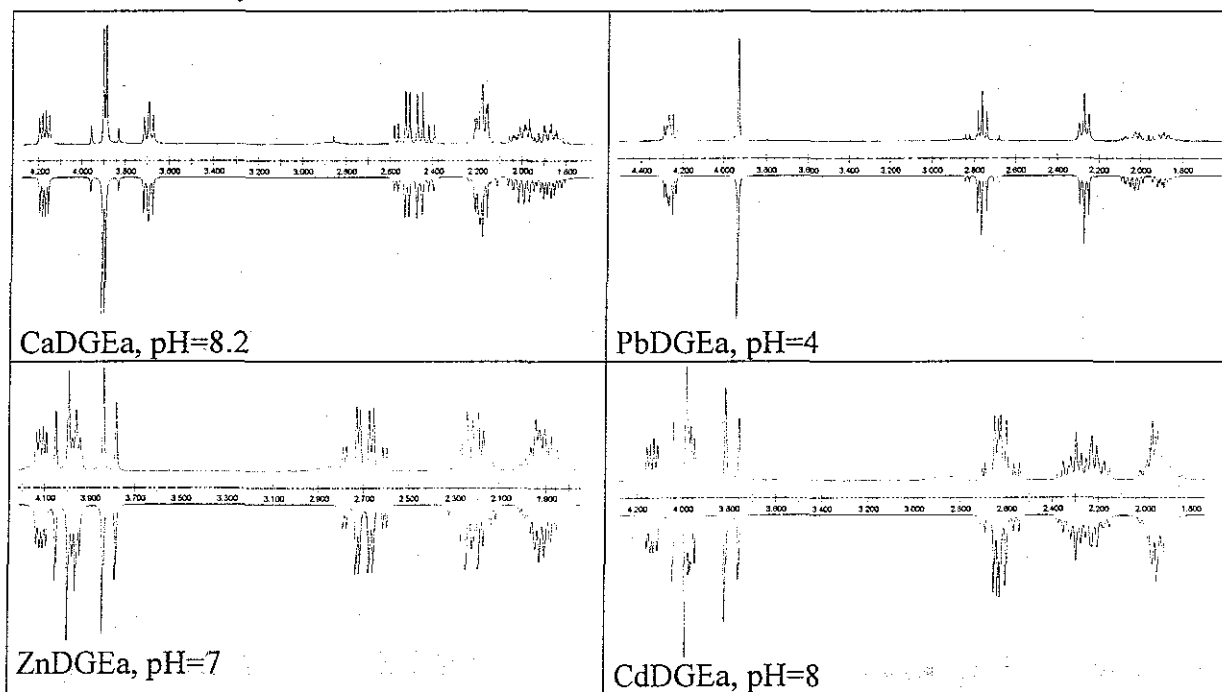


Figura 5.9. Simulación de espectros de disoluciones de DGEa con M^{2+} responsables de los valores de δ , J^2 y J^3

Tabla 5.4. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en disoluciones 1:1 DGE:M²⁺.

Los coeficientes 1,2,3 corresponden a Asp, Gly, Glu respectivamente. Se tratan como sistemas de espín aislados por el carbono cuaternario del enlace peptídico. J(1) se refiere al acoplamiento con el primer núcleo mencionado para el sistema de espín, J(2) con el segundo, etc.

DGEa pH=10	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.459				
1H β 1	2.352	-15.48			
1H α	3.574	6.26	7.08		
2H α 1	3.824				
2H α 2	3.854	-17.17			
3H α	4.119				
3H β 1	1.813	10.13			
3H β 2	1.949	4.68	-15.24		
3H γ 2	2.101	0	7.18	7.75	
3H γ 1	2.145	0	6.98	7.03	-15.42
CaDGEa pH=8.2	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.54				
1H β 1	2.443	-15.69			
1H α	3.696	5.65	7.35		
2H α 1	3.876				
2H α 2	3.918	-17.12			
3H α	4.176				
3H β 1	1.87	4.11			
3H β 2	2.001	7.91	-14.55		
3H γ 2	2.18	0	17.46	6.72	
3H γ 1	2.192	0	-3.56	6.7	-13.28
PbDGEa pH=4	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.736				
1H β 1	2.793	-17.3			
1H α	4.272	7.61	5.26		
2H α 2	3.935				
3H α	4.257				
3H β 1	1.89	9.45			
3H β 2	2.039	4.76	-13.45		
3H γ 2	2.27	0	6.02	5.77	
3H γ 1	2.27	0	7.03	6.98	-15.42

ZnDGEa pH=7	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.746				
1H β 1	2.645	-17.64			
1H α	3.961	4.58	5.38		
2H α 1	3.815				
2H α 2	4.019	-16.9			
3H α	4.118				
3H β 1	1.879	9.46			
3H β 2	1.957	4.4	-14.07		
3H γ 2	2.174	0	6.31	6.25	
3H γ 1	2.266	0	7.09	6.91	-15.59
CdDGEa pH=8	δ (ppm)	J(1)	J(2)	J(3)	J(4)
1H β 2	2.663				
1H β 1	2.596	-16.96			
1H α	3.971	4.58	7.61		
2H α 1	3.793				
2H α 2	4.013	-16.89			
3H α	4.137				
3H β 1	1.976	4.56			
3H β 2	1.92	9.85	-15.51		
3H γ 2	2.21	0	6.41	9	
3H γ 1	2.32	0	6.59	6.51	-16.39

5.2.2. Espectros de RMN 1H en dos dimensiones. Estudio conformacional.

Como se comenta en los antecedentes, al crecer la cadena del ligante, cobra importancia el uso de programas de cómputo para la elucidación de las conformaciones presentes en disolución (anexo 3). Se hace necesario recurrir a estudios en dos dimensiones, en este caso el experimento adecuado resulta ser el ROESY más que el NOESY de acuerdo con lo que se plantea en la sección A3 1 del anexo 3

Para poder llevar a cabo la estrategia descrita en dicho anexo, para los espectros ROESY es necesario contar con los valores de desplazamiento químico de las señales y las constantes de acoplamiento que ya se presentaron. La constante de acoplamiento es de por

sí una variable que da información de la estructura, pues responde al ángulo diedro entre los núcleos que la provocan.

Nuevamente se desarrollaron los experimentos en valores de pH en los cuales, de acuerdo con los diagramas de distribución de especies (corregidos al considerar la fuerza iónica dada por la concentración de los analitos), se encuentran proporciones significativas de complejo formado. Al analizar las señales de interacción en los derivados de los tripéptidos (DGE y DGEa), éstas corresponden a interacciones intra-residuo, es decir de los protones pertenecientes a un mismo aminoácido (Figura 5.10). Este hecho provoca que el cálculo origine sistemas arreglados aleatoriamente respecto a su cadena peptídica (Figura 5.11), pero mantiene cierta disposición en los átomos correspondientes a cada aminoácido. Probablemente la ausencia de otras señales sea resultado del nivel de ruido debido a la presencia de agua en el espectro, por haberse realizado en $H_2O:D_2O$ pretendiendo observar las señales de amida.

Por otro lado, nuevamente un factor importante en el valor de la intensidad de la señal de interacción resulta ser la escasa fracción que representan los complejos respecto al ligante libre en el intervalo de pH previo a la precipitación de los hidróxidos (ver Figura 5.4), y también, como se ha comentado con anterioridad, a la cinética sumamente rápida que caracteriza a estos cationes.⁴

Para suprimir el efecto del agua se desarrolló un experimento en un equipo que cuenta con la tecnología de gradientes, que permite seguir secuencias de pulsos que suelen ser más efectivas en la supresión de agua, pero aún así no se logran observar las señales inter-residuos.

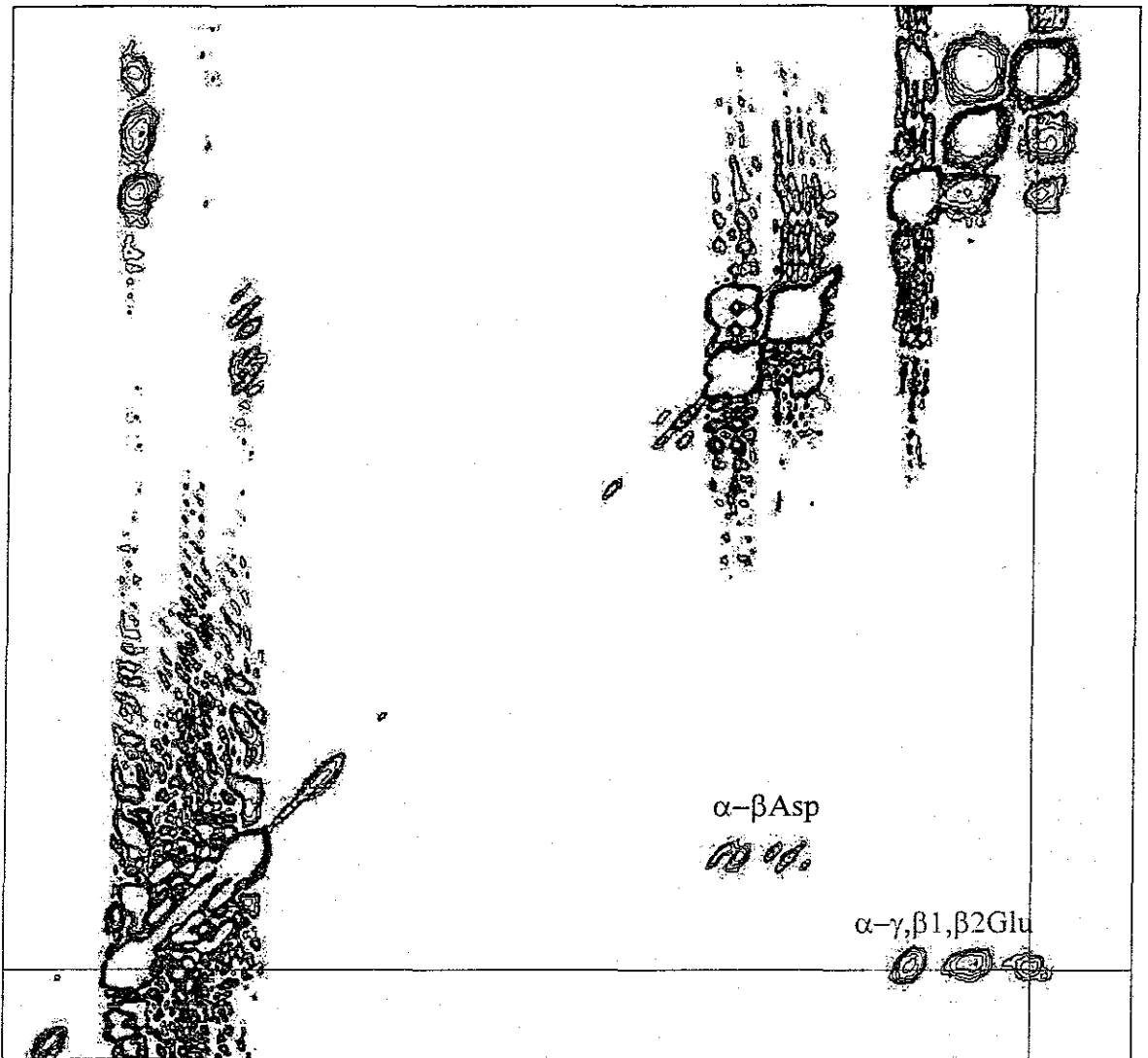


Figura 5.10. Espectro ROESY de DGE a pH=8.5. Interacciones intraresiduo y ruido provocado por la presencia de Agua.

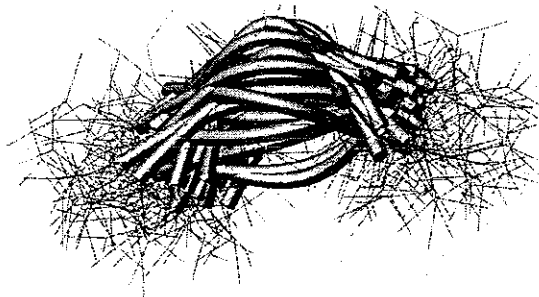


Figura 5.11. Sobreposición de estructuras para DGE a pH=8.5 calculadas por dinámica molecular a partir de datos de RMN (ROESY).

Por otra parte, de los experimentos ROESY realizados en D_2O se ha podido plantear las conformaciones posibles que, sin ser de carácter cuantitativo, coinciden con las cercanías H-H que se observan en el espectro de dos dimensiones (Figura 5.12). Los valores de distancia entre átomos donadores son **estimaciones** resultantes de ubicar a los grupos CH y CH_2 en las moléculas de tal modo que, respetando los ángulos y distancias normales de enlace, se acerquen los hidrógenos cuyas interacciones se observan en los espectros. Coincide que en cada caso la separación entre los átomos donadores más cercanos corresponde con la variación de radio del catión con el que se trabaja (Ca^{2+} y Pb^{2+}).

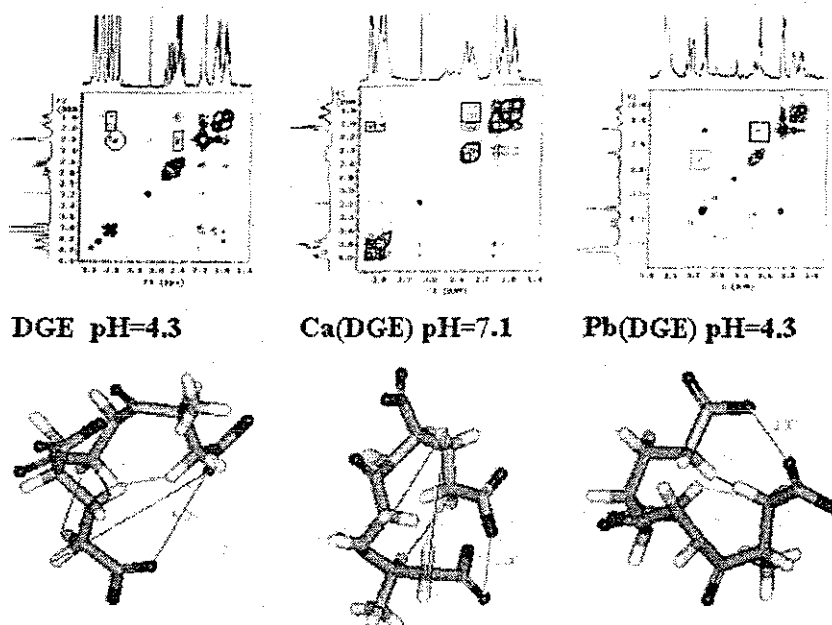


Figura 5.12. Espectros ROESY en D_2O . Estructuras que pueden presentar las interacciones interresiduos observables en los espectros.

En todas estas estructuras se observa que los grupos hidrofílicos se ubican en el exterior, en contacto con el disolvente, mientras que los grupos alquílicos quedan en el interior interactuando entre sí. Como se espera debido al valor de pH de trabajo, las estructuras que se establecen a través del análisis de estos espectros indican que la coordinación a los

metales se realiza únicamente a través de los grupos carboxilo, ya que el grupo amino se encuentra aún protonado.

5.3. Interacción de Asp-Gly-Glu y Asp-Gly-Glu-amida con los cationes en estudio. Observaciones relevantes.

La disponibilidad de un gran número de átomos donadores con diferentes tipos de interacción posibles hace que la formación de los complejos de coordinación de cada uno de estos cationes con los ligantes DGE y DGEa se diversifique, presentando una variedad de formas de coordinación que repercute en la estabilidad de cada uno de los complejos. Por ello ya no es válido buscar establecer una escala de estabilidades basada en la afinidad de los cationes por oxígeno o por nitrógeno, como se hizo en los capítulos anteriores. Se observa que una interacción de tipo orbital entre los cationes y los átomos donadores repercute en la distribución de especies de ligante, mientras que al ser de tipo exclusivamente electrostático, las especies ligadas y las no coordinadas presentan la misma distribución.

Al experimentar los diferentes tipos de espectroscopia de resonancia en dos dimensiones que utilizan al efecto nuclear Overhauser se observa que la interferencia que es capaz de generar el agua como disolvente, puede impedir la observación de señales debidas a la interacción a corta distancia

Interacción con el Dodecapéptido

-Sitio II de la Calbindina D_{9K}-

DKNGDGEVSFEE

Finalmente llegamos a la determinación de estructura e interacciones del dodecapéptido cuya secuencia corresponde a la que presenta el sitio II de enlace a calcio en la Calbindina D_{9K}

En un principio se consideró la posibilidad de utilizar al oligopéptido en forma cíclica, para que de la manera en que las hélices α ubican a esta secuencia formando un *lazo* que se mantiene prácticamente igual en estado libre que con la presencia del catión Ca^{2+} o Cd^{2+} ,¹ como se muestra en la Figura 1 de los antecedentes, este oligopéptido se mantuviera también en una estructura cerrada. Lamentablemente el giro en la proteína no deja a los extremos del sitio (Asp₅₄ y Glu₆₅) uno junto al otro. Por otra parte, unir mediante glicinas proporcionaría más grupos donadores y no necesariamente reproduciría la geometría del fragmento en la proteína, de acuerdo con estudios de mecánica molecular que se desarrollaron a nivel MM+.

Así es que se decidió usar el dodecapéptido abierto con la secuencia correspondiente al sitio II de la Calbindina, que, como se comentó en los antecedentes, es el más representativo de los sitios de enlace a calcio de una gran cantidad de proteínas, por estar

formado por 12 aminoácidos como una mano EF canónica, mientras que, el sitio I está formado por 14 aminoácidos. Es, por otra parte, el sitio que muestra una mayor afinidad por uno de los otros cationes de nuestro trabajo, el ion Cd^{2+} . Esta propiedad ha sido utilizada en estudios estructurales sobre el sitio I en su interacción con calcio, “bloqueando” selectivamente el sitio II con cadmio^{1(a),2}, ya que la afinidad de ambos sitios por el calcio es muy similar y por lo tanto el calcio disponible se distribuiría equitativamente entre los sitios, mientras que el cadmio se dirige directamente al sitio II. Los estudios realizados son únicamente en disolución ya que como sucedió con el tripéptido, se cuenta con cantidades aun más limitadas de ligante, y como se verá en los estudios potenciométricos, aquellas especies que pueden presentar una elevada abundancia, son altamente cargadas, lo cual las hace muy solubles y es poco factible aislarlas.

6.1. Estudios potenciométricos.

Como es de esperarse, este ligante esquematizado en la Figura 6.1, posee múltiples constantes de protonación. Los pKas que se presentan son 3.33(4), 3.52(3), 4.38(4), 4.49(3), 5.36(3), 9.75(2), lo que concuerda con la existencia de 5 carboxilos y un grupo amino de cadena lateral. La especie completamente desprotonada se verá representada por Dodeca^{5-} y la máxima protonación del intervalo de trabajo quedará como DodecaH_6^+ . El primer valor mencionado corresponde al grupo amino de la lisina, y los siguientes, a grupos carboxílicos de aspártico y glutámico.

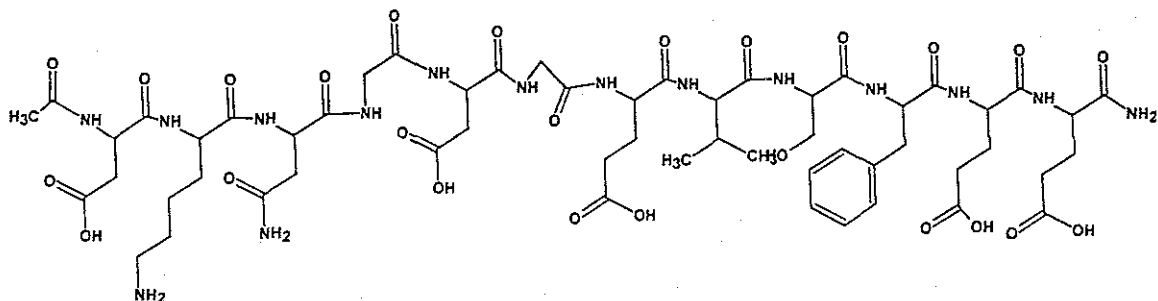


Figura 6.1. Estructura del dodecapéptido DKNKDGEVSFEE o Asp-Lys-Asn-Gly-Asp-Gly-Glu-Val-Ser-Phe-Glu-Glu.

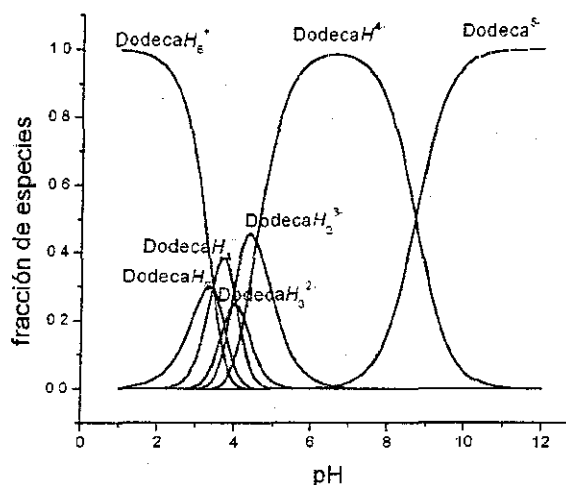


Figura 6.2. Diagrama de distribución de especies del ligante Dodeca

Para la formación de los complejos metálicos, nuevamente se hicieron estudios en condiciones de estequiometría 1:1, y al considerarse en el modelo la posibilidad de formación de complejos 1:2, se consiguió un ajuste satisfactorio de los datos de pH con los modelos que eliminando las especies 1:2, sólo incluían a las especies MH_xL^{x-3} ($x=0-4$), es decir, los complejos 1:1, curiosamente no se consiguió calcular un complejo con el ligante triprotonado, probablemente relacionado con la baja abundancia que de por sí se da del ligante en este nivel de protonación, y que en todo momento coexiste con $DodecaH_2^{3-}$ y $DodecaH_4^{7-}$.

Tabla 6.1. Constantes acumulativas de formación de complejos

Catión	$\log\beta_{101}^{(a)}$	$\log\beta_{111}^{(b)}$	$\log\beta_{121}^{(c)}$	$\log\beta_{141}^{(d)}$	$\log K(O)^{(e)}$	$\log K(N)^{(f)}$
Ca^{2+}	4.11 (7)	13.0 (1)			3.26	0.85
Pb^{2+}	10.60 (8)	14.80 (8)	19.86 (4)	27.46 (2)	5.1	5.5
Zn^{2+}	5.93 (5)	12.43 (7)			2.68	3.25
Cd^{2+}	9.69 (7)	14.57 (9)	19.65 (5)	27.76 (4)	4.82	4.87

^(a) β_{101} : $Dodeca^{5-} + M^{2+} \rightleftharpoons [MDodeca]^{3-}$; ^(b) β_{111} : $Dodeca^{5-} + H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DodecaH)]^{2-}$; ^(c) β_{121} : $Dodeca^{5-} + 2H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DodecaH_2)]^{-}$; ^(d) β_{141} : $Dodeca^{5-} + 4H^+ + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DodecaH_4)]^+$; ^(e) $\log K(O)$: $DodecaH^{4-} + M^{2+} \rightleftharpoons [M(DodecaH)]^{2-}$; ^(f) $\log K(N)$: $[M(DodecaH)]^{2-} + Dodeca^{5-} \rightleftharpoons [MDodeca]^{3-} + DodecaH^+$

La presencia de este ligante logra afectar apreciablemente al valor de pH de precipitación del hidróxido del metal para plomo y cadmio (ver Figura 6.5). Sólo se analizaron datos potenciométricos hasta una unidad de pH anterior a la aparición evidente de turbidez en el sistema y considerando la inflexión en la curva de titulación (Figura 6.3), pero se presentan los diagramas de distribución de especies calculados hasta valores de pH superior, considerando los valores de constantes de los complejos y de los hidróxidos insolubles que se llegan a formar

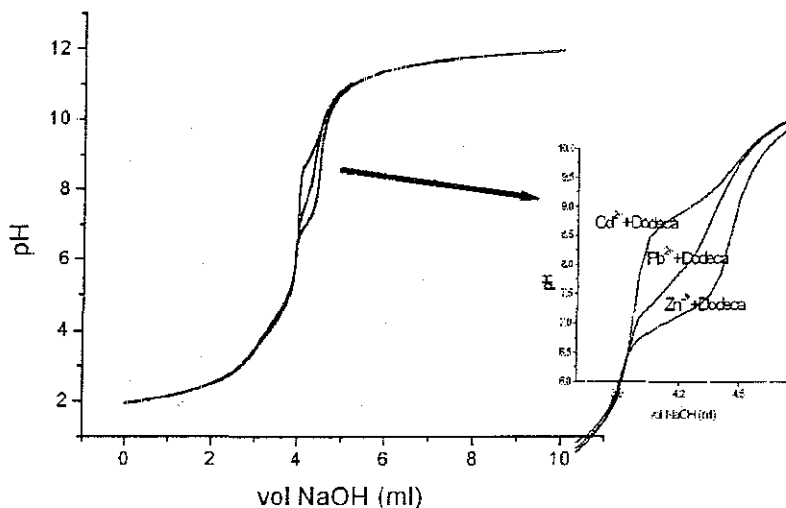


Figura 6.3. Efecto de la precipitación de los hidróxidos de los metales en la curva de titulación.

Nuevamente, $K_{M/LH}^{MLH}$ puede ser relacionada con la afinidad de estos cationes hacia los donadores de oxígeno (denominado $\log K(O)$ en la tabla de la Figura 6.4). En este caso, debido a la gran longitud del ligante y la presencia de tantos grupos hidrofílicos, su forma libre aporta una alta contribución entrópica al sistema lo cual abate la estabilidad de los complejos. Especialmente, la formación del complejo de calcio se dificulta, al depender principalmente de las interacciones electrostáticas para mantenerse unidos los diferentes átomos donadores, es decir, anclar al ligante. Esto puede provocar que haya menos átomos de oxígeno involucrados en la interacción, y por ello la contribución neta a la estabilidad sea menor en el caso del calcio que de plomo y cadmio (Figura 6.4). Como se mencionó, la estructura del sitio siendo parte de la proteína prácticamente no sufre cambios al pasar del estado libre al enlazado, lo cual evita que ese factor entrópico se encuentre involucrado en la constante de formación del complejo. Así, la constante de asociación ($\log\beta$) pasa de un valor de 8.4 (fuerza iónica $I=0$) o 6.57 ($I=0.15M$) en el sitio II de la Calbindina,³ a 4.11 con el dodecapéptido ($I=0.1M$).

Respecto a la estabilidad de los complejos de los otros cationes, el tamaño del ion puede ser un parámetro importante a considerar, pues siendo el Zn^{2+} mucho más pequeño (1.04Å respecto a 1.26Å Ca^{2+} , 1.24Å Cd^{2+} y 1.43Å Pb^{2+} , considerando un número de coordinación de 8⁴), probablemente genere impedimento estérico en el proceso de formación del complejo. El tamaño es un factor que se ha detectado como importante en la afinidad de la proteína.⁵

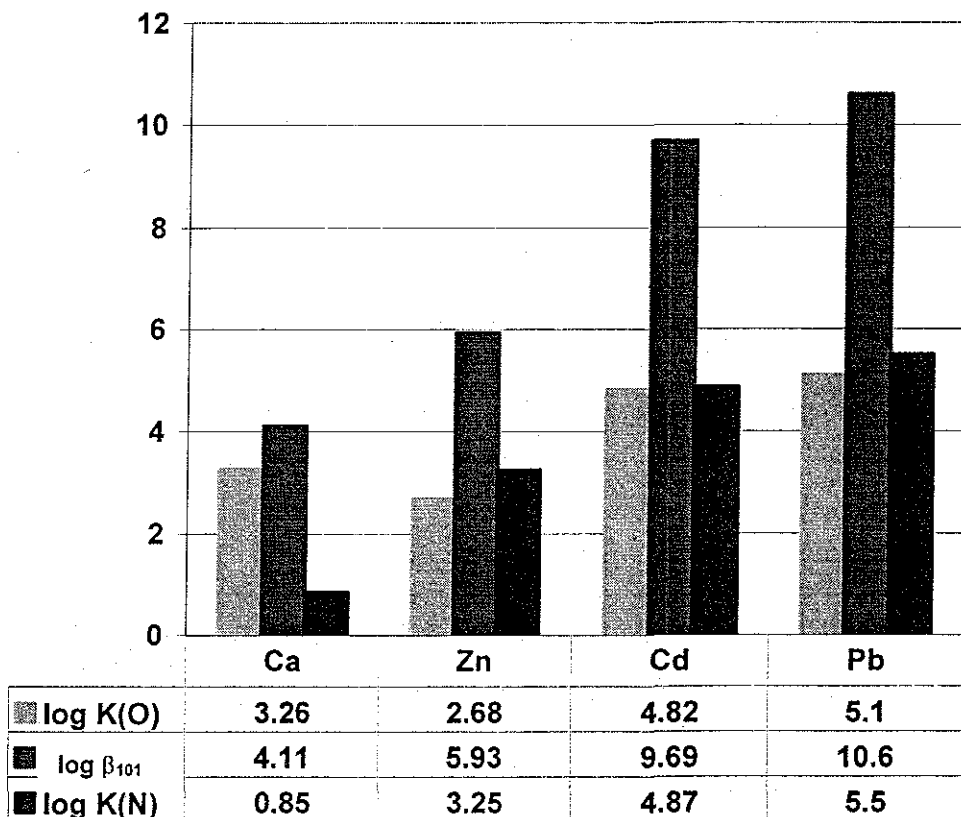


Figura 6.4. Contribución del átomo donador a la estabilidad de los complejos.

Finalmente, Cd^{2+} y Pb^{2+} presentan afinidades casi equivalentes, siendo mayor la de plomo. La contribución a la afinidad cuando se encuentra libre el grupo amino (log K(N) en la tabla de la Figura 6.4) probablemente se deba a la disposición espacial del grupo más que a la afinidad de los iones zinc, plomo y cadmio por este átomo donador. La acidez del grupo amonio de lisina aumenta notablemente con la formación de los complejos de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} como se puede ver los diagramas de distribución de especies de la Figura 6.5, ya que la especie desprotonada aparece a valores de pH mucho menores al estar coordinado que en su forma libre.

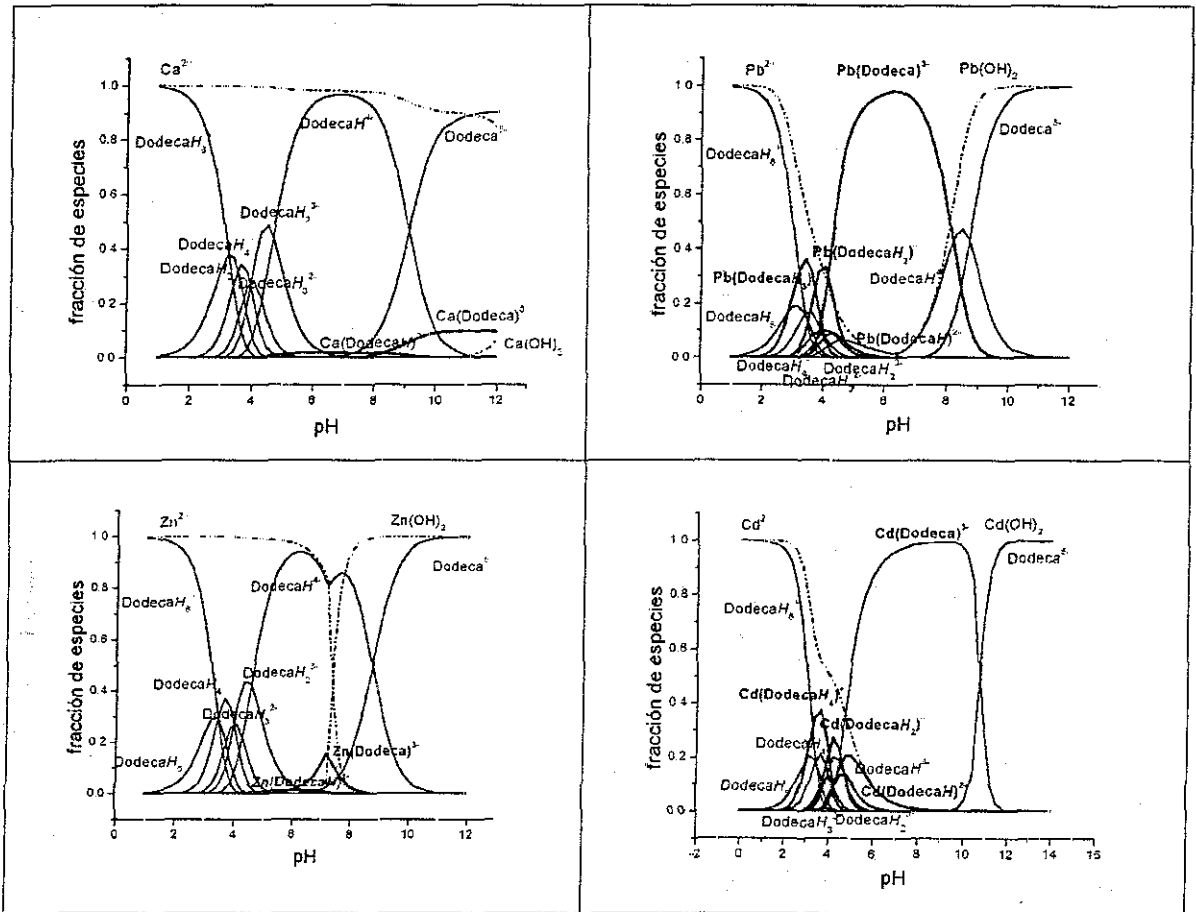


Figura 6.5. Diagrama de distribución de especies de los complejos

6.2. Resonancia Magnética Nuclear

Lamentablemente para este ligante no es posible llevar a cabo la asignación de los pKas a través de una titulación seguida por RMN como se desarrolló en los casos anteriores, debido a la existencia de varios residuos Glutamato y Aspartato. La asignación de sus señales respectivas en el espectro es únicamente posible con la combinación de dos técnicas bidimensionales, TOCSY y NOESY. De hecho, a pesar de trabajar en espectrómetros de alto campo, como 600MHz, los espectros no resultan tener la resolución apropiada como para poder hacer algún estudio significativo en una dimensión, pues las señales se ubican una sobre la otra, superponiéndose y perdiéndose.

cualquier patrón de acoplamiento (Figura 6.6). Se presentan por lo tanto únicamente los resultados del trabajo con los espectros en dos dimensiones.

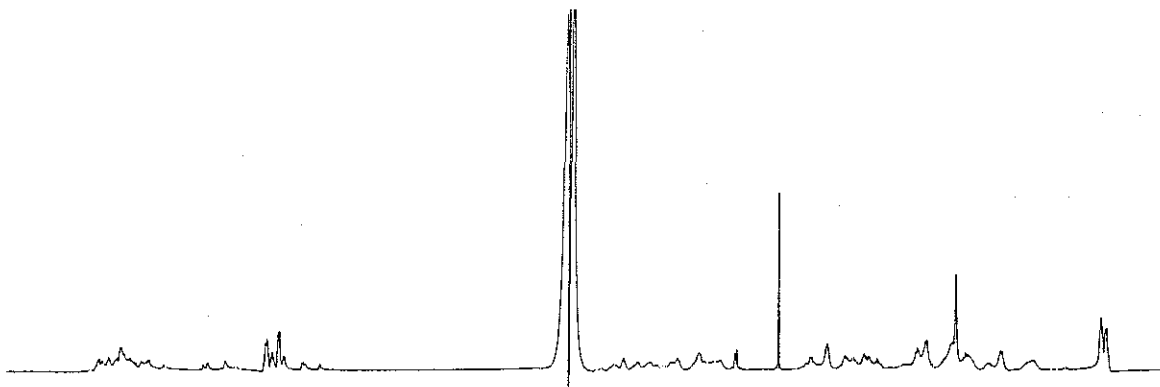


Figura 6.6. Espectro 1D de RMN a 600MHz de ^1H del Dodeca (pH=9)

6.2.1. Espectros de RMN de ^1H en dos dimensiones. Estudio conformacional

Los estudios de resonancia en dos dimensiones se desarrollaron en disolución acuosa con 20% de D_2O , a los valores de pH más convenientes para obtener una diversidad mínima de estados de protonación y complejación del ligante.

En todos los casos se encontraron señales correspondientes a la presencia de dos conformaciones en disolución y la optimización de una de cada par resultó en una estructura helicoidal que se debe a la presencia del ligante “libre”. Se muestra el valor de RMSD (desviación de la raíz del promedio de los cuadrados de las coordenadas de diferentes estructuras), siendo éste menor a 2Å, se considera un buen cálculo de estructura, aproximado a la estructura real.⁶

En el caso del complejo con Ca^{2+} , como se comentó en la sección anterior, la estabilidad es muy baja, y para forzar a que haya una mayoría de ligante en estado coordinado es necesario usar una proporción de Ca 20:1. Estas condiciones del experimento, a su vez, incrementan la fuerza iónica, factor que hace que las señales de interacción pierdan altura

y ganen área, hasta un punto en que se llegan a confundir con el ruido, como sucedió con las señales en de los tripéptidos, comentado en el capítulo anterior. De esta manera, no fue posible obtener una estructura del complejo de coordinación del dodecapéptido con calcio. Resulta sin embargo interesante incluir la estructura que presenta el dodecapéptido como sitio de unión en la proteína Calbindina, enlazado a calcio.⁷ (Figura 6.7)

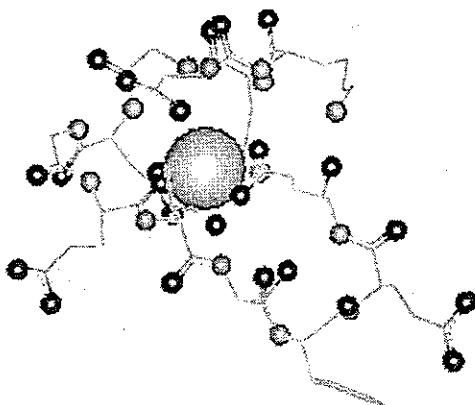


Figura 6.7. Fragmento de la Calbindina D_{9K} correspondiente al sitio II unida a calcio.⁷

Para los demás cationes se presentan a continuación 20 estructuras generadas por dinámica molecular a partir de las restricciones en distancias interprotónicas provenientes del espectro NOESY, de acuerdo con la estrategia descrita en el anexo 3, con el valor de RMSD obtenido a partir de la cadena peptídica. A su lado se muestra la estructura que cumple mejor con las restricciones de NOESY (como esferas, los átomos de O y N), en que ha sido ubicado el catión correspondiente de acuerdo con un cálculo de dinámica molecular a nivel PM3 (procedimiento descrito en el anexo 3, A3.7).

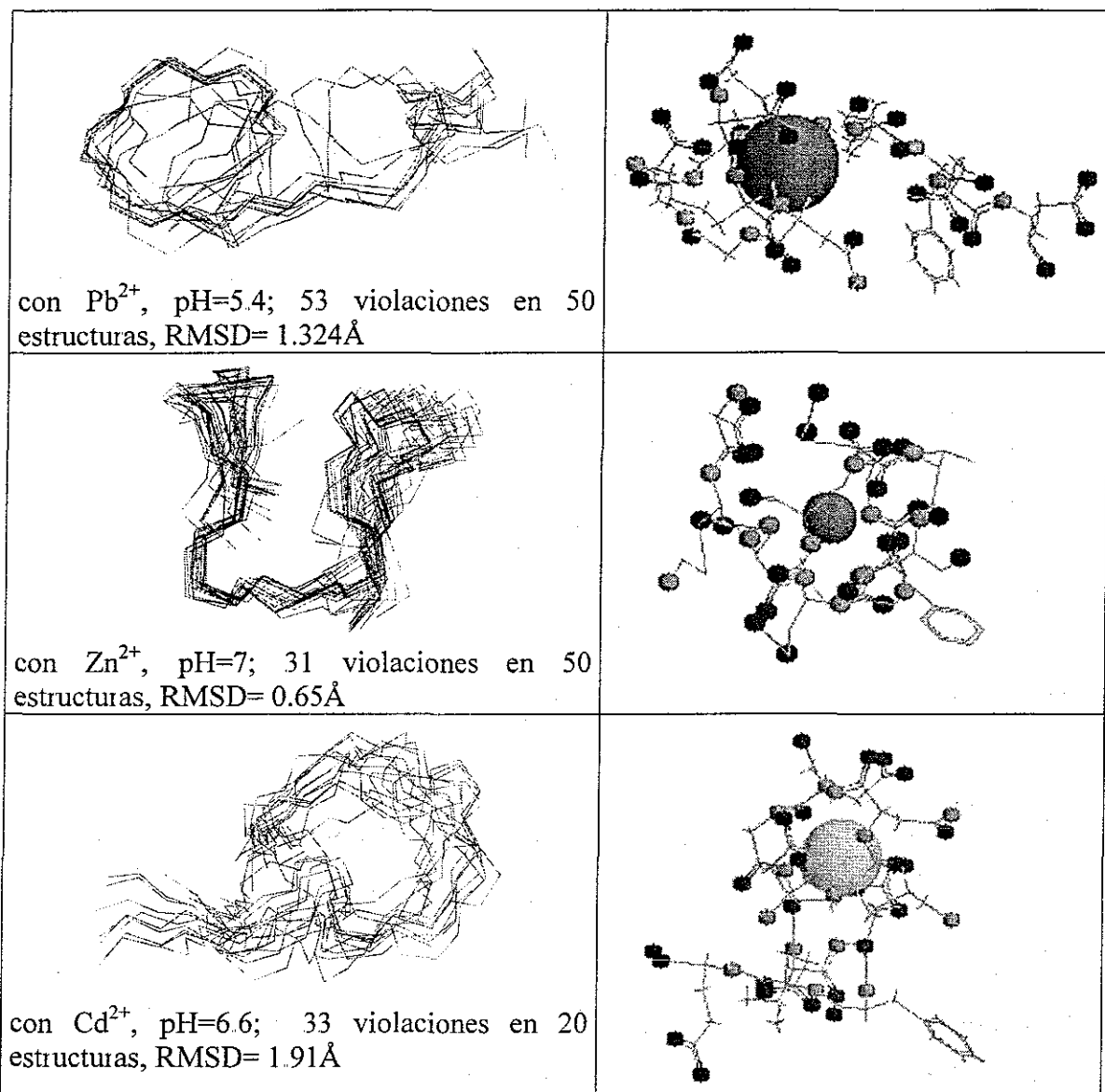


Figura 6.8. Estructuras del dodecapéptido en los complejos con Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} .

Traslape de la cadena peptídica de las estructuras generadas y estructura de mínima energía con la posición del catión propuesta por dinámica molecular (basada en MM+ seguida de PM3), en rojo=oxígeno, en azul=nitrógeno

El entorno de coordinación del Zn^{2+} parece tener a los átomos de nitrógeno de la cadena peptídica especialmente orientados hacia la cavidad que alojaría al catión. Se ha observado que el Zn^{2+} puede ser capaz de desprotonar al grupo amida en valores de pH que van de 7 a 11, para generar un enlace con nitrógeno.⁸ En este trabajo no se comprobó potenciométricamente, que se perdieran protones de los grupos amido.

Para Cd^{2+} y Pb^{2+} , sin embargo, los grupos carboxilos de cadenas laterales se orientan hacia la cavidad pudiendo completar la esfera de coordinación mucho más rica en donadores por oxígeno.

Resulta interesante observar cuáles átomos donadores se localizan a corta distancia de los cationes en los complejos cuya estructura se presentó en la Figura 6.8, así como de qué residuo provienen, para compararlo respecto a la esfera de coordinación del calcio en la Calbindina.

Tabla 6.2. Átomos donadores y residuos correspondientes que se ubican a distancia menor que la suma de radios de van der Waals de los cationes en los compuestos de coordinación del dodecapéptido.

Ca^{2+}		Pb^{2+}		Cd^{2+}		Zn^{2+}	
Ocp	Asp1	Ocl	Asp1	Ocl	Asp1	Ocp	Asp1
Ocl	Asn3	Ocl	Asn3	Ncp	Gly4	Ncp	Gly4
Ocl	Asp5	Ocl	Asp5	Ncp	Asp5	Ncp	Asp5
Ocp	Glu7	Ocp	Gly6	Ocp	Glu7	Ncp	Gly6
Ocl	Glu12	Ocp	Glu7	Ocl	Ser9	Ncp	Glu7
						Ocp	Glu7
						Ocl	Ser9

cp: cadena peptídica; cl: cadena lateral; Sombreado: interacción presente en el complejo con otro catión:

■ con Ca ■ con Pb ■ con Cd

Se puede ver un gran parecido en el entorno de coordinación del plomo respecto al calcio en la proteína, en que coinciden tres átomos donadores. El entorno de cadmio, por su parte, es parecido tanto al entorno del plomo como al de zinc, aunque no tan parecido al presente en la proteína, con el que únicamente comparte un punto de coordinación. El entorno del zinc es notablemente distinto al presente en la proteína, principalmente por la cantidad de puntos de contacto, principalmente nitrógenos.

6.3. Interacción del dodecapéptido con los cationes en estudio.

Observaciones Relevantes.

En los antecedentes se hace énfasis en la escasa respuesta estructural de la proteína Calbindina al enlazarse con los cationes. Se podría, en ese caso, pensar en el sitio de enlace como protagonista de un “efecto macrociclo”.⁹ Es decir, que dado el diseño de la proteína, la cavidad de coordinación ya está dispuesta para albergar al catión, y el efecto entrópico debido a la poca movilidad original del ligante, favorece a la manera del efecto quelato, la formación del complejo. En el caso del dodecapéptido utilizado en este trabajo, la movilidad original del ligante libre es muy acentuada, dado que no se encuentra enmarcado entre las hélices alfa que forman la mano EF en la proteína. Es por esto que la estabilidad de los complejos correspondientes al dodecapéptido es mucho menor a la del sitio II en la proteína con calcio. El zinc resulta, al parecer, demasiado pequeño para la cantidad y distribución de átomos donadores en el dodecapéptido, por lo que incluso su afinidad con el nitrógeno de amina, siendo de un valor cercano a las observadas para con los otros ligantes, no es tan marcada como la de los cationes Cd^{2+} y Pb^{2+} que parecen tener las características necesarias para una interacción óptima con el ligante, generando un entorno de coordinación muy similar al del sitio en la proteína. El incremento de la acidez del grupo amino en los complejos posiblemente se deba a efectos globales en la carga del complejo, dado que en las estructuras obtenidas en disolución acuosa mediante RMN el grupo amino no parece coordinarse directamente al catión; a pesar de encontrarse desprotonado en el complejo, de acuerdo a los diagramas de distribución de especies.

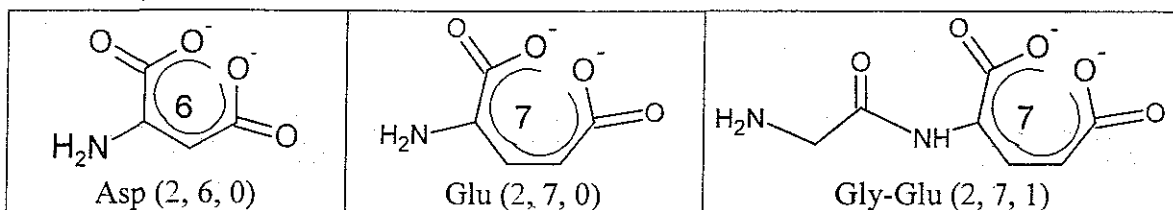
Análisis General de Resultados y Conclusiones

En los capítulos anteriores se han analizado los resultados correspondientes para cada ligante o tipo de ligante y su comportamiento respecto a cada uno de los cationes. Vale la pena, ahora, hacer un análisis global de los resultados para comparar a los ligantes entre sí, su capacidad de coordinación con los cationes y el tipo de estructura que presentan los complejos.

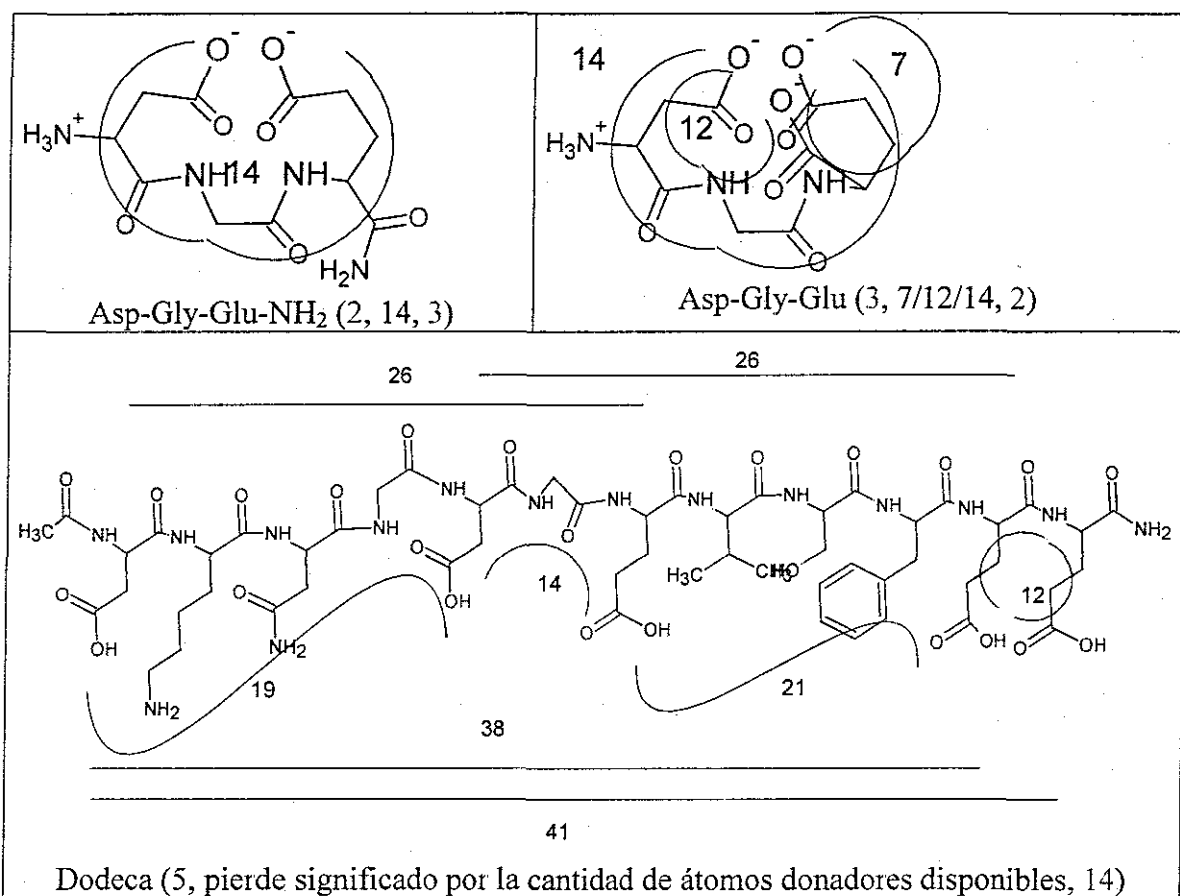
Afinidad

7.1. Estudios potenciométricos.

Para estudiar la influencia en el tipo de interacción entre los diferentes ligantes y los cationes, los ligantes se presentan ordenados por disponibilidad de grupos carboxilo. Los primeros cuatro ligantes cuentan todos con 2 grupos carboxilo pero la variación está dada por la distancia que queda entre los grupos, que va en aumento, y también el número de grupos carbonilo de amida. Así el orden de comparación resulta*:



* (# de grupos COO⁻, #átomos incluidos de O a O entre diferentes grupos carboxilos, # de grupos carbonilo de amida CO)



En la Figura 7.1 se muestra la “tendencia” en las constantes globales log β con el cambio en la estructura de los ligantes. Posteriormente se desglosa la constante de estabilidad de los complejos presentando, por un lado, la influencia dada por la interacción con los grupos carboxilos (al encontrarse protonado el grupo amino –único en cada ligante-) - Figura 7.2- y, por el otro, la influencia debida a la disponibilidad del grupo amino para la complejación -Figura 7.3-.

Es indiscutible que la estabilidad en los complejos se encuentra influida por varios factores, uno de los cuales es la afinidad de los cationes por los átomos donadores disponibles con su estado de hibridación y su carga, también la distancia entre los átomos donadores, además del tamaño de los cationes, involucrados en la posibilidad de

formación de anillos quelatos o la formación de estructuras poliméricas usando a los ligantes como puentes, y otros efectos entrópicos que comprenden al estado de “desorden” inicial y final.

Al utilizar los diferentes ligantes en el transcurso de este trabajo se pueden encontrar variaciones simultáneas en los diferentes factores, lo cual implica que hay que tenerlos en cuenta al analizar el aumento o disminución en la estabilidad comparándolos entre sí.

Se puede observar que Cd^{2+} y Pb^{2+} se comportan de manera muy similar en su afinidad por los grupos oxigenados y el grupo amino, siendo siempre el plomo más afin a nitrógeno que cadmio (Figura 7.3). Respecto al caso de los grupos carboxilos, la afinidad es muy similar, con la única excepción del GE en que el Cd^{2+} muestra una afinidad por los grupos carboxilos más parecida a la del Zn^{2+} .

El ligante DGEa muestra un comportamiento muy peculiar ya que como se discutió en el capítulo 5, tanto zinc como calcio presentan una muy alta afinidad por el ligante estando protonado el grupo amino (Figura 7.2). Dado que ambos cationes son los que presentan un menor valor de electronegatividad χ_P , serán los que tendrán una menor habilidad de participar en una interacción orbital con elementos más cargados negativamente, así, un ligante con mayor número de grupos carbonilo y tan solo 2 carboxilatos podrá, a la vez que neutraliza la carga positiva del catión, interactuar a través de los grupos carbonilo de la cadena peptídica.

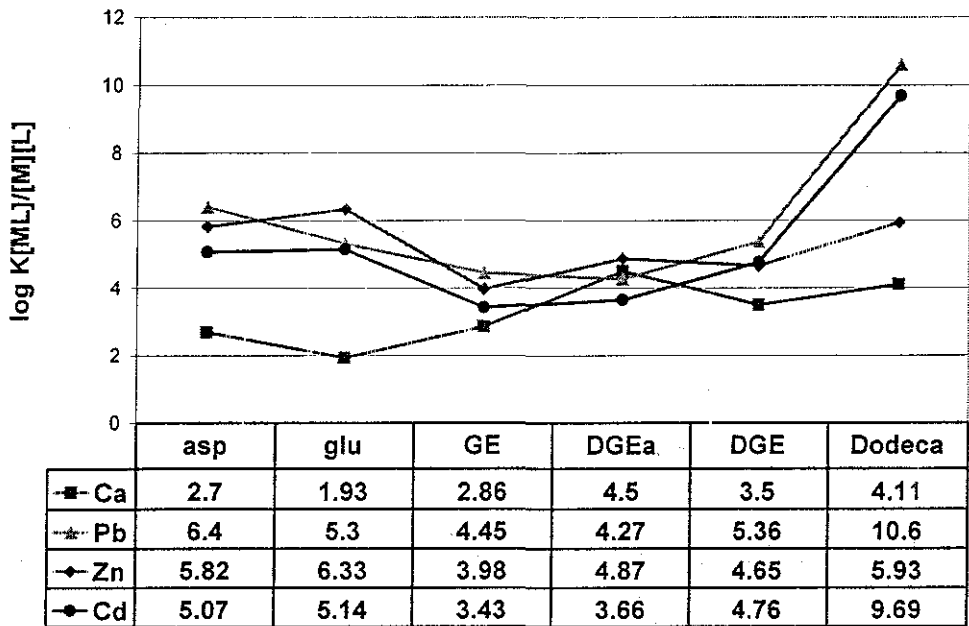


Figura 7.1. Constantes de formación de los complejos en los que puede intervenir como donadores tanto el grupo amino como los carboxilos. Los ligantes se ubican de menor a mayor disponibilidad de grupos carboxilo.

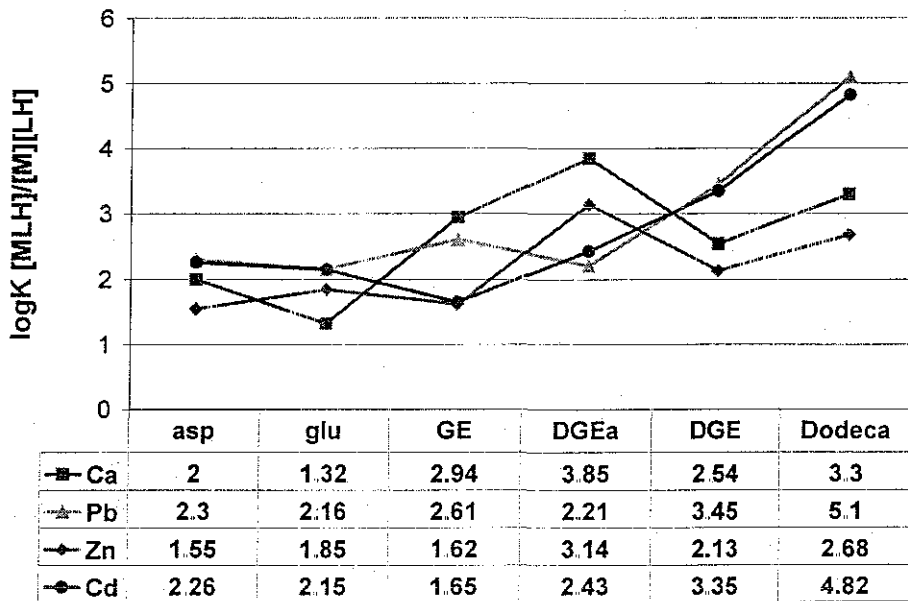


Figura 7.2. Participación de los grupos carboxilo en la estabilidad de los complejos.

Influencia del grupo amino libre en la estabilidad del complejo

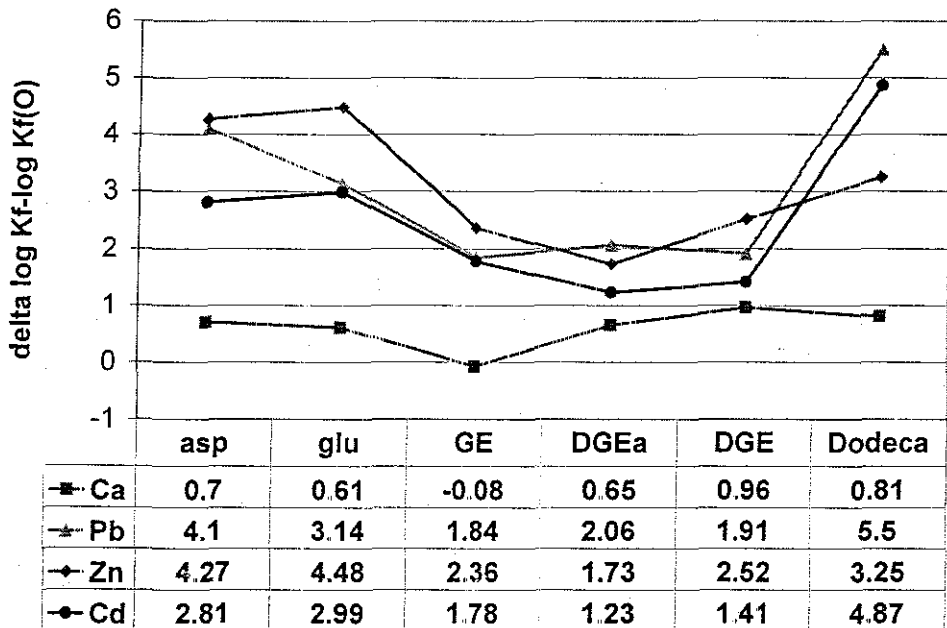


Figura 7.3. Influencia de la disponibilidad de NH₂ en la estabilidad de los complejos.

A excepción de este ligante, entonces, el zinc presentará la menor afinidad por los carboxilos entre estos cuatro cationes. Su afinidad por el nitrógeno logrará que en la mayoría de los complejos sea el que presente una mayor contribución de este átomo donador a la constante de estabilidad (Figura 7.2). En el caso del dodecapéptido, como se comentó en el capítulo correspondiente, no se observa una interacción mayor a las que presentan cadmio y plomo, pero de cualquier manera se encuentra en el intervalo observado para los otros ligantes, incrementándose respecto a los demás péptidos.

El comportamiento del calcio es especial pues, por ejemplo, el glutámico parece no tener una distribución óptima de los grupos carboxilo para la coordinación de ambos con él como se discutió en el capítulo 3, mientras que nuevamente se observa que la presencia de un grupo carbonilo adicional -en el caso del ligante GE- logra un incremento considerable en la estabilidad así como sucederá con el DGEa respecto al GE. Al

incrementar la carga negativa del ligante, la estabilidad disminuye pero sí hay un aumento al multiplicarse los donadores de oxígeno cargados y no cargados, es decir, al trabajar con el ligante dodeca.

En todos los casos es el calcio el que presenta una menor contribución de la disponibilidad del nitrógeno para la coordinación en la estabilidad (Figura 7.3).

En el caso de plomo y cadmio, siendo más electronegativos, se incrementa la estabilidad de los complejos al incrementarse la carga negativa del péptido.

No es de sorprenderse, dada la versatilidad de coordinación de los ligantes, que a pesar de ser considerados como del tipo O,O en algún momento y del tipo N,O en otro, no siempre se encuentren las tendencias señaladas por Martin en relación con la serie de Irving-Williams, como se mencionó en los antecedentes (1.4.3), ya que un mismo ligante puede presentar diferentes patrones de coordinación dependiendo del catión con el cual se compleje.

Probablemente debido a la baja contribución aportada por la formación de quelatos a la estabilidad de los complejos en disolución acuosa, quedan varias moléculas de agua formando parte de la esfera de coordinación del catión que dan lugar a las especies hidroxilo en los valores de pH esperados para los sistemas M^{2+}/H_2O sin ligantes. Es por ello que el dodecapéptido es el único ligante que logra variar sustancialmente el pH de precipitación de los hidróxidos, ya que logra mantener a las moléculas de agua más alejadas del centro de coordinación (ver diagramas de distribución de especies en los capítulos 3,4,5 y 6).

Estructura

7.2. Resonancia Magnética Nuclear en disolución.

Por medio de los estudios en disolución para determinar la estructura, en cada ligante se ha logrado encontrar evidencias de la formación de anillos quelato incluso en condiciones en las que los estudios en estado sólido no lo confirman. Esto, dado que en disolución, al encontrarse los centros de coordinación alejados unos de otros mediante el disolvente, se llega a favorecer la formación de anillos quelatos de tamaños grandes en los que intervienen las interacciones hidrofóbicas de los fragmentos alifáticos al interior del ciclo y las hidrofílicas de los grupos polares para ubicarse expuestas al disolvente o para la coordinación al metal.

En general, el carácter lábil de los cationes utilizados en este trabajo y el hecho de la coexistencia de varios estados de protonación del ligante libre y coordinado a los valores de pH de trabajo, impidió la presencia de señales intensas relacionadas con la conformación en los complejos.

Con el dodecapéptido, es posible observar una mayor afinidad de los cationes Pb^{2+} y Cd^{2+} a los grupos ricos en oxígeno, mientras que la interacción predominante en la formación del complejo con Zn^{2+} es mediante nitrógenos del enlace peptídico.

Fue imposible analizar la estructura correspondiente a la mayoría de los complejos cuyo grupo amino se encontrara desprotonado en disolución, debido a la precipitación de los hidróxidos de los cationes, así en valores de pH bajo las conformaciones que se presentan son principalmente aquellas que involucran coordinación mediante los carboxilos con interacción principalmente electrostática.

7.3. Cristalografía

La cantidad de átomos donadores en los ligantes de estudio, incluso en los más sencillos - los aminoácidos-, los hace susceptibles a actuar como puentes para formar polímeros en el estado sólido. En el caso del $\text{Pb}(\text{GlygluH})\text{ClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ se hace notorio que los cationes también presentan una propensión para formar polímeros, ya que es una molécula de agua la que actúa como puente.

La separación entre los átomos donadores en los ligantes cuando el grupo amino se encuentra protonado no estimula la formación de anillos quelato más allá de los de cuatro miembros cuando el carboxilo actúa como bidentado, por lo que en las estructuras que se lograron resolver para este trabajo, de compuestos obtenidos en condiciones en las que el ligante únicamente cuenta con los grupos carboxilos para la coordinación, la esfera de coordinación de los cationes se compone de los grupos que, puenteando, generan las estructuras poliméricas.

Las estructuras con plomo hacen patente la anisotropía que se presenta en el entorno de los átomos de plomo debida a la presencia del par electrónico inerte estereoquímicamente activo con un entorno de coordinación basado en interacciones iónicas, que por otro lado provoca la imposibilidad de registrar el espectro de RMN de sólidos de ^{207}Pb . Por su lado las estructuras de cadmio son altamente isotrópicas.

7.4. Espectroscopia infrarroja. IR lejano.

La presencia de interacciones M-N en algunos de los compuestos aislados permitió que se pudiera identificar la banda correspondiente a su vibración en IR lejano (Tabla 7.1). Para Pb-N se puede encontrar entre 325 y 340 cm^{-1} , para Cd-N: de 348 a 360 cm^{-1} , y para Zn de 363 a 365 cm^{-1} . La correspondencia de las bandas al considerar el cambio de catión.

—con una desviación de aprox. 7%— denotan que la fuerza de la interacción M-N en estado sólido, donde la esfera de coordinación se encuentra completamente satisfecha por grupos donadores, es bastante similar para los complejos con el mismo ligante, distinto a lo observado en disolución acuosa.

Tabla 7.1. Número de onda y constante de fuerza^s asociada a la interacción M-N

catión	Asp		Glu		GE	
	$\nu(\text{cm}^{-1})$	$k(\text{M-N})$	$\nu(\text{cm}^{-1})$	$k(\text{M-N})$	$\nu(\text{cm}^{-1})$	$k(\text{M-N})$
Pb	325	1.00×10^7	328	1.00×10^7	339	1.07×10^7
Cd			348	1.07×10^7	360	1.13×10^7
Zn			363	1.07×10^7	365	1.07×10^7

^scalculada de la ecuación

$$\omega_{\text{M-NH}_2} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{\text{M-NH}_2}}{\mu_{\text{M-NH}_2}}}$$

7.5. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido CP/MAS

7.5.1. Espectros de RMN de ^{111}Cd CP/MAS

Fue posible obtener espectros de ^{111}Cd en los cuales se refleja el ambiente de coordinación del centro metálico. Un efecto especial fue detectado al coordinarse el ion nitrato de forma bidentada al cadmio, pues se produjo un acoplamiento de tipo dipolar ^{111}Cd - ^{14}N generando un triplete 1:2:1 con una constante de acoplamiento muy intensa, contando con 2 oxígenos como ruta de acoplamiento, con un valor de 125Hz.

7.5.2. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS

Los desplazamientos químicos en ^{13}C , particularmente de los grupos carboxilos, denotan el tipo de interacción similar o disimétrica en que están involucrados ambos grupos al complejarse con el catión

Pero la mayor fuente de información estructural proveniente de la obtención de espectros de este núcleo es la que corresponde a la medida del $\langle T_1 \rangle$ de ^1H detectable por la

transferencia de polarización a ^{13}C . En general, cuando no se tiene interferencia por que la composición sea aleatoria o por la presencia de aguas de hidratación -que provocan relajaciones rápidas, al igual que las interacciones de tipo electrostático, con valores de $\langle T_1 \rangle$ menores a 1s-, se puede observar que aquellos compuestos con el grupo amino desprotonado y coordinado, presentan una mayor rigidez que puede ser asociada a la formación de quelatos, de acuerdo a las observaciones en IR lejano.

Parece ser que cuando se presenta algún efecto que fije al ligante, ya sea, por un lado la formación de polímeros o por el otro la formación de quelatos, el valor de $\langle T_1 \rangle$ se ubica alrededor de 4s. Cuando **ambos** efectos se presentan se observan valores mayores a 10s.

Tabla 7.2. Valores de $\langle T_1 \rangle$ de ^1H medidos en CP-MAS ^{13}C para los derivados aislados

Catión	N protonado	Asp	Glu	Gly-Glu
Ca	✓	0.2s		0.6s
Pb	✓	3.6s		2.66s
	×	12.37s	21.99s	1.19s
Zn	✓	0.59s		
	×		3.92s	4.62s
Cd	✓	4.07s		0.26s
	×	0.58s	4.38s	15.0s

7.6. Conclusiones.

La ubicación distanciada de los átomos donadores en los ligantes hace que la formación de quelatos no sea, en general, una fuerza motriz para la formación de complejos estables y la afinidad de los cationes por cada uno de los átomos donadores se ve afectada por la posición de estos últimos.

El comportamiento estructural de los complejos resulta ser muy diferente en disolución que en estado sólido, por lo cual conviene concentrarse en los resultados en disolución para intentar comprender los fenómenos que se presentan a nivel biológico.

Así, por ejemplo, a pesar de que en el caso de Zn^{2+} se acentúe la afinidad por nitrógeno, al ser menor su afinidad por los grupos carboxilos, la constante de formación total resultante acaba teniendo un valor muy similar para todos los cationes. Con los péptidos pequeños: GE, DGE, y DGEa las constantes de formación que involucran como grupos donadores a los grupos carboxilo y al grupo amino (sin el grupo amido) presentan valores muy similares, con diferencias de un máximo de 2 unidades logarítmicas.

Dada la movilidad de los ligantes lineales (no cíclicos), tanto el comportamiento estructural como la afinidad entre los ligantes y los cationes de trabajo difiere de los que presentaría la proteína en la que las secuencias correspondientes se encuentran fijas en una conformación debido a la estructura terciaria de la Calbindina (manos EF). Este fenómeno permite que se diversifiquen los modos de coordinación de los ligantes y por lo tanto la estructura de los compuestos de coordinación que se pueden formar, dependiendo del catión con el que se trabaja. De esta manera,

- fue imposible dilucidar la estructura del complejo del dodecapéptido con el Ca^{2+} , debido a la incapacidad del calcio para participar en interacciones intensas de tipo orbital que logran anclar al ligante en una conformación con interacciones inter-residuos observables,
- por su parte el Zn^{2+} , debido a su tamaño mucho menor que los demás cationes y su afinidad hacia los átomos de nitrógeno provoca que el dodecapéptido se acomode generando un ciclo más cerrado que los manifestados por los otros

complejos y con menores variaciones entre las diferentes estructuras calculadas dada la mayor capacidad de este catión a presentar interacción de tipo orbital con los átomos donadores.

- El tamaño de los cationes Pb^{2+} y Cd^{2+} parecen ser los apropiados para formar al ligante a una conformación cíclica en la que muchos de sus grupos donadores se involucren en la coordinación de los centros metálicos, que a su vez presentan una mayor capacidad de enlazarse con interacciones de tipo orbital con bases de Lewis, cargadas o no, que el calcio.

Podemos concluir entonces que no han sido los donadores por nitrógeno los capaces de discriminar en la estabilidad de los cationes **con el sitio de la proteína**, ya que difícilmente en la proteína la secuencia podrá moverse para exponer a estos átomos donadores, sino el tamaño del catión que permita superposición con los grupos donadores que se encuentran a cierta distancia y quizás la electronegatividad del centro metálico, que permita la interacción con un sitio muy cargado negativamente.

El hecho de que plomo y cadmio sean capaces de interactuar con el ligante lineal de tal forma que los grupos donadores coincidan tanto con los que participan en la unión a calcio en la proteína, coincide con que sean los cationes que interactúan con la proteína de manera natural, tanto para usarla como vía para su asimilación al organismo -el caso del plomo-, como para hacer estudios estructurales sustituyendo al calcio -el caso del cadmio-.

Queda manifiesta la similitud entre cadmio y plomo en cuanto a su afinidad, que los coloca en la misma clasificación en cuanto a su dureza, como ácidos intermedios. Ambos cationes, cuentan, sin embargo con una alta contribución a la fuerza de las interacciones

Referencias

Introducción

1. M. Lacasaña-Navarro, I Romieu, L.H.Sanín-Aguirre, E. Palazuelos-Rendón, M. Hernández-Avila; *Rev. Invest. Clin* , 48:6 (1996), 425
2. C.S. Fullmer, S. Edelstein, R.H Wasserman, *J Biol Chem* , 260 (1985), 6816
3. R.G. Pearson; *J. Am. Chem. Soc.* , 85:22 (1963), 3533
4. R.G. Parr, R.G. Pearson; *J. Am. Chem. Soc* , 105:26 (1983), 7512

Capítulo 1. Antecedentes

1. D.L. Alekel; *Calcium*. En notas del curso *Food Science and Human Nutrition 560*; Iowa State University (2000).
2. M Ikura; *TIBS*; 21(1996), 14.
3. S.J. Lippard, J.M. Berg; *Principles of Bioinorganic Chemistry*; ED. University Science Books, (1994), p 187
4. J.J.R. Fraústo da Silva, R.J. P. Williams; *The Biological Chemistry of the Elements – The Inorganic Chemistry of Life*; ED. Clarendon Press, 1991, p.539
5. S. Linse, S. Forsén; *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res* , 30 (1995), 89
6. F. Bronner; *J. Nutr.* 128; (1998), 917
7. C.S. Fullmer; *Neurotoxicology*, 13:4 (1992), 199

8. S. Forsén, J. Kördel; *Calcium in Biological Systems en Bioinorganic Chemistry*, ed. I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine; ED. University Science Books, (1994), Capítulo 3, 123.
9. Brookhaven Protein Databank: www.pdb.org
10. S. Linse, P. Brodin, T. Drakenberg, E. Tulin, P. Sellers, K. Elmdén, T. Grundström, S. Forsén; *Biochemistry*, 26 (1987), 6723
11. C.S. Fullmer, R.H. Wasserman, *The Amino Acid Sequence of Bovine Intestinal Calcium-Binding Protein en Calcium-Binding Proteins: Structure and Function*, ed. F.L. Siegel, E. Carafoli, R.H. Kretzinger, D.H. MacLennan, R.H. Wasserman; ED Elsevier/North Holland, New York (1977), 363.
12. G. Carlström, W.J. Chazin; *J. Mol. Biol.*, 231:2 (1993), 415
13. L.G. Lederer, F.C. Bing; *J. Am. Med. Assoc.*, 114 (1940), 2457
14. A.E. Sobel, H. Yuska, D.D. Peters, B. Kramer; *J. Biol. Chem.*, 132 (1940), 239
15. S.I. Koo, C.S. Fullmer, R.H. Wasserman; *J. Nutr.*, 110:9 (1980), 1813
16. J.D. Bogden, S.B. Gertner, S. Christakos, F.W. Kemp, Z. Yang, S.R. Katz, C. Chu; *J. Nutr.*, 122:7 (1992), 1351.
17. R.A. Corradino, C.S. Fullmer; *Arch. Biochem. Biophys.*, 199:1 (1980), 43
18. S.I. Koo, C.S. Fullmer, R.H. Wasserman; *J. Nutr.*, 108:11 (1978), 1813
19. C.S. Fullmer, T. Oku, R.H. Wasserman; *Environ. Res.*; 22:2 (1980), 386.
20. E.J. Baran; *Química Bioinorgánica*, ED. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A., 1995, Capítulo 18, 241
21. Secretaría del Medio Ambiente, DF: <http://www.sma.df.gob.mx>

22. Centers for Disease Control. *Preventing Lead Poisoning in Young Children*. US Department of Health and Human Services. Atlanta, GA, 1991.
23. R. M. Stapleton; *Lead is a Silent Hazard*, Walker and Company, (1994).
24. S.J. Lippard; *Metals in Medicine en Bioinorganic Chemistry*, ed. I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine; ED. University Science Books, 1994, Capítulo 9, 512
25. <http://www.epa.gov/oia/tips/lead2.htm>
26. M. Lacasaña-Navarro, I. Romieu, L.H. Sanín-Aguirre, E. Palazuelos-Rendón, M. Hernández-Avila; *Rev. Invest. Clin.* , 48:6 (1996), 425
27. T.J. Simons; *Neurotoxicology*; 14:2-3(1993), 77.
28. H.M. Mykkanen, C.S. Fullmer, R.H. Wasserman; *J Nutr.* , 144:1 (1984), 68
29. C.S. Fullmer; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 194:3 (1990), 258
30. C.S. Fullmer, S. Eldestein, R.H. Wasserman; *J Biol. Chem.*, 260 (1985), 6816
31. C.S. Fullmer; *Environ. Res.*, 54:2 (1991), 159
32. P. Washco, R.J. Cousins; *J Nutr.* 107 (1977), 920
33. J.E. Hoadley, D.R. Johnson; *Fundam. Appl. Toxicol.* , 9 (1987), 1.
34. R.L. Bertholf; Zinc, en *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*; ed. por H.G. Seiler, H. Sigel, A. Sigel & M. Decker, (1988), Capítulo 71, 789
35. R.G. Pearson; *J. Am. Chem. Soc.* , 85:22 (1963), 3533; y para difusión: *J. Chem. Ed.* , 45:581 (1968), 581
36. R.G. Parr, R.G. Pearson; *J. Am. Chem. Soc.* , 105:26 (1983), 7512
37. (a) <http://www.webelements.com>; (b) D. Cruz, J.A. Chamizo, A. Garritz; *Estructura Atómica, Un Enfoque Químico*; ED. Addison-Wesley Iberoamericana; (1987) 649

38. G. Wulfsberg; *Principles of Descriptive Inorganic Chemistry*; ED. University Science Books; (1991), 268
39. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter; *Inorganic Chemistry, Principles of Structure and Reactivity*; ED: Harper Collins; (1993).
40. D.F. Schriver, P.W. Atkins, C.H. Langford; *Inorganic Chemistry*, ED. Oxford University Press; (1998), 46.
41. A.K. Katz, J.P. Glusker, S.A. Beebe, C.W. Bock, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996), 5752
42. (a) H. Einspahr, C.E. Bugg; *Acta Crystallogr.*, B37 (1981), 1044; (b) H. Einspahr, C.E. Bugg; *Acta Crystallogr.*, B36 (1980), 264.
43. F.A. Momany, R.F. McGuire, A.W. Burgess, H.A. Scheraga; *J. Phys. Chem.* 79 (1975), 2361
44. Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), actualización a marzo de 2002.
45. L. Shimoni-Livny, J.P. Glusker, C.W. Bock; *Inorg. Chem.* 37 (1998), 1853.
46. F. Barrios; *Tesis. Química de Coordinación del Plomo (II) en medio acuoso en relación con su toxicidad. Estudio Particular de la interacción Pb-Aminoácido*; UNAM, (2001).
47. C.W. Bock, A.K. Katz, J.P. Glusker; *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995), 3754
48. Y-H. Tong, X-M. Chen, S. Weng Ng; *Polyhedron*, 19 (1997), 3363; (b) C-G. Zheng, Y-L. Xie, R-G. Xiong, X-Z. You; *Inorg. Chem. Com.* 4 (2001) 405; (c) J-H. Luo, M-C. Hong, R. Cao, Y-C. Liang, Y-J. Zhao, R-H. Wang, J-B. Weng; *Polyhedron*, 21 (2002), 893; (d) J-C. Dai, X-T. Wu, Z-Y. Fu, C-P. Cui, S-M. Hu, W-X. Du, L-M. Wu, H-H. Zhang, R-Q. Sun; *Inorg. Chem.*, 41 (2002), 1391.

49. P.A. O'Day, S.A. Carroll, G.A. Waychunas; *Environm Sci Technol*, 32 (1998), 943.
50. por ejemplo: (a) C.M.V. Stålhandske, C.I. Stålhandske, M. Sandström, I. Peirsson; *Inorg Chem* 36 (1997) 3167; (b) C.M.V. Stålhandske, I. Peirsson, M. Sandström, E.Kamienska-Piotrowicz; *Inorg Chem* 36 (1997) 3174; (c) A. Neels, H. Stoeckli-Evans; *Inorg. Chem.*, 38 (1999) 6164; D.J.R. Brook, S. Fornell, J.E. Stevens, B. Noll, T.H. Koch, W. Eisfeld; *Inorg. Chem*; 39 (2000) 562; (d) M.C. Capllonch, A. García-Raso, A. Terrón, M.C. Apella, E. Espinosa, E. Molins; *J. Inorg. Biochem.* 85 (2001) 173; (e) M. Zucolotto Chalaça, J.D. Figueroa-Villar, J.A. Ellena, E.E. Castellano; *Inorg. Chimica Acta*, 328 (2002) 45-52.
51. S. Canepari, V. Carunchio, P. Castellano, A. Messina; *Talanta*, 47 (1998), 1077.
52. M. Laing, *South Afr. J. Sci.* 87 (1991) 285.
53. (a) S. Linse, W.J. Chazin; *Protein Sci*; 4:6 (1995), 1038; (b) W. Chazin, I.D. Veenstra; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:6 (1999), 548; (c) M. Akke, N. Skelton, J. Kordel, A.G. Palmer, W.J. Chazin; *Biochemistry*, 32:37 (1993), 9832; (d) N. Skelton, J. Koerdel, M. Akke, W.J. Chazin; *J. Mol. Biol.*, 227:4 (1992), 1100; (e) M. Akke, S. Forsén, W.J. Chazin; *J. Mol. Biol.*, 252:1 (1995), 102; (f) J. Matysik, A. Alia, G. Nachtegaal, H.J. van Gorkom, A.J. Hoff, H.J.M. de Groot, *Biochemistry*, 39:23 (2000), 6751.
54. (a) J. Li, E. M. Perdue, L.I. Gelbaum; *Environm Sci Technol.*, 32 (1998), 483; (b) D.C. Bebout, S.W. Stokes, R.J. Butcher; *Inorg Chem*, 38 (1999), 1126.
55. P.W. Atkins; *Physical Chemistry*; ED Oxford University Press; 3rd ed. (1987) 82.
56. G.H. Ayres; *Análisis Químico Cuantitativo*; ED. Harla; (1970), 55
57. H. Irving, R.J.P. Williams, *Nature*, 162 (1948), 746; *J. Chem Soc* (1953) 3192.

58. R.B. Martin; *Bioinorganic Chemistry of Toxicity*, en *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*; ed. por H.G. Seiler, H. Sigel, A. Sigel & M. Decker, (1988), Capítulo 2, 17.
59. A.E. Martell, R.M. Smith, R.J. Motekaitis; *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal complexes*, Ver 6. 2001.
60. A.K. Brisdon; *Inorganic Spectroscopic Methods*; ED. Oxford University Press; (1998).
61. J.A. Iggo; *NMR Spectroscopy in Inorganic Chemistry*; ED. Oxford University Press, (1999).
62. H. Günther; *NMR Spectroscopy*; ED. John Wiley & Sons, Ltd.; 2a. ed; (1998)
63. P.J. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*; ED. Oxford University Press, (1995).
64. H. Friebolin; *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, ED. VCH, (1993), Capítulo 10, 275
65. (a)<http://picasso.ucsf.edu/mardi.html>; (b)B. A. Borgias and T. L. James, *J. Magn Reson.* 87 (1990) 475-487; (c)B.A. Borgias and T. L. James, *Meth. Enzymol.* 176 (1989); (d)B.A. Borgias, M. Gochin, D.J. Kerwood, and I.L. James, en *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, J.W. Emsley, J. Feeney, and L.H. Sutcliffe (Eds), Oxford: Pergamon Press, 22, 83-100 (1990)
- (e)<http://www.specres.com>; (f)J.N.S. Evans; *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, UK (1995) 139.
66. P. Güntert, C. Mumenthaler, K. Wüthrich; *J Mol. Biol.*, 273, (1997), 283
67. L. Pauling; *General Chemistry*; ED. Dover Publications Inc., (1988), 881.
68. C.J. Pouchert; *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, (1981), 337, 435-4.

69. A.D. Irwin, C.D. Chandler, R. Assink; *Inorg Chem.*, 33:6 (1994), 1005
70. T. Takayama, S. Ohuchida, Y. Koike, M. Watanabe, D. Hashizume, Y. Ohashi; *Bull Chem. Soc Jpn*; 69 (1996) 1579
71. M.F. Summers; *Coord Chem Rev*, 86, (1988) 43
72. P. Granger; *Groups 11 & 12: Copper to Mercury*, en *Transition Metal Nuclear Magnetic Resonance*, ed. P.S. Pergosin, 1a ed. (1991), 303

Capítulo 2. Sección Experimental

1. R.F. Jameson, M.F. Wilson; *J. Chemical Society, Dalton Trans* (1972) 2607
2. I. Puigdomenech; MEDUSA. 1998
3. H. Schmidt baur, I. Bach, D.L. Wilkinson, G. Müller; *Chem. Ber.* 122 (1989) 1439
4. J. Fait, XSCANs (release 2 21) Users Manual, Siemens Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, USA (1996)
5. G.M. Sheldrick, SHELXTL-plus, release 5 10, Siemens Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, USA (1998); G.M. Sheldrick, SHELX97 Users Manual, University of Göttingen, Germany (1997).

Capítulo 3. Interacción con Aminoácidos

1. G. Barnard, I. Boddington, J. Gregor, L. Pettit; *Talanta*, 37 (1990), 219
2. G. Heijne, W. van der Linden; *Talanta*, 22, (1975) 923
3. R. Lumb, A. Martell; *J Phys Chem*, 57, (1953) 690
4. M. Kodama; *Bull Chem. Soc Jap*, 47 (1974) p1547-1548
5. M. Maeda, K. Okada, Y. Tsukamoto *et al*; *J Chem Soc. Dalton Trans*, (1990) 2337
6. R. Diez-Caballero, *et al*; *Bull Soc. Chim Fr*, II, (1985), 688

7. E. Bottari, M. Festa, R. Jasionowska; *J. Coord Chem*, 20 (1989), 209
8. C. Blaquiere, G. Berthon; *Inorg Chim Acta*, 135, (1987) 179
9. A. E. Martell, R. M. Smith, R. J. Motekaitis; *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal complexes*, Ver. 6. 2001
10. Schmidt baur, *et al*; *Chem Ber.*; 122, (1989), p.1433
11. R. J. Abraham; *The Analysis of High resolution NMR spectra*, Elsevier, 1971, p.46-83
12. Schmidt baur, H., Bach, I., Wilkinson, D.L., Müller, G; *Chem Ber.*, 122. (1989), 1439
13. L. Kryger, S.E. Rasmussen; *Acta Chem. Scand*; 27 (1973), 2674
14. Schmidt baur, H., Bach, I., Riede, J., Müller, G, Helbig, J, Hopf, G; *Chem Ber.*, 120, (1987), 867
15. Schmidt baur, H, Müller, G., Riede, J., Manninger, G., Helbig, J.; *Angew Chem. Int Ed Engl*, 25, 11(1986), 1013
16. H. Einspahr, C. E. Bubb; *Acta Cryst. Sect B.*, 30 (1974), 1037
17. C.M. Gramaccioli; *Acta Cryst.*, 21 (1966), 600
18. D.W. Tomlin, T.M. Cooper, S.M. Cline, J.M. Hughes, W.W. Adams, *Acta Cryst., Sect C. (Cr. Str. Comm)*, 53 (1997), 1815
19. R. W. Wyckoff, *Crystal Structures*, vol. 2, Wiley, (1964), 480
20. L. Shimoni-Livny, J.P. Glusket, C.W. Bock; *Inorg. Chem*; 37 (1998) 1853
21. G. Wilkinson, *Comprehensive Coordination Chemistry*, vol. 5, Pergamon Press, Oxford, UK, 1987
22. K. Nakamoto *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th ed. John Wiley & Sons, 1986

23. (a) L. Gasque, S. Bernès, R. Ferrari, C. R. de Barbarín, M. J. Gutiérrez, G. Mendoza-Díaz; *Polyhedron*, 19 (2000) 649; (b) L. Gasque, S. Bernès, R. Ferrari, G. Mendoza-Díaz; *Polyhedron*, 21 (2002) 935.
- 24 M Witanowski, L. Stefaniak, G.A Webb; *Annu Rep. NMR Spectrosc* ; 18, 1, (1986)
- 25 (a) O F Z. Khan, P O'Brien; *Polyhedron*; 10, (1991), 325; (b) P.S. Marchetti, S. Bank, T W. Bell, M.A. Kennedy, P.D. Ellis; *J American Chemical Society*, 111 (1989) 2063; (c) M.A Kennedy, J.L Sessler, T Murai, P.D. Ellis; *Inorg Chem* ; 29 (1990), 1050 (d) P J Barrie, A. Gyani, M Motevalli, P. O'Brien; *Inorg Chem* ; 32 (1993) 3862.
- 26 H.O Kalinowski, S Berger, S. Braun, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Wiley, Chichester, UK, (1988) 228
- 27 A.D. Irwin, C.D Chendler, R Assink, M J Hampden-Smith, *Inorg Chem*. 33 (1994) 100.

Capítulo 4. Interacción con Glyglu

1. B.J. Marsden, G.S. Shaw, B D. Sykes, *Biochem Cell. Biol* 68 (1990) 587
2. http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/
- 3 A Gergely, E. Farkas, *J Chem. Soc Dalton Transactions*, (1982) 381
- 4 J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter, *Inorganic Chemistry Principles of Structure and Reactivity*, 4a ed, Harper Colins, NY (1993) 548.
5. Ejemplos de polímeros de Cd(II): (a) A B Corradi, L. Menabue, M. Saladini, M Sola, L.P. Battaglia, *J Chem Soc Dalton Trans* . (1992), 2623. (b) J Yamada, H. Hashimoto, Y. Inomata, I Takeuchi, *Bull Chem Soc. Jpn.*, **67** (1994), 3224 (c)

- H.C López-Sandoval, N. Barba-Behrens, S. Bernès, N. Farfan-García, H. Höpfl, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997), 3415
6. A.L. Spek, *PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool*, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands (1998).
 7. (a) L. Gasque, S. Bernès, R. Ferrari, C. R. de Barbarín, M. J. Gutiérrez, G. Mendoza-Díaz; *Polyhedron* 19 (2000) 649; (b) L. Gasque, S. Bernès, R. Ferrari, G. Mendoza-Díaz; *Polyhedron*, 21 (2002) 935
 8. M.F. Summers; *Coord. Chem. Rev.*, 86 (1988) 43
 9. P. J. Barrie, A. Gyani, M. Motevalli, P. O'Brien, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 3862
 10. H. O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Wiley, Chichester, UK, (1988) 228
 11. A.D. Irwin, C.D. Chendler, R. Assink, M. J. Hampden-Smith, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 100.
 12. A.E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants* vol. 3, Plenum Press, N.Y. (1997)
 13. R.B. Martin, *Bioinorganic Chemistry of Toxicity*, in *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds* ed Seiler, Sigel & Sigel, pub. M. Decker, N.Y. (1988), 17
 14. R. G. Pearson; *J. Am. Chem. Soc.*, 85:22 (1963) 3533

Capítulo 5. Interacción con Tripéptidos

1. Marsden, B.J, G.S. Shaw, B.D. Sykes; *Biochem. Cell Biol.* 68 (1990) 587.
2. http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/
3. F. A. Momani, R.F. McGuire, A.W. Burgess; H.A. Sheraga, *J. Phys. Chem.* 79 (1975), 2361

4. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter, *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4th ed., Harper Collins, NY (1993) 548.

Capítulo 6. Interacción con el Dodecapéptido

- 1 (a) M. Akke, N.J. Skelton, J. Kördel, A. Palmer, W.J. Chazin, *Biochemistry*; 32 (1993), 9832. (b) S. Forsén, J. Kördel, *Acc Chem Res*; 26 (1993) 7; (c) S. Linse, S. Forsén, in *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*; ed. por A.R. Means ED. Raven Press Ltd, 30 (1995) 89.
2. (a) S. Linse, W.J. Chazin; *Protein Sci*; 4:6 (1995) 1038; (b) W. Chazin, T.D. Veenstra; *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:6 (1999) 548; (c) N. Skelton, J. Koerdel, M. Akke, W.J. Chazin; *J Mol. Biol.*, 227:4 (1992), 1100; (d) M. Akke, S. Forsén, W.J. Chazin; *J. Mol. Biol.*, 252:1 (1995), 102; (e) J. Matysik, A. Alia, G. Nachtegaal, H.J. van Gorkom, A.J. Hoff, H.J.M. de Groot, *Biochemistry*, 39:23 (2000), 6751
3. S. Linse, P. Brodin, T. Drakenberg, E. Tulin, P. Sellers, K. Elmdén, T. Grundström, S. Forsén; *Biochemistry*, 26 (1987), 6723
4. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter; *Inorganic Chemistry, Principles of Structure and Reactivity*; 4th ed. (1993) 114
5. (a) C.S. Fullmer, S. Eldestein, R.H. Wasserman, *J Biol. Chem*, 260 (1985), 6816; (b) C.S. Fullmer, R.H. Wasserman, *Bovine Intestinal Calcium-Binding Protein: Cation-Binding Properties, Chemistry and Trypsin Resistance en Calcium-Binding Proteins and Calcium Function*, ed. R.H. Wasserman, R.A. Corradino, R.A. Carafoli, R.H. Kretzinger, D.H. MacLennan. F.L. Siegel; ED Elsevier, New Holland, NY (1977), 303; (c) R.J. Ingersoll, R.H. Wasserman; *J Biol Chem*; 246 (1971) 2808

- 6 Evans, J.N.S.; *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, UK (1995) 139,169
- 7 Akke, M., Drakenberg, T , Chazin, W.J.; *Biochemistry*, 31, (1992), 1011
- 8 H. Sigel, R.B Martin; *Chem Rev* , 82 (1982), 385
- 9 G. Wulfsberg; *Principles of Descriptive Inorganic Chemistry*; ED. University Science Books; (1991), 247

Anexos

Anexo I.

Manual Para el Manejo y Procesamiento de Datos del Titulador

En esta sección se explica el uso del titulador Titrino 702 de Metrohm, con el que cuenta el grupo de trabajo en el que se desarrolló este proyecto.

En la Figura A1.1 se presenta un esquema simplificado del equipo empleado para las titulaciones, en él se aprecian las siguientes partes: una computadora (A), un titulador automático (B), un agitador magnético (C), un baño termostato (D), un electrodo (E), un tanque de nitrógeno (F) y una celda “forrada”(de doble pared, para recibir el flujo del baño termostato)

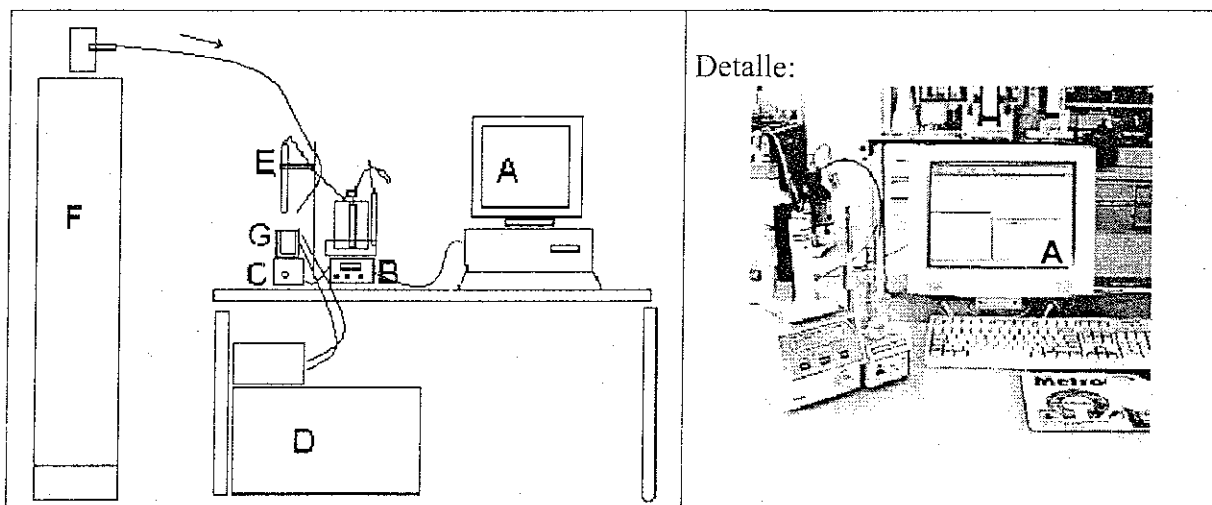


Figura A1.1. Esquema de los dispositivos para titulación automatizada.

Es necesario asegurarse de que las conexiones estén en buen estado y bien hechas, para evitar problemas en los experimentos. La computadora, el potenciómetro y el agitador deben estar directamente conectados al titulador. El baño está conectado a una celda en

donde se realizan los experimentos, en esta celda se colocan el electrodo, el magneto, el tubo que suministra el N_2 y cuando se requiera, el dosificador de la disolución titulante.

Las disoluciones requeridas para el buen uso del titulador (calibración y normalización) se encuentran descritas en el inciso A1.5.

A1.1. Preparación de la celda.

Conectar la celda limpia al baño termostato y encender tanto la bomba de circulación como el sistema de refrigeración. Verificar la temperatura establecida en el baño para el termostato.

Colocar un volumen conocido de la disolución que se medirá, tapparla y dejarla con agitación, bajo el burbujeo de N_2 por 10 minutos, tiempo en que la disolución tomará la temperatura del baño.

Se destapa el electrodo, se enjuaga, y si no se ha usado, recientemente, hay que ponerlo en un tubo con disolución de HCl 1M, durante un minuto, y después cambiarlo a otro tubo que contenga NaOH 1M, por otro minuto y cambiarlo alternativamente de NaOH a HCl.

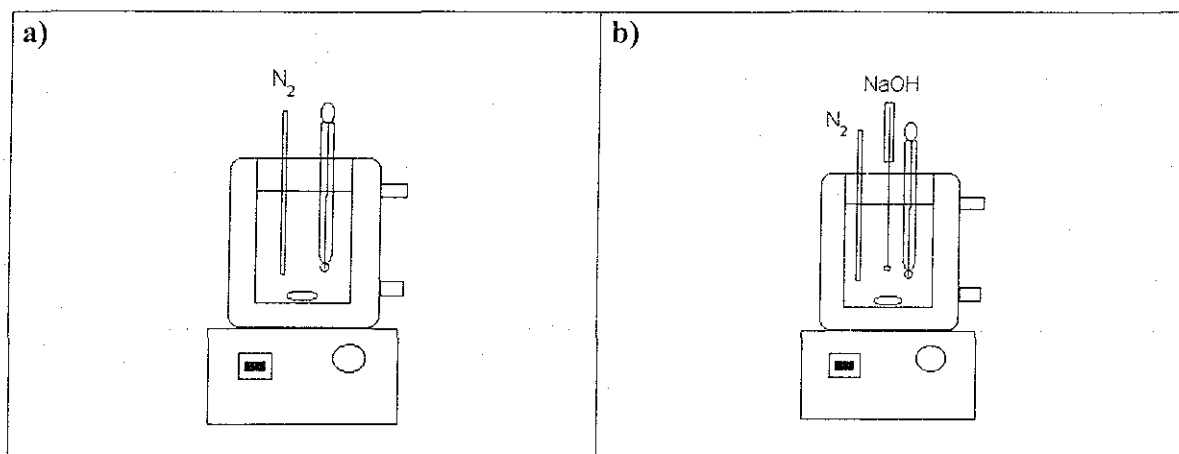


Figura A1.2. Esquema de la celda preparada para (a) calibración y (b) titulación

Finalmente el electrodo limpio se coloca en la celda, como se muestra en la Figura A1.2 (a), en el caso de que se pretenda calibrar el electrodo y 2(b) en el caso en que se pretenda hacer una titulación con NaOH.

A1.2. Ajuste del electrodo.

A1.2.1. Diseño de un método de calibración.

En la computadora, entrar al programa 702¹ (2° botón en la barra de office denominado “titulador”). Se puede basar en algún método de calibración ya establecido [User Method]/[Recall]: *, o simplemente seleccionando el modo CAL: [MODE]/[Selected Mode]: CAL; [MEAS quantity]: pH. Se deben fijar los valores de pH de las disoluciones que se utilizarán como parámetros para establecer la relación entre los valores de potencial que mida el electrodo y los valores de pH correspondientes: [MODE]/[Parameters]/[Calibration parameters]/[Buffer]/[Buffer 1 pH]: x (Figura A1.3). Se establecen tantos valores de pH como disoluciones reguladoras se pretenda usar, con un máximo de 9. La cantidad de medidas se establecerá pues si se pretende hacer 3 medidas, el cuarto valor quedará establecido como **OFF** mediante el uso de la tecla de función [F5].

Es importante que tras establecer cualquier valor o nombre en un cuadro del programa 702, se pulse intro(↵), ya que sino no se aplicarán los cambios.

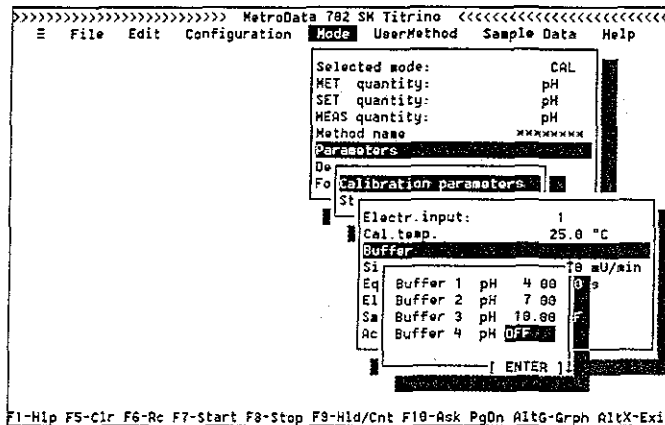


Figura A1.3. Calibración del electrodo. Valores de pH de Buffer a usar.

Finalmente se archiva el método generado en [User Meted]/[Store]/[Name]:*. Para usar este método y definirlo en el titulador es necesario invocarlo mediante [User Meted]/[Recall]/[Name]:* (Figura A1.4)

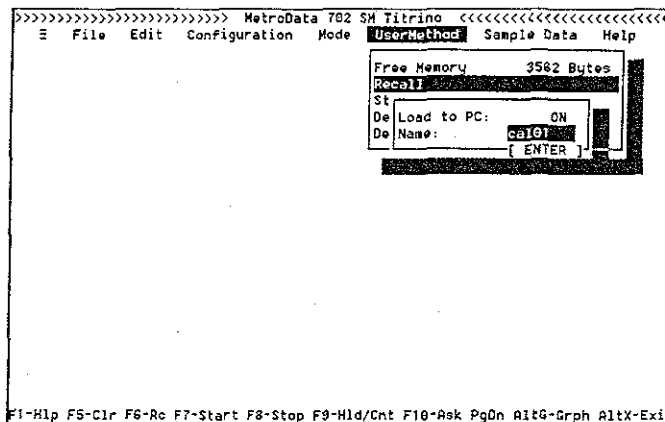


Figura A1.4. Pantalla de 702 SM Titrino, controlador del titulador

A1.2.2 Calibración del electrodo

Se colocan en la celda 25 mL aproximadamente de la disolución reguladora pH=4 (ver sección A1.5)

En el elemento [User Method] del programa 702 se invoca al método en [Recall] escribiendo por ejemplo cal01 en el renglón [Name]. (Figura A1.4)

Si hay algún problema en la conexión de la computadora con el portenciómetro, aparecerá un mensaje de error en la computadora y en la pantalla del equipo no habrá cambio. De haber buena conexión, aparecerá el nombre del método (cal01) y el último dato determinado, como se muestra en la Figura A1.5.

CAL	cal01
pH(as) 6.91	slope 0.993

Figura A1.5. Pantalla del titulador al establecer el método cal01

Posteriormente ir a **[EDIT]/[Info]/[Live plot]**, aquí se da el nombre del archivo a generar, es decir:

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

y en el renglón inferior se pone el archivo con el mismo nombre pero la extensión anterior, es decir:

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

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

El programa está diseñado para almacenar resultados de forma secuencial, por lo que automáticamente al comenzar otra determinación, generará un archivo con la extensión sucesiva a la declarada inicialmente.

Una vez transcurridos los 10 minutos, se verifica que la temperatura de la celda esté a 25°C y se oprime **[start plot]** en la computadora, entonces, aparece un mensaje en el titulador que pregunta si la temperatura es de 25°C, se oprime **[F7=start]**, después el titulador “pide” la primera disolución reguladora, que en el caso del método cal01 es pH=4; se oprime nuevamente **[F7=start]**, comienza la calibración y en la pantalla de la computadora se despliegan los ejes coordenados y una pequeña recta o un punto.

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

pH=4, 173mV

Cuando el titulador termina con el primer pH, despliega un mensaje pidiendo la segunda disolución reguladora, pH = 6.87. Entonces se desecha la disolución anterior, se lava y seca la celda y se coloca la nueva disolución de pH=6.87, la que se deja estabilizando con agitación y burbujeo de N₂, por diez minutos y se repite el mismo procedimiento que con la disolución pH=4. En el caso de las disoluciones reguladoras no es necesario que el volumen sea medido con exactitud.

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

pH=4	173mV
pH=6.86	5mV
pH=9.18	-131mV

y los datos finales $pH_{as}=7$ y $m=0.999$, sustituirán a los datos originales en la pantalla mostrada en la Figura A1.5.

Estos datos nos sirven para corroborar si la respuesta del electrodo es correcta y si el equipo la está procesando adecuadamente. Para ello se realiza una gráfica como la que se muestra en la Figura A1.6.

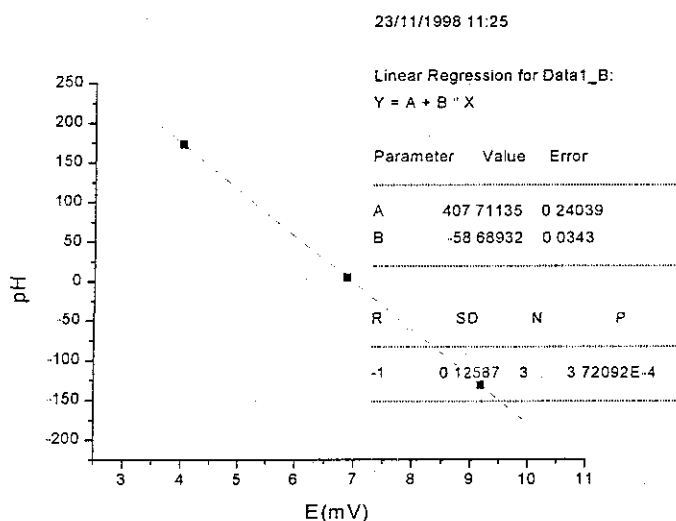


Figura A1.6. Gráfica de calibración del electrodo. Regresión lineal

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

A1.3. Obtención de datos

A1.3.1. Diseño de un método de titulación.

Se puede basar en algún método de titulación ya establecido [User Method]/[Recall]: *, o simplemente al seleccionar el modo MET [MODE]/[Selected Mode]: MET; [MET quantity]: pH. Las variables que se deben fijar de acuerdo con las condiciones del experimento son:

- El volumen máximo de adición de titulante = x en el experimento:

[MODE]/[Parameters]/[Stop conditions]/[Volume Stop]/[Volume]/[Type]:

Abs; [Volume]: x (Figura A1.7) o el pH = y de punto final:

[MODE]/[Parameters]/[Stop conditions]/[Stop Meas]: y. (Figura A1.8)

- El valor x se puede decidir por los equivalentes de ácido que se sabe se neutralizarán durante la titulación con un exceso de 1 o 2 ml.

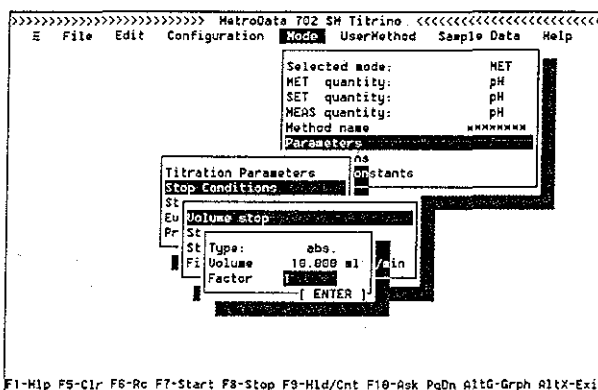


Figura A1.7. Fijando el volumen final de titulación

- El valor y se puede definir por el pH de inicio de precipitación de el catión metálico o el máximo alcanzable por la concentración del titulante.

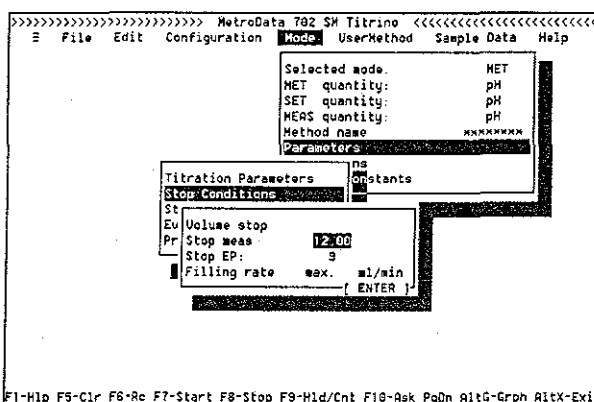


Figura A1.8. Fijando el pH final de titulación

- El volumen de los pasos de adición en la titulación= Δx (Figura A1.9)

$$[\text{MODE}]/[\text{Parameters}]/[\text{Titration Parameters}]/[\text{V Step}]$$
 Δx El mínimo es de 0.001ml. En caso de definirse 0, se mide el potencial como función del tiempo

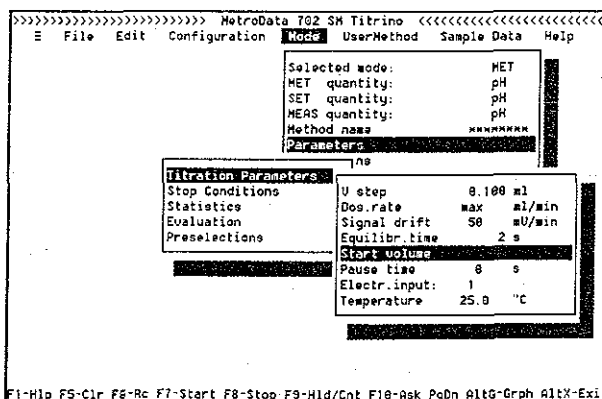


Figura A1.9. Parámetros de la titulación

- El tiempo de espera (s) entre la adición de titulante y la lectura de potencial, para garantizar el estado de equilibrio. Puede tomar valores de 0 a 9999s. (Figura A1.9) **[MODE]/ [Parameters]/[Titration Parameters]/[Equilibr.time]: t.**
 - Esta variable puede ser calculada automáticamente si se define una razón de cambio de mV/min **[MODE]/[Parameters]/[Titration Parameters] /[Signal Drift]: $\Delta V/\Delta t$**
- Es importante que el número de datos que se generen durante la titulación (pej. $x/\Delta x$) no exceda el valor establecido en “plot points” **[PgDn]/[Setup Graphic]/[plot points]: #** (Figura A1.10). De excederse los primeros puntos de la titulación se eliminarán del archivo de salida. Es por ello esencial fijar las condiciones finales de la titulación.

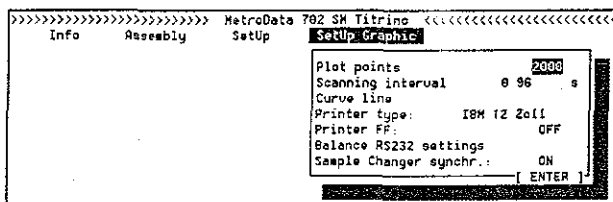


Figura A1.10. Estableciendo el número de puntos para la graficación.

Finalmente se archiva el método generado en **[User Meted]/[Store]/[Name]:***. Para usar este método y definirlo en el titulador es necesario invocarlo mediante **[User Meted]/[Recall]/[Name]:*** (Figura A1.4)

A1.3.2 Normalización del NaOH

Una vez calibrado el electrodo, se cambia de método a “**BIF**” como se describió para el método **cal01**. El método BIF está diseñado para hacer la valoración de disoluciones patrón de biftalato de potasio a fuerza iónica constante.

Se miden con exactitud 25 mL de la disolución de biftalato de potasio 0.02M a fuerza iónica 0.1 (ver final) y se colocan en la celda del titulador, con agitación y burbujeo de

N₂. Se tapa y se deja por diez minutos para que llegue a 25°C, en tanto se coloca el electrodo, y el dosificador de NaOH (~0.1N), previamente lavados, como se muestra en la Figura A1.2 b.

Se procede a cambiar el nombre de los archivos que se van a generar, por ejemplo.

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

Como se describió para los archivos de calibración.

Una vez transcurridos los 10 minutos, se pone [start plot], se verifica que todo esté en su lugar. En la pantalla de la computadora aparece un mensaje “ready”, entonces se oprime [F7=start].

Es importante señalar que cualquier interrupción en la titulación, como el protector de pantalla, o el cambio a alguna otra función impiden que los datos sean almacenados.

La pérdida de energía eléctrica aunque sea por segundos arruinan el experimento.

Cuando se concluye la titulación debe esperarse hasta que aparezca el mensaje de “transfer finish”, ya que salir antes de la ventana de graficación provoca la pérdida irreparable de los datos.

A1.3.3 Normalización del ácido

Una vez terminados al menos 3 de estos experimentos, se procede a titular el ácido preparado para la normalización, es decir 5 mL de HCl o HNO₃ 0.1N llevados a aforo de 25 mL con KNO₃ 0.1M.

El volumen de HCl 0.1N se agrega al matraz aforado mediante un método del titulador denominado desalajo.

IMPORTANTE: En el menú [MODE]/[Parameters]/[Stop conditions]/[Volume Stop]/[Volume]: establecer 5ml.

Para agregar este volumen de ácido, se retira del aparato el dispositivo dosificador de NaOH, remplazándose por el de ácido. Se puede, entonces, desde los botones inferiores a la pantalla del titulador activar la dosificación del ácido oprimiendo el botón **[start]**. Automáticamente se interrumpirá la adición cuando se agreguen 5ml. Se preparan 3 matraces y se llevan a aforo con la disolución de KNO_3 .

Para el proceso de titulación del ácido se selecciona el método **HC**.

A1.4. Procesamiento de datos.

A1.4.1. Formateo e importación de archivos.

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

Primeramente se debe tener los datos en archivos útiles para ser leídos por el HyperQuad (software con el que se obtienen constantes de equilibrio a partir de los datos de la titulación –Anexo 2-), y por algún graficador, en este caso por ORIGIN.²

Los archivos que genera el titulador (*.00#) son de texto y pueden editarse en el “bloc de notas” de Windows. Contienen en principio la información del programa que sigue la titulación, y es a partir del renglón que dice “V/ml” y “pH” que comienzan los datos útiles. Al final del archivo se encuentran también unos renglones correspondientes a los cálculos que el sistema titulador hace respecto de los puntos de equivalencia. Tanto lo correspondiente al método, como estos datos finales se borran del archivo que se guarda entonces con extensión .txt o .dat para ORIGIN, y quitando también el encabezado “V/ml” y “pH” con extensión *.ipd para Hyperquad2000NT.

En el software ORIGIN® se puede, en una hoja de trabajo nueva (Figura A1.11 a), importar los datos en formato ASCII de la titulación del archivo txt o dat (Figura A1.11 b)

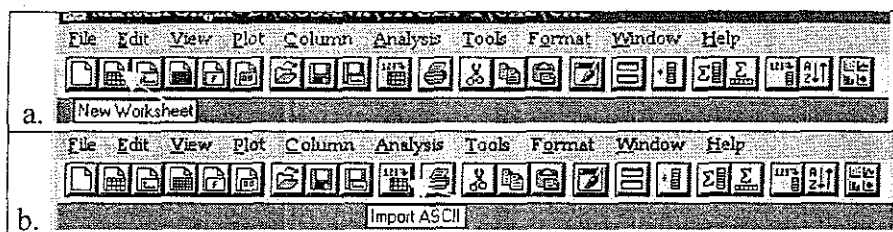


Figura A1.11. Instrucciones para la importación de datos de titulación a ORIGIN®

A1.4.2 Punto de equivalencia

Se puede entonces generar la curva de titulación graficando directamente los datos de la tabla (Figura A1.12). Se presiona el icono para hacer una nueva gráfica (1), se seleccionan los datos con el nombre de la hoja de cálculo que contiene los datos y el nombre de la columna que tiene a las ordenadas y se pasa a la ventana del contenido de la gráfica(2), y al aceptar (3) se despliega la gráfica.

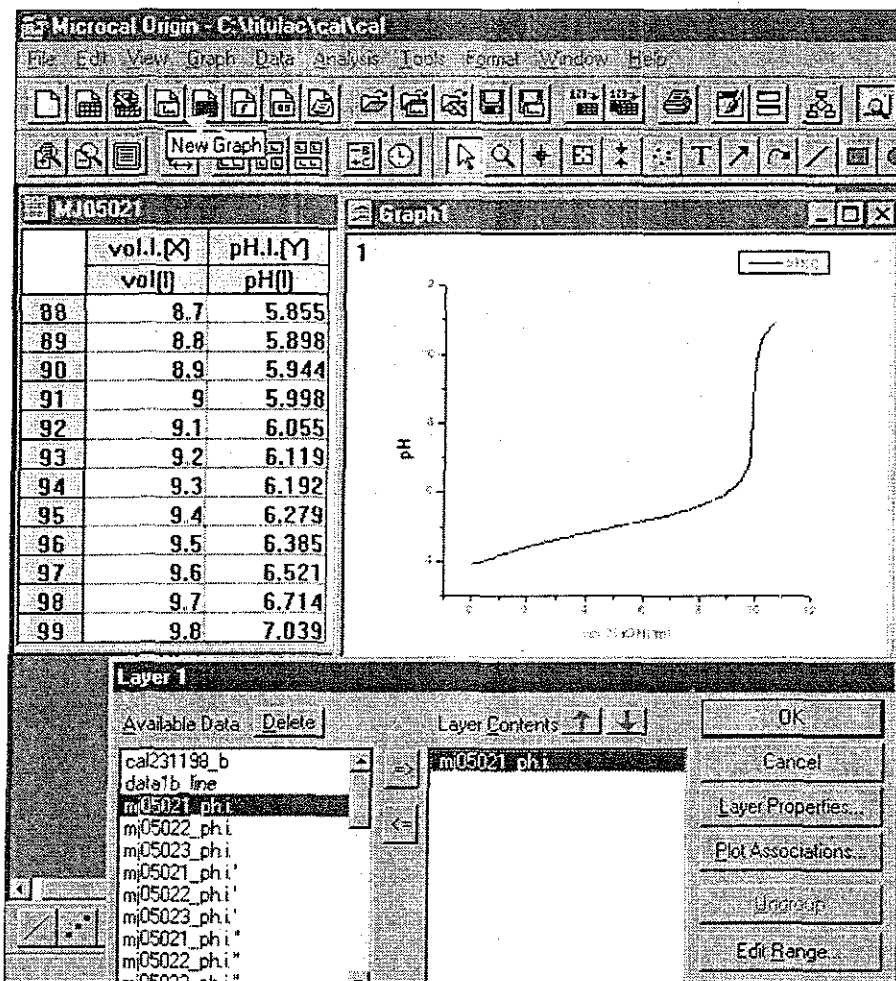


Figura A1.12. Graficación de datos en ORIGIN

Posteriormente se determina la primera y segunda derivada de la curva, para conocer el volumen en el punto de equivalencia, mediante la herramienta que se muestra en la Figura A1.13.

Se solicita en el formato de los ejes que se coloque una línea en $y=0$ (Figura A1.14), invocando las propiedades del eje x en [Format] → [Axes] → [x Axis] → [Grid Lines]. Ampliando la vista de la gráfica mediante la lupa que se encuentra en la barra de herramientas se puede obtener un valor de punto muy cercano a cero en y al dar un clic con el botón izquierdo del mouse en la intersección de la curva de segunda derivada con la línea en $y=0$, en la parte superior de la ventana aparecen las coordenadas en las que se

encuentra esta cruz, de esta manera se puede conocer con mucha precisión el valor de volumen (x) que corresponde al punto de equivalencia (Figura A1.15).

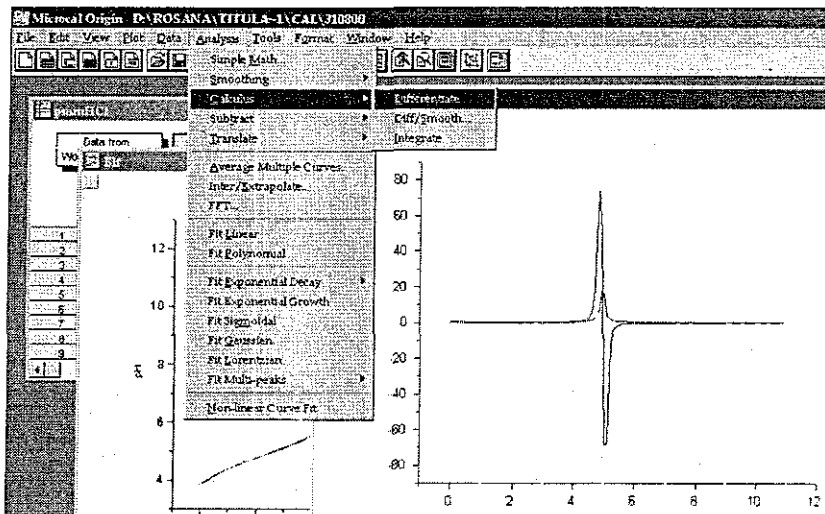


Figura A1.13. Determinación de punto de equivalencia por derivación

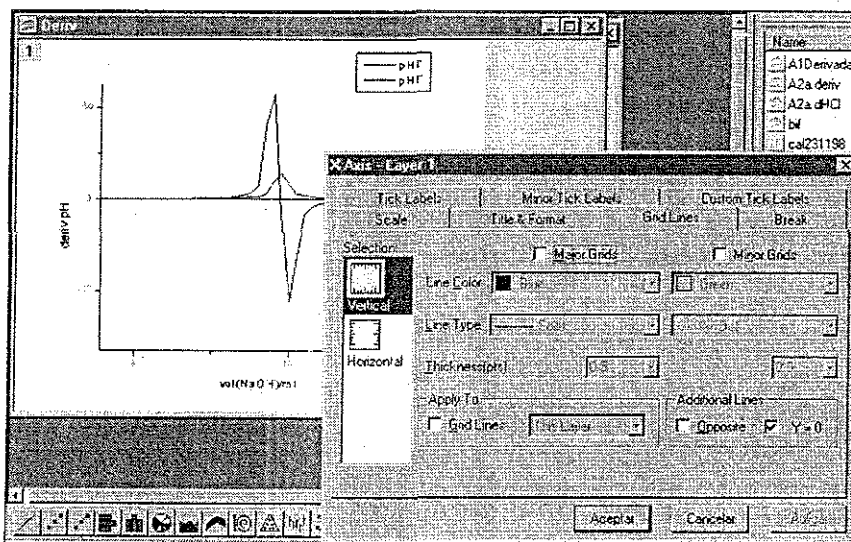


Figura A1.14. Línea en y=0

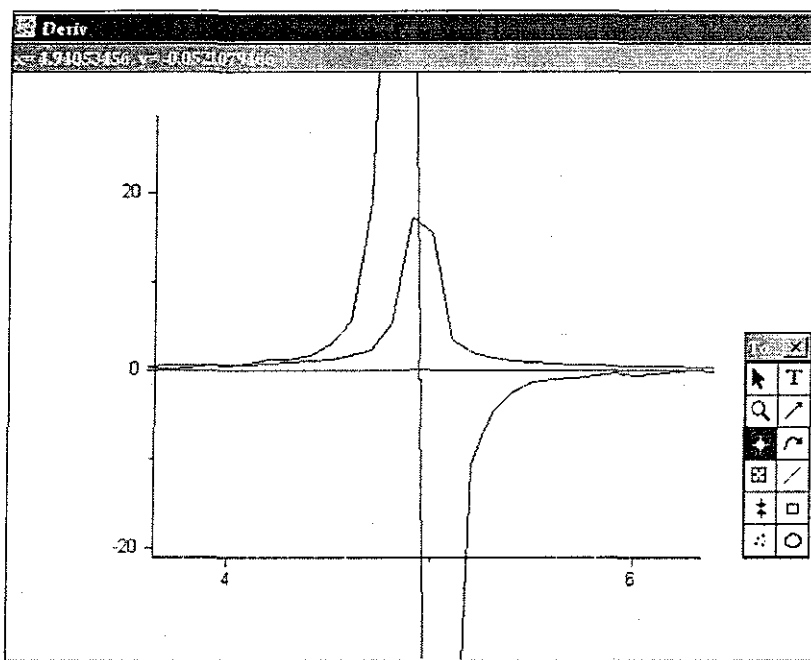


Figura A1.15. Valor del cruce de la segunda derivada con y=0

Este valor de volumen, junto con la concentración de la disolución de biftalato de potasio permite conocer la concentración del NaOH empleado, mediante el siguiente cálculo:

Si la concentración de biftalato es de 0.01990M

$$(0.25L) \frac{0.01990 \text{ mol}}{1L} = 0.0004975 \text{ mol de biftalato}$$

Como reacciona uno a uno con la NaOH:

$$[NaOH] = \frac{0.0004975 \text{ mol}}{0.00494L} = 0.1007M$$

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

El siguiente paso es trabajar con los archivos generados en la titulación de HCl, análogamente a lo que se realizó con los datos de Biftalato se generan archivos de texto que contengan únicamente los valores de la titulación. Se genera entonces, en ORIGIN, una tabla de datos importada en código ASCII, como se describió.

Con el valor del volumen de NaOH a la equivalencia se puede calcular la concentración del HCl, mediante un procedimiento análogo al realizado con el biftalato.

A1.4.3. Método de Gran. Cálculo del porcentaje de carbonato en el NaOH titulante.

El método de Gran^{3,4} ha probado ser excelente para la determinación de los puntos de equivalencia. En una titulación ideal los puntos anteriores al punto de equivalencia, al aplicárseles la función $\varnothing = (V+v) \times 10^{-pH}$ deben dar una recta, así como los posteriores al punto de equivalencia al aplicarse la función $\varnothing = (V+v) \times 10^{pH}$. Las rectas se intersectarán en $\varnothing = 0$ en el volumen de equilibrio. Sin embargo, si hay carbonato contaminando al hidróxido, los puntos posteriores al punto de equivalencia presentarán una curvatura para finalmente seguir un comportamiento lineal.

Para hacer la determinación del % de CO_3^{2-} se añaden dos columnas en las hojas de cálculo con los datos de la titulación al ácido. En la primera columna se declaran los valores como se muestra en la Figura A1.16 (definir valores de la columna=[Ctrl+Q]): con la función $(25+col(V.ml)) \times 10^{-(col(pH))}$.

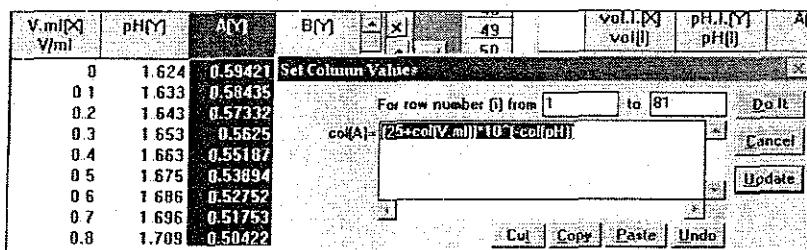


Figura A1.16. Cálculo de la función de Gran

En la segunda columna de igual manera se definen los datos declarando los valores de la columna como $25+col(V.ml) \times 10^{(col(pH))}$.

Para poder poner en diferente escala las dos series de datos, es necesario agregar un eje a la gráfica en el lado derecho, conservando las mismas abscisas, como se muestra en la

Figura A1.17). De cada columna se eliminan los datos que constituyen una asíntota a 0 al construir la gráfica.

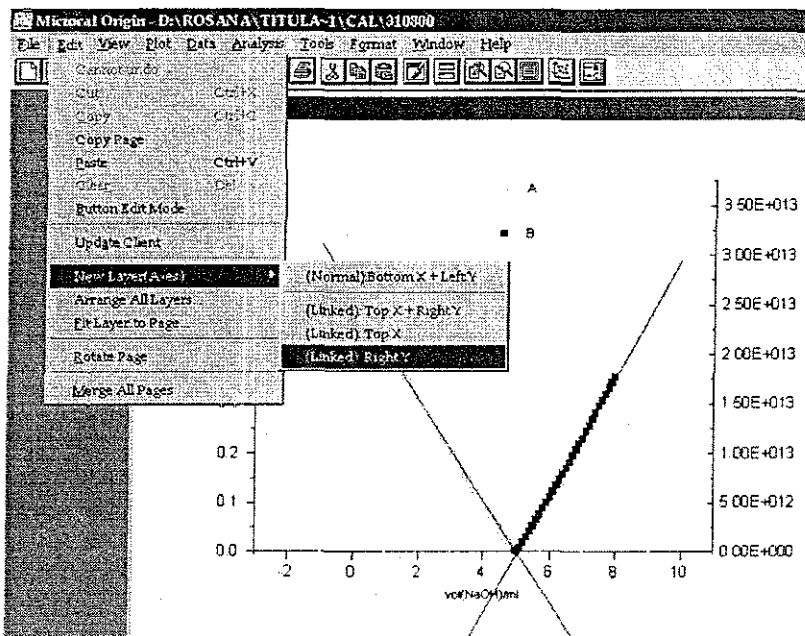


Figura A1.17. Agregando un eje de ordenadas dependiente del mismo eje de abscisas

Aparecen dos cuadros al lado izquierdo de la gráfica con los números 1 y 2. Se hace clic en el número 1 para agregar los datos de la primera columna con los valores calculados por el método de Gran, y se hace clic en el botón 2 para agregar los valores de la segunda columna de valores calculados.

Con ayuda de los datos obtenidos en las regresiones lineales de cada serie de puntos se calcula el porcentaje de CO_3^{2-} en la NaOH como se muestra en el siguiente ejemplo:

$A_1 = 0.51796$	$A_2 = -3.04204 \times 10^{13}$
$B_1 = -0.10351$	$B_2 = 6.00511 \times 10^{12}$
$R_1 = -0.99987$	$R_2 = 0.99977$

Si $y=A+Bx$, entonces cuando $y=0$, $x_1=5.0039$ y $x_2=5.06575$, estos valores se alimentan a la siguiente ecuación:

$$\frac{x_2 - x_1}{2x_2} \cdot 100 = \% \text{CO}_3^{2-}$$

$$\frac{5.06575 - 5.0039}{2 \times 5.06575} \cdot 100 = 0.61$$

Para poder usar la disolución de NaOH se recomienda tener un valor de %CO₃²⁻ menor al 2%. De no ser así, en el momento de determinar los equilibrios se debe declarar el CO₃²⁻ como una especie presente ya que interfiere en los experimentos. En este trabajo sólo se usó NaOH con contenido de CO₃²⁻ aceptable.

Se registran valores promedio tanto de % de CO₃²⁻ como de la concentración del ácido

Al.5. Disoluciones de trabajo

Para el trabajo con el titulador se requiere de las siguientes disoluciones, ya que se trabajará a 25°C:

1. Disoluciones reguladoras (o buffer):⁵

a) pH=4:

Se pesa 2.5528g de Biftalato de potasio y se disuelve en aproximadamente 50ml de H₂O desionizada. Una vez disuelto el biftalato, se coloca en un matraz volumétrico de 250ml en donde se llevó al volumen total con agua desionizada.

b) pH=6.86

Se pesan 0.8505g de KH₃PO₄ y 1.6754g de Na₂HPO₄, posteriormente se disuelven en agua desionizada y se afora a 250ml

c) pH=9.18

Se pesan 0.7035g de borato de sodio, el cual se disuelve en agua desionizada aforando a 250ml.

2. Disolución de KNO₃ 0.1M –fuerza iónica–

Para mantener la fuerza iónica constante, en 0.1, se pesan 10.111g de KNO_3 los que se disuelven y se llevan a un aforo de 1L.

3. Disolución patrón de Biftalato de potasio (patrón primario).

Se debe pesar alrededor de 1.0212g de biftalato de potasio seco, registrando el peso exacto. Se llevan a aforo de 250ml con disolución de KNO_3 0.1M. Anotar el título de la concentración real del biftalato.

4. Disolución normal de NaOH y ácido (HCl , HNO_3) 0.1N. Se adquieren de Merck o Sigma-Aldrich.

5. Las disoluciones para determinación de constantes de equilibrio (anexo 2) deben estar en un valor de pH extremo, 2 o 12, que se logran mediante la adición de un volumen conocido de ácido o NaOH normalizados respectivamente. Se llevan a aforo con disolución de KNO_3 0.1M. La concentración mínima deberá ser 1mM.

A1.6. Referencias

- 1 Metrohm Ltd.- Herisau, Switzerland; 702 SM Titrino Menu Program, Ver. 2.0, (1993).
- 2 Microcal Software, Inc.; Microcal (TM) Origin Working Model, Ver. 6.0 (1999)
3. Rossotti, F.J.C & Rossotti H.; *J Chem Ed.*, 42, 7(1965), 375-378.
4. G. Gran; *Acta Chem Scan*, 4(1950) 559.
- 5 A K Furr, ed.; CRC Handbook of Chemistry and Physics, 78ª edición; CRC Press (1997)

Anexo 2.

Determinación de Constantes de Equilibrio

A2.1. Condiciones iniciales

A2.1.1. Determinación de pKa

Una vez conocidos los valores de calibración del electrodo y de normalización de la NaOH y HCl, según los procedimientos descritos en el anexo 1, se pueden determinar los valores de los pKas de un compuesto, preparando la disolución como se comenta en la sección experimental, llevando el analito a su estado de mayor protonación o completa ionización mediante la adición de una cantidad conocida con precisión de HCl o HNO₃ normalizado o NaOH normalizada respectivamente. Las titulaciones se hacen con frecuencia partiendo de pH bajo, por lo que generalmente es ácido lo que se agrega al sistema inicial, en tal cantidad que se logre tener los equivalentes necesarios para llevar el analito a su forma más protonada y que haya aproximadamente un equivalente de H⁺ adicional.

Para todo esto se hace necesario conocer los equilibrios ácido-base a los que es susceptible el analito (o ligante) en el intervalo de trabajo. Para ello se cuenta con una herramienta que calcula pKas aproximados de moléculas con heteroátomos o enlaces

ionizables, denominado ACD/pKa DB^{*1}. Se puede dibujar la molécula de interés y después de optimizar su estructura tridimensional activar la función de cálculo de pKa.

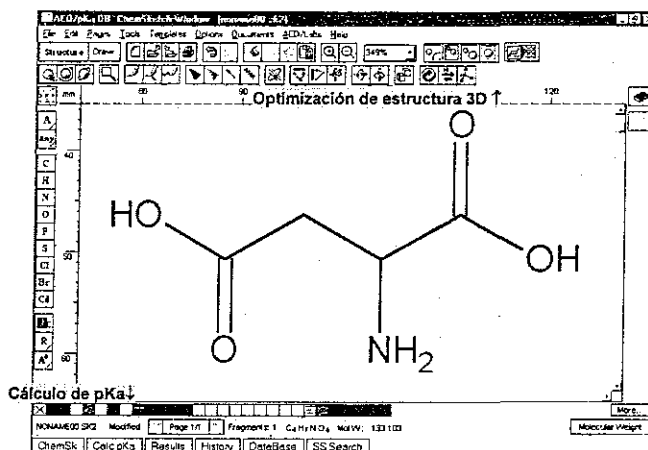


Figura A2.1. Íconos para el cálculo de estructura tridimensional y constantes de acidez de una estructura en el software de ACDlabs.

Al terminar el cálculo, se despliegan los resultados como sigue (en caso de estar reportado en la literatura se muestran las referencias), se pueden observar las asignaciones de los valores de pKa.

ACD/pKa DB: Results Window	
Ionic Form: H ⁺ L 	Approximated apparent pKa's: 1. pKa(HL/H+L)=11.39 ± 0.39 2. pKa(H2L/H+HL)=3.90 ± 0.10 3. pKa(H3L/H+H2L)=2.28 ± 0.23
References: 1. pKa(HL/H+L)=9.70 ± 0.05 at t=25.00 at IS=0.10 Reference: <i>Tables of rate and equilibrium constants of heterolytic organic reactions</i> , Ed V. A. Patai, MOSCOW 1976. 2. pKa(HL/H+L)=9.71 ± 0.02 at t=25.00 at IS=0.12 Reference: <i>Tables of rate and equilibrium constants of heterolytic organic reactions</i> . Ed V. A. Patai, MOSCOW 1976. 3. pKa(HL/H+L)=9.65 ± 0.03 at t=25.00 at IS=1.00 Reference: <i>Tables of rate and equilibrium constants of heterolytic organic reactions</i> , Ed V. A. Patai, MOSCOW 1976. 4. pKa(H2L/H+HL)=4.01 at t=1.00 at IS=0.00 Reference: Smith E. R. B., Smith P. K. " <i>Biol. Chem.</i> ", 1942, 146, 187. 5. pKa(H2L/H+HL)=3.94 at t=12.50 at IS=0.00 Reference: Smith E. R. B., Smith P. K. " <i>Biol. Chem.</i> ", 1942, 146, 187.	$pK_{a\text{calc}} = pK_{a_0} - \Delta(pKa)$ Calculation of pKa ₀ The structure was found in the Internal Structure Data Base pKa = 10.24 StD=0.1000 The final value of pKa ₀ pKa ₀ = 10.240 Calculation of Δ(pKa): Δ(pKa) = 1.149 from

Figura A2.2. Despliegue de resultados de cálculo de pKa en ACDlabs pKa/DB

* Cortesía Dr. Jesús Gracia.

Por el pH de disolución de la sustancia o al saber su composición en estado sólido, se puede aproximar el estado de protonación en disolución y los equivalentes de protones que le restan para llegar a la especie más ácida posible en el intervalo de trabajo ($\approx 2-10$)

Es recomendable conocer con precisión la concentración o composición del ligante para establecer como constante la cantidad de milimoles que se utilizan.

Las concentraciones de los analitos se consideran como *variables peligrosas* en el cálculo de las constantes, pero en caso de no conocer la cantidad de protones que contenía la muestra originalmente, el método de cálculo permitirá optimizar la concentración de alguno(s) de los reactivos a la vez que se aproximan los valores de las constantes acumulativas de formación que darían origen a una curva de titulación similar a la experimental.

En caso de haber dos puntos de equivalencia debidos al ligante con una diferencia de pH de un mínimo de 2 unidades puede ser posible determinar el volumen de titulante para cada uno mediante el cálculo de la segunda derivada de la curva de titulación (ver Figura A2.3). Como se explicó en el Anexo 1, los puntos en los que la segunda derivada cruza el cero corresponden a los puntos de equivalencia, y la cantidad de milimoles originales del ligante se puede calcular mediante la diferencia de los volúmenes de equivalencia y la concentración del titulante.

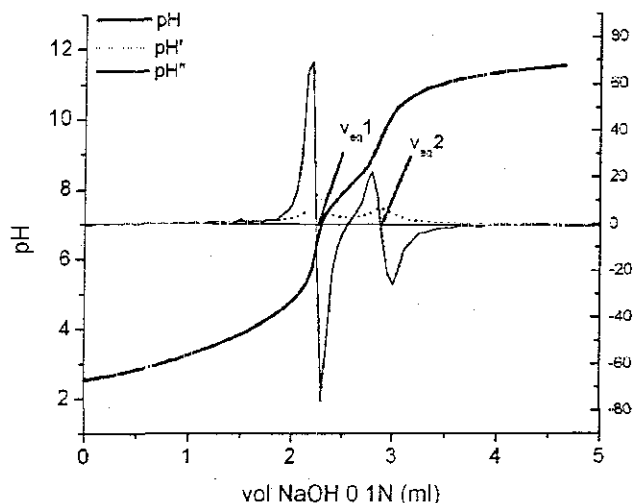


Figura A2.3. Determinación de dos puntos de equivalencia del ligante.

A2.1.2 Determinación de constantes de formación de compuestos de coordinación.

Para preparar la muestra para la determinación de constantes de formación de compuestos de coordinación, además de poner una cantidad conocida de ligante y la adición de ácido para imponer un pH límite bajo (alrededor de 2) se agregará catión en condiciones de equivalencia con el ligante (1:1). Se utilizan estándares de catión usualmente destinados para análisis por absorción atómica.

Es importante, en el caso de algunos cationes, usar HNO_3 en lugar de HCl pues los cloruros pueden interferir formando compuestos de coordinación a veces más estables que los del ligante en estudio.

A2.2. Generación de los archivos

Como se mencionó en anexo 1, Manual del Titulador, los datos de la titulación se guardan en un archivo de texto que se puede importar a Origin como archivo *.dat o *.txt, pero también las columnas de datos (ml agregados y pH medido) pueden guardarse en un archivo de texto con extensión *.ipd,

0.000	2.065
0.100	2.086
0.200	2.110

que posteriormente será importado a un archivo nuevo en **Hyperquad2000**^{♦,2}, de acuerdo a como se muestra en la Figura A2.4. A continuación se establecerá el número de reactivos involucrados en el experimento como se muestra en la Figura A2.5.

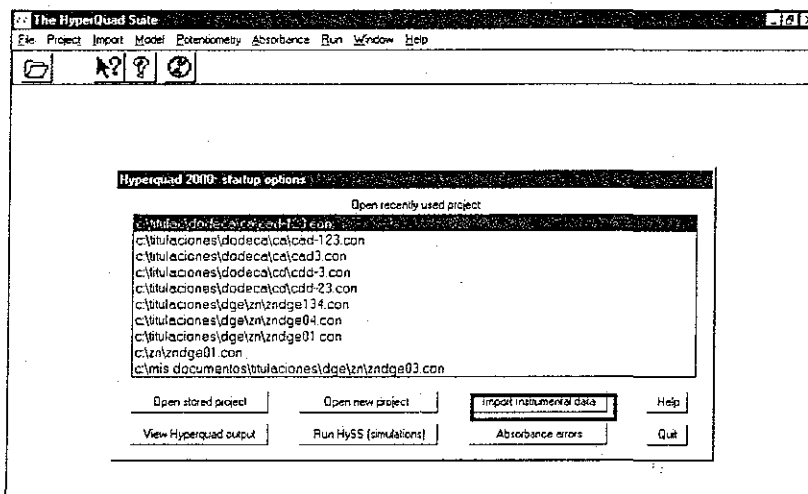


Figura A2.4. Pantalla de inicio de Hyperquad2000NT. Se marca la importación de datos.

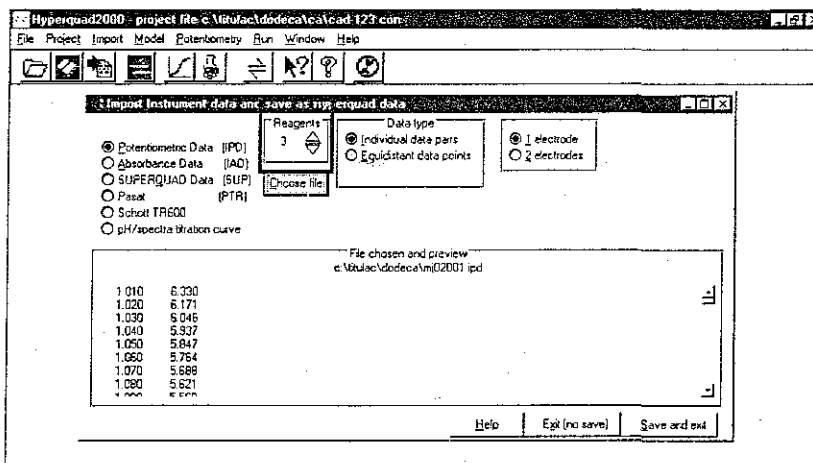


Figura A2.5. Ventana de importación de archivos. Se marca el campo de selección de número de reactivos.

Aquí cabe aclarar que los hidróxidos se considerarán como una especie derivada del protón, relacionada por el K_w . $[OH^-] = K_w [H^+]^{-1}$. Por esto, en el caso de determinación de

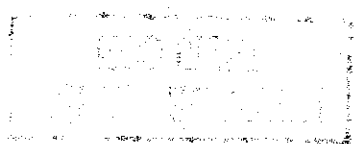
♦ Cortesía Dr. Rafael Moreno

constantes de acidez, se trabajará normalmente con 2 reactivos (ligante y protón) y en el caso de las constantes de formación con 3 (catión, ligante y protón).

El programa solicitará que se asigne una ubicación y un nombre raíz de archivos (*) para generar *.ppd (con los datos de la curva de titulación), *.par (archivo del modelo que se utilizará para ajustar una curva de titulación a los datos importados) y *.con (que contendrá la ruta de los archivos *.par y *.ppd utilizados para el proyecto).

A2.3. Definición de parámetros

Una vez importado el archivo, se denominan los reactivos en la pantalla del modelo, que se invoca a través de el icono de flechas de equilibrio sobre violeta, o con el elemento de menú [Model] En esta ventana (Figura A2 6) se declaran las especies que se formarán a partir de los “reactivos”, escribiendo el coeficiente estequiométrico correspondiente para la formación de la especie. En la columna de la extrema izquierda se despliega automáticamente la composición resultante de los coeficientes estequiométricos declarados. En la columna Log Beta se escribe el valor conocido o aproximado de la constante acumulativa de formación. Los valores de pKa encontrados mediante el programa de ACDlabs pueden utilizarse como propuesta en esta sección. En la columna de la extrema derecha se declara con la barra espaciadora o con doble clic, alternativamente si se utilizará el dato de log de beta como una constante, como una variable a refinar o se ignorará en el modelo. Se usan los botones **Add β** y **Remove β** para agregar o disminuir renglones y **Add Reagent** o **Remove Reagent** para administrar las columnas



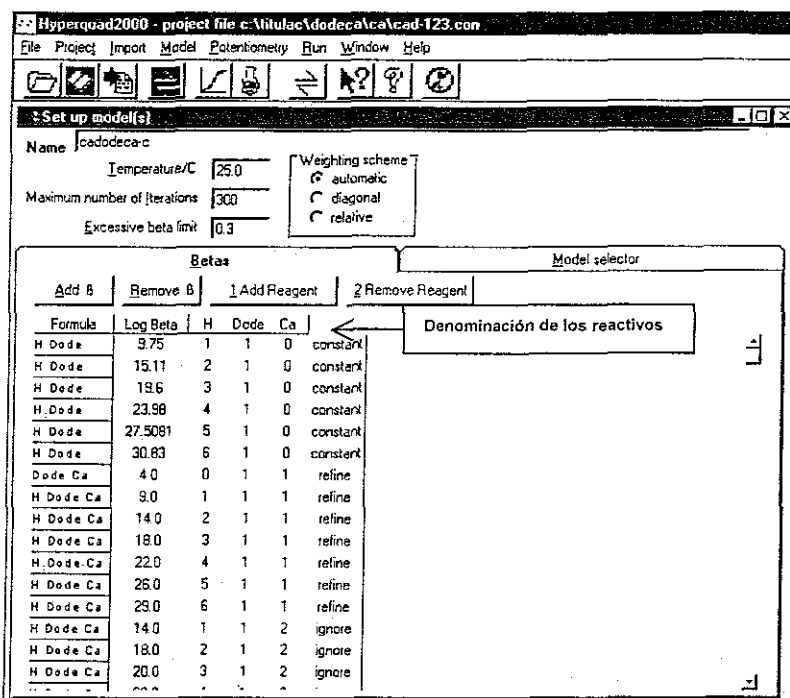


Figura A2.6. Ventana de edición del modelo.

Se selecciona el esquema de peso de los datos y sus errores de acuerdo con el método utilizado para medir los datos (ver A2.6). El automático calcula el error tomando los valores que se establecieron originalmente como errores volumétricos y potenciométricos, El segundo, diagonal, calcula los errores como independientes en cada punto, y para determinaciones espectrofotométricas se usan pesos diagonales y relativos de tal manera que se considera un error mayor cuando es menor la absorbancia de la especie y menor cuando ésta es mayor.

Se introducen los datos de concentración en el menú de datos potenciométricos (Figura A2.7) que se invoca ya sea a través de: [Potentiometry] → [Edit data] o seleccionando con el mouse el icono que ilustra una curva de titulación. Se Asigna una etiqueta a la curva cuyos datos se definirán, el volumen inicial de la muestra y el error en el valor de mililitros de titulación.

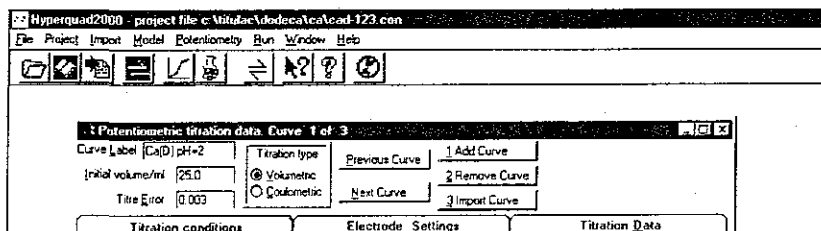


Figura A2.7. Menú de edición de datos potenciométricos.

En los campos de color amarillo de **Titration Conditions** (Figura A2 8) se escriben los milimoles correspondientes de cada reactivo y a su derecha si se utilizará como constante o como variable a refinar. En el campo de la concentración de la bureta, se declara la concentración normalizada de la sosa con signo negativo o la del ácido con signo positivo, en el renglón del reactivo H

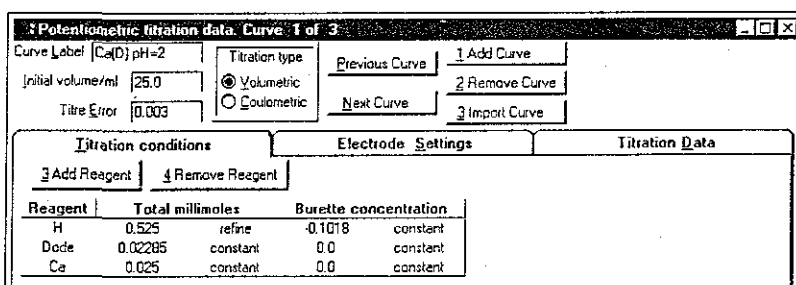


Figura A2.8. Edición de datos potenciométricos. Condiciones de Titulación.

En el campo de la configuración del electrodo (Figura A2.9) se debe asegurar que el tipo sea de pH, y el reactivo al que es sensible: H. Estos campos cambian con un doble clic de mouse en el campo, o con la barra espaciadora. Además se debe incluir el factor de pendiente (Slope factor) que se obtiene de la calibración del electrodo, de acuerdo como se menciona en el manual de uso del titulador. El error en el potencial es una especificación del electrodo.

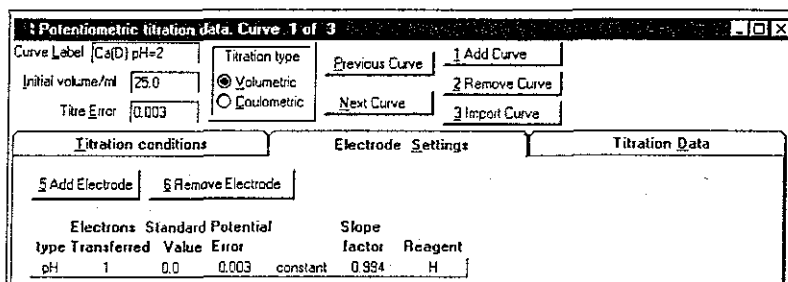


Figura A2.9. Edición de Datos Potenciométricos. Configuración del electrodo

Finalmente, en el campo de datos de la titulación (Figura A2.10), se despliegan los puntos que se importaron. A la derecha existe una columna en la que se puede determinar la exclusión de puntos de la curva, comúnmente para disminuir en número de datos que se tomen en cuenta de una zona buffer al inicio o final de la titulación.

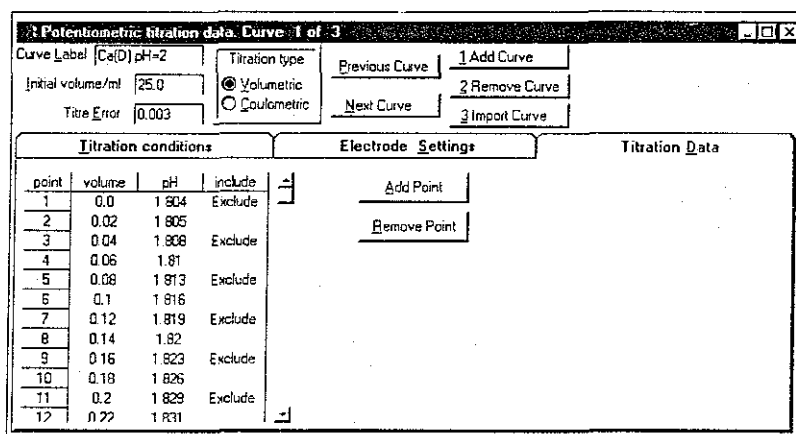


Figura A2.10. Edición de Datos Potenciométricos. Datos de la titulación.

Mediante el botón **Import Curve** se puede importar datos que ya tengan el formato con la extensión *.ppd, es decir que fueron importados y guardados en un archivo nuevo de hyperquad. Es recomendable hacer el cálculo de las constantes utilizando simultáneamente los datos de más de una titulación (los experimentos se hicieron por triplicado), de manera que se disminuya la repercusión de los errores personales. Para cada curva se establecerán los detalles de concentraciones, volumen, temperatura de trabajo y errores.

A2.4. Ajuste manual

Ya establecidos todos los parámetros de los experimentos, se puede hacer una inspección inicial de las constantes de formación propuestas, mediante la ventana de ajuste manual que se invoca con el icono de matraz bola (Figura A2.11).

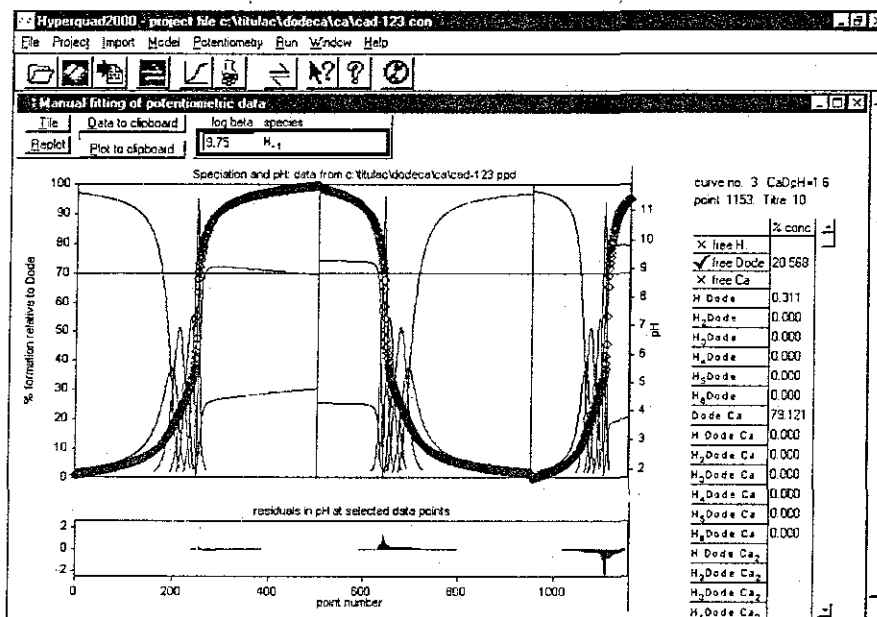


Figura A2.11. Ventana de ajuste manual

Esta sección es especialmente interesante y didáctica, pues se pueden observar los efectos de cambiar los valores de constantes de estabilidad en la forma de la curva. El cambio se puede hacer en la ventana de edición del modelo o directamente en la ventana de ajuste manual, ya que se despliega el valor de log de beta considerado en el modelo para aquella especie que cuya curva de abundancia se encuentra cerca de la posición en que se hace clic con el mouse. Al hacerse una modificación en el valor en esta ventana, se asimila esto en el modelo al activar el botón **Replot**. Se representan con rombos los puntos experimentales y con una línea roja la curva teórica, calculada con los parámetros y constantes de formación propuestas.

A2.5. Ajuste por mínimos cuadrados

Ya con valores iniciales satisfactorios, mediante el icono de equilibrio con fondo verde se activa el proceso de optimización de las variables por un método de mínimos cuadrados. Se genera un archivo de salida que es posible ver de manera inmediata en el visor que viene con el programa, WINOUTNT (Figura A2 12): La presentación de los resultados usualmente incluye en una ventana los resultados en texto, donde se incluye en la sección *general*, la información relacionada con los datos usados para el cálculo, es decir, archivos de datos usados: el modelo y los datos de la titulación. Cuando durante el cálculo es necesario cambiar el modelo para llegar a optimizar variables (es decir, eliminar algunas constantes de formación) es posible explorar los diferentes modelos a través del elemento de menú **Model** que sólo aparece en aquellos cálculos que usaron más de un modelo. Cada modelo contiene una sección completa con los detalles de iteración para lograr el refinamiento, *Resultados*: Los valores calculados y sus errores para las constantes de estabilidad y concentraciones (usualmente, lo primero en desplegarse). *Los coeficientes de correlación* entre los parámetros refinados. Una tabla de todas las *concentraciones calculadas*: total, libre y formando a las especies. Puede ser copiado a una hoja de cálculo y usarse para graficar las curvas de distribución de especies. *Valores observados y calculados* de pH y de potencial en la titulación, conforme a la adición de titulante.

Se puede también observar el despliegue de una gráfica de residuos en las medidas de potencial en términos de unidades de desviación estándar para cada punto. También una ventana en la que es posible ver las curvas de especiación de acuerdo con las constantes calculadas, y en la que se puede explorar la distribución de cierta especie al seleccionarla en el campo correspondiente

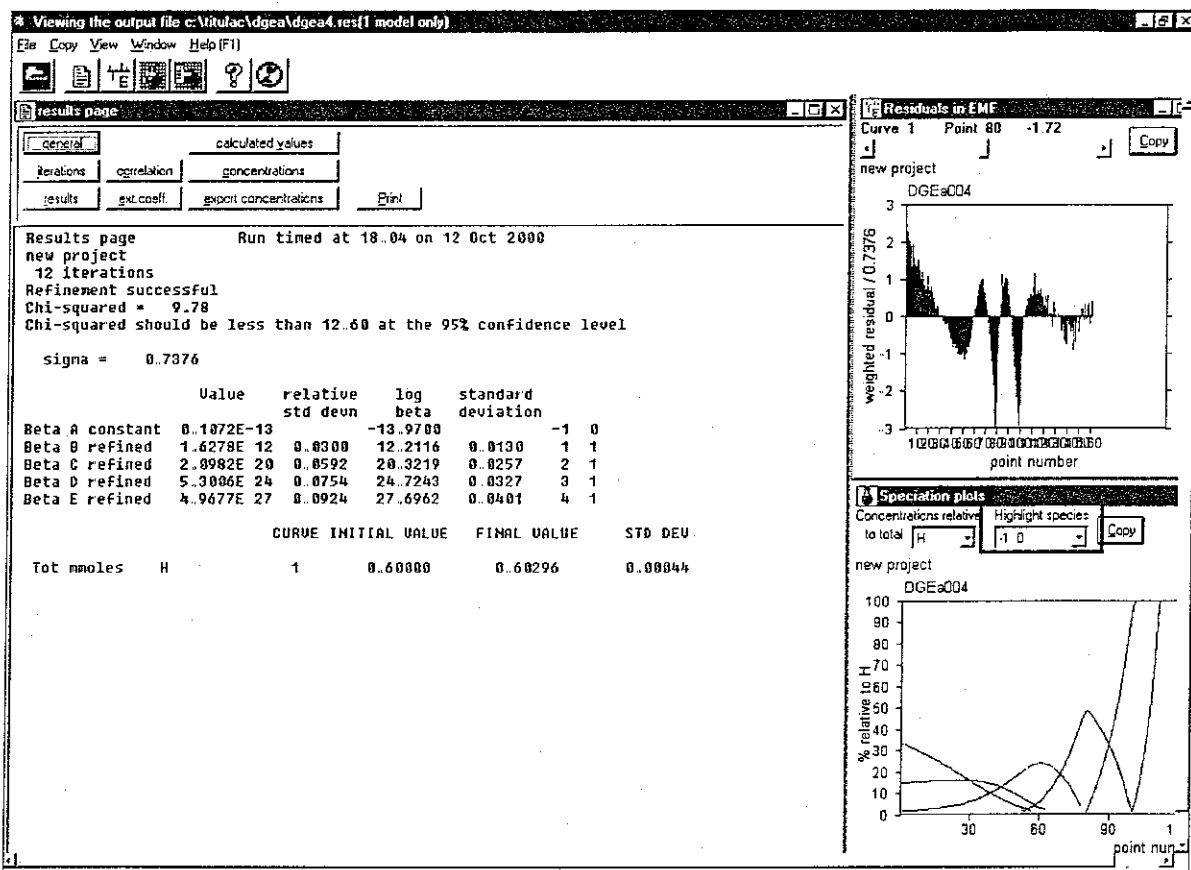
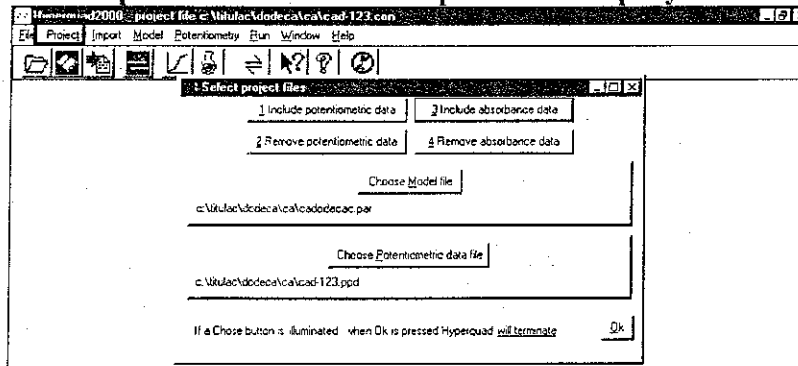


Figura A2.12. Archivo de salida de Hyperquad2000NT visto en WINOUTNT

Se puede exportar el modelo resultante de la optimización a un archivo *.par, que se puede adoptar nuevamente en el programa Hyperquad2000NT al solicitarlo en el elemento Project (Figura A2.13).

Figura A2.13. Menú para establecer los componentes del proyecto: datos y modelo.



Si los valores de constantes que se generan tienen como valores estadísticos de χ^2 menor de 12.6, para asegurar una precisión de al menos 95%, además de contar con valores

bajos de σ (ceranos a 1) y de desviación estándar sobre los valores de alrededor del 1%, se pueden ya usar por ejemplo como datos constantes para cálculos subsiguientes, o como valores finales.

A2.6. Principio de funcionamiento del programa

El programa actúa asumiendo los siguientes puntos³

1. Para cada especie formada en los equilibrios en disolución existe una constante de formación.
2. Cada electrodo muestra un comportamiento pseudo Nernstiano:

$$E = E^{\theta} + S_1 \log[X]$$

3. Se deben minimizar los errores sistemáticos a base de un trabajo experimental cuidadoso. Las fuentes de error sistemático son la calibración del electrodo, el peso de la muestra, las diluciones, la estandarización de los reactivos, variaciones en la temperatura y la calidad del agua.
4. La variable independiente no debe estar sujeta a error (volumen de titulante). Los errores en la variable dependiente (el potencial medido) deben seguir una distribución normal.
5. Existe un modelo del sistema en equilibrio que coincide con las observaciones experimentales. Éste es especificado por un conjunto de coeficientes por cada especie que se forma. Los refinamientos basándose en mínimos cuadrados se desarrollan en términos de un modelo asumido. Examinar una secuencia de modelos debe resultar en un mejor modelo que se asemeje mucho al modelo real, lo cual se denomina la selección de especies.

El peso de los puntos se toma inversamente proporcional al inverso de la varianza

$$\text{-varianza- } \sigma^2 = \sigma_L^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial V} \right)^2 \sigma_V^2$$

donde $\frac{\partial E}{\partial V}$ es la pendiente de la curva de titulación, por lo que a los puntos cercanos al punto de equivalencia, que son más susceptibles de error, se les asigna un menor peso. Así se forma una matriz de 'pesos' (W), que se introduce a las ecuaciones normales - estándar que se usan para minimizar la sumas de errores cuadráticos por refinamientos iterativos de estimaciones iniciales de los parámetros.

$$A^T W A s = A^T W \varepsilon$$

En que s es un vector de desplazamientos para ser aplicados a los parámetros, ε es el vector de residuos. A^T es la transpuesta de la matriz A. Se orienta la iteración hacia la convergencia mediante un método "steepest descent".

La matriz A se compone de las derivadas parciales de los potenciales respecto a los parámetros. Si la dependencia del potencial respecto a los parámetros (p_i) no es explícita, se requiere de una derivación implícita sobre [X], la concentración del ion al que el electrodo responde:

$$p_i \frac{\partial E}{\partial p_i} = p_i \frac{\partial E}{\partial [X]} \frac{\partial [X]}{\partial p_i} = p_i \frac{S_i}{[X]} \frac{\partial [X]}{\partial p_i}$$

Se obtienen valores de [X] a partir del modelo, resolviendo el conjunto no lineal de ecuaciones de balance de masa aplicable a cada reactivo, para su comparación posterior con los valores medidos. T_A es la concentración total del reactivo A que se asume que forma k especies complejas

$$T_A = [A] + \sum_k a_k \beta_{a_k b_k} [A]^{a_k} [B]^{b_k} \dots$$

Los parámetros involucrados son las constantes de formación β . Se pueden, sin embargo refinar otros parámetros, considerando la relación entre la concentración total de los reactivos y los otros parámetros que si son optimizados por el cálculo, como se mencionó anteriormente, se denominan *peligrosos*

$$T_A = \frac{n_A + C_A v}{v_0 + v}$$

n_A es la cantidad inicial de reactivo A, C_A es la concentración del reactivo en la bureta, v_0 es el volumen inicial de la mezcla de reacción y v es el volumen agregado de titulante. Estos parámetros “peligrosos” sólo deben ser optimizados por el cálculo en el caso en que sus valores no pueden ser establecidos con suficiente precisión por algún método “químico” conocido.

El programa permite que se combinen diferentes tipos de curvas de titulación.

Si después del refinamiento se encuentra que una constante está mal definida -con una desviación estándar de más de 33%, o con un valor negativo-, se genera automáticamente un nuevo modelo, excluyendo a esa constante. Esto, frecuentemente logra que el cálculo converja rápidamente, confirmando una hipótesis de que la constante no estaba bien definida porque la especie correspondiente tenía un efecto muy pequeño en los potenciales medidos, debido a su baja concentración global

A2.7. Referencias

1. Advanced Chemistry Developments; ACD ChemsSketch Ver 3.0 (1997)
2. P.Gans, A.Sabatini, A.Vacca: Hyperquad 2000, ver 2 1(NI) (2000)
3. de: Gans, P., Sabatini, A & Vacca, A.; *J Chem Soc Dalton Trans*, 1985 p1195-1200

- Anexo 3 -

Elucidación de estructuras en disolución a partir de espectros NOESY a través de MARDIGRAS

En esta sección se describe el procedimiento que se siguió particularmente en este trabajo para proponer las conformaciones en disolución de los oligopéptidos.

Existen diferentes programas que pueden ser utilizados en las etapas que se plantean a continuación.¹ Por ejemplo, en el caso del procesamiento de espectros se puede utilizar directamente el software con el que se obtiene (como VNMR:Varian) o con software dedicado al procesamiento de espectros de múltiples dimensiones como NMRpipe-NMRDraw, o Felix y posteriormente convertir el archivo de salida al formato del programa en que se pueden asignar e integrar las señales como Sparky o XEASY para posteriormente utilizar los datos para calcular, dado el ruido en el espectro y las diferentes posibilidades de tiempo de correlación en la molécula, los límites inferior y superior de distancias interatómicas, esto, a través de un programa que genere y optimice matrices de relajación como MARDIGRAS(RANDMARDI), o CALIBA. Finalmente estas restricciones se consideran en un cálculo de dinámica molecular que genera estructuras que cumplen con dichas restricciones en programas como DYANA, DISGEO, X-PLOR o CNS. Para visualizar las estructuras obtenidas se puede usar WebLabViewer, Mercury,

Molmol, entre otros programas de visualización molecular. Finalmente para la inclusión del catión en el entorno de coordinación que tiene dispuesta la molécula del ligante, se recurre a un programa de modelado molecular como puede ser Hyperchem, Spartan, etc.

La estrategia seguida en este proyecto incluyó el uso de NMRDraw² -en algunos casos Vnmr³-, Sparky,⁴ MARDIGRAS,⁵ Dyana,⁶ Molmol⁷ e Hyperchem.⁸

Los manuales provistos en formato electrónico para cada uno de los programas, son una ayuda excelente para el uso de éstos. Sin embargo, se provee a continuación de descripción de funciones y sugerencias operativas que pueden facilitar el uso de los programas por el nuevo usuario

A3.1. Experimento de Resonancia

Para obtener información respecto a la estructura en disolución de los compuestos en estudio se puede recurrir a la detección de interacciones a larga distancia. Esto es observable a través de experimentos de resonancia magnética nuclear diseñados para observar el Efecto Nuclear Overhauser (NOE), que se describió en los antecedentes (1.5.2). Recordemos que la intensidad de las señales NOE es proporcional a $1/r^6$ y por lo tanto de acuerdo a las señales observadas, es posible determinar distancias entre átomos no enlazados

Se debe tomar en cuenta que para moléculas grandes, la dependencia de NOE respecto al tiempo de correlación es importante. En espectros NOESY el efecto puede desaparecer o hacerse negativo (ver Figura A3.1). Por ello se llega a trabajar con el experimento ROESY, en el cual las mediciones se hacen en el marco rotatorio, lo cual provoca que no se presenten señales negativas. El valor máximo de incremento por NOE en las señales es del 67%.

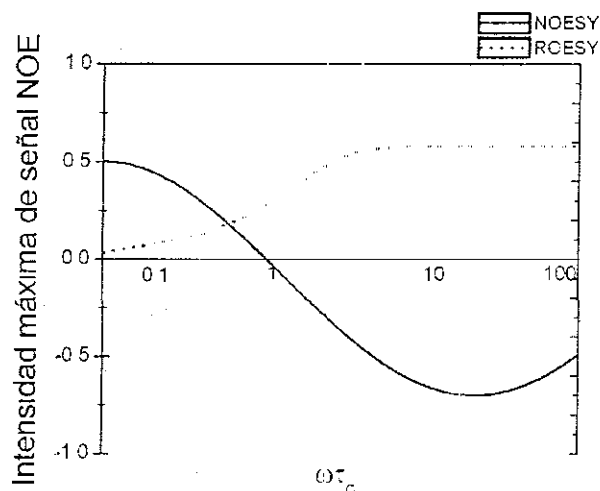


Figura A3.1. Dependencia de la intensidad de la señal NOE respecto al tiempo de correlación. Diferencia entre NOESY y ROESY

Por lo anterior se recomienda que si no se observan señales en el espectro NOESY se intente obtener un experimento ROESY

A lo largo del trabajo experimentamos problemas también por los altos valores resultantes de fuerza iónica ($\approx 0.03M$), cuando pusimos un exceso del catión de estudio, o después de adiciones recurrentes de ácido y base para fijar un pH

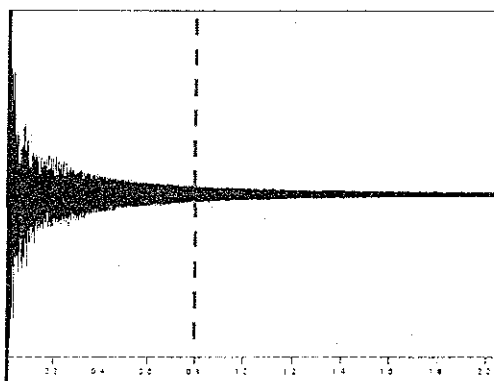


Figura A3.2. Sugerencia para la selección del tiempo de mezclado (τ_m) a usarse en el experimento NOE bidimensional.

Una variable importante que debe explorarse es el tiempo de mezclado τ_m , que se puede fijar observando el decaimiento de la fid en el espectro monodimensional con supresión

de agua (Figura A3.2) El valor debe ser tal que la señal tenga aún algo de tiempo de decaimiento.

A3.2. Procesamiento de espectros

Una vez obtenido el espectro debe procesarse, es decir, si es necesario, hacer supresión digital del disolvente, apodizar, predicción lineal, llenado de ceros (zero-filling), y entonces hacer la transformada de fourier, para entonces arreglar la fase de ambas dimensiones. Los programas utilizados para la obtención de los espectros tienen posibilidad de manipular los archivos de salida para desplegarlos correctamente y es posible guardar la información del espectro ya procesado.

A3.2.1 Vnmr

Por ejemplo, en Vnmr© de Varian®, ya teniendo el espectro desplegado correctamente, se utiliza la instrucción

```
set trace='f1'
```

y después de desplegar el espectro completo, se ejecuta la instrucción

```
flush
```

De esta manera se almacenan los datos del espectro procesado en el archivo *phasefile*, en el directorio *datdir* del experimento de trabajo, pues generalmente sólo se trabaja con el archivo *fid* y con el *procpa*, que contiene los parámetros utilizados en el experimento. Este último archivo también es necesario para poder acceder al siguiente paso del protocolo descrito en este anexo, pues para poder transformar el espectro al programa Sparky se ejecutará el programa *vnmr2ucsf* en una ventana de DOS, o en el sistema Unix:

```
% vnmr2ucsf procpa phasefile espectro.ucsf H H
```

donde % corresponde al símbolo de sistema. Habiendo previamente copiado el programa `vnmr2ucsf` provisto con Sparky al directorio en que se tienen los archivos `procpa` y `phasefile` para el espectro que se ha procesado; *espectro* será sustituido por el nombre que se pretenda dar al archivo y `H H` corresponde a los núcleos estudiados en cada dimensión del espectro. Todos los espectros analizados en este trabajo para el estudio de conformaciones son homonucleares de protón. El archivo con extensión `ucsf` podrá ser leído por el programa Sparky.

El programa Sparky, que incluye los programas para conversión de formatos, provee también en su archivo de ayuda las instrucciones para las conversiones de formato de archivos provenientes de Bruker, Felix, y de NMRPipe.

A3.2.2 NMRPipe/NMRDraw

Hemos encontrado, sin embargo, que el procesamiento de espectros resulta más sencillo a través del programa NMRPipe¹² en el que la secuencia de pasos del procesamiento es más clara y es posible interactuar con ambas dimensiones del espectro simultáneamente, lo cual resulta muy práctico para arreglar la fase del espectro completo.

Es posible también dividir al espectro en secciones, lo cual en este trabajo fue muy importante al haber trabajado con espectros de un experimento denominado NOESYjr (NOESY jump and return) en el caso del dodecapéptido para lograr una supresión de agua más eficiente, lo cual genera señales positivas a la derecha del agua y negativas a la izquierda, y dificulta poner en fase a todo el espectro completo.

¹² Este programa es de distribución gratuita bajo solicitud a su autor vía correo electrónico (delaglio@spite.niddk.nih.gov) al que contesta con una clave de acceso a un servidor ftp.

El programa NMRPipe cuenta con una interfase gráfica denominada NMRDraw (ver Figura A3.3). Este software trabaja en sistemas Unix o Linux*, y el procesamiento se hace a través de macros. El uso de comandos gráficos se hace mediante el botón derecho del *ratón*, soltándolo al llegar a la instrucción deseada.

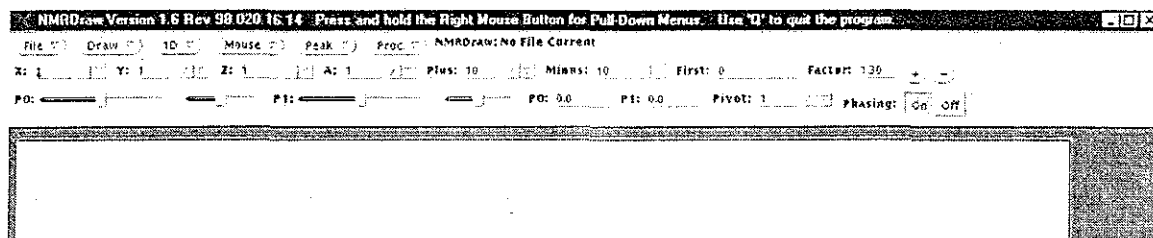


Figura A3.3. Pantalla de NMRDraw

El menú Proc contiene el protocolo de conversión de archivos fid de Varian® al formato de NmrPipe (test fid). Mediante este, se lee el archivo fid y el procpair y habiendo actualizado las variables se procede a la conversión de formato (Figura A3.4).

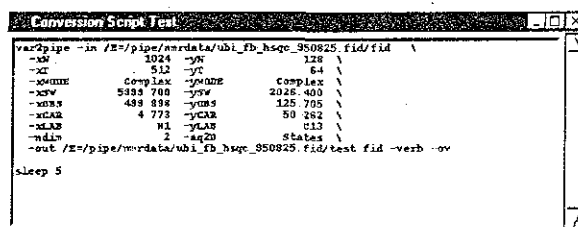
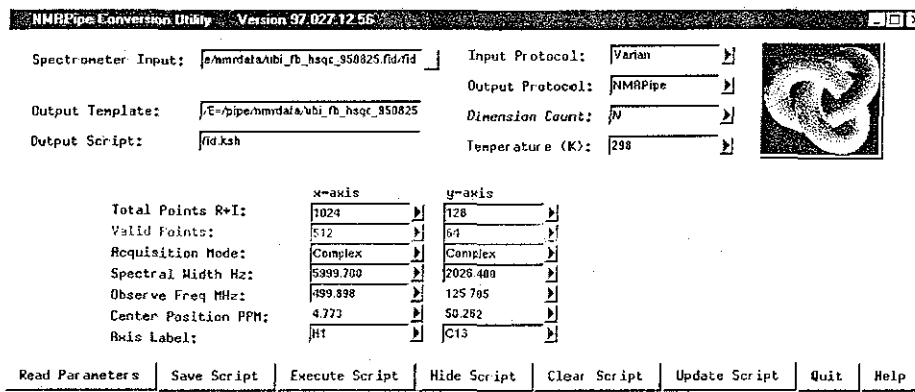


Figura A3.4. Ventana de Conversión de archivos fid de Varian a formato NMRPipe

* Se han tenido buenos resultados trabajando en una PC utilizando un programa xwindows como xwin32 para despliegado de interfases gráficas via remota. estando el programa instalado en una computadora con Linux

En este punto es posible desplegar el archivo *.fid (File → Select file) para observar la forma de las *fids* que pueden orientar respecto a las operaciones que será necesario aplicar a las funciones en el dominio del tiempo. En el menú Mouse existe la opción [1D Horizontal] con la que se puede ver la traza de la dimensión f2 (Figura A3.5).

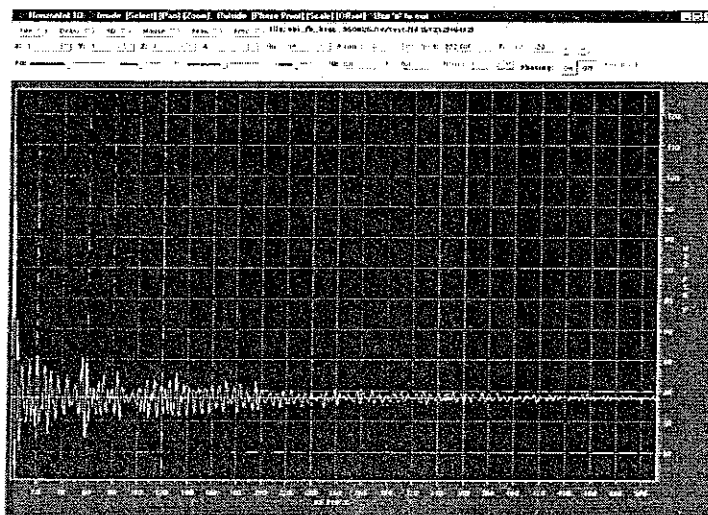


Figura A3.5. Despliegue de la traza de la dimensión f2

Dentro de la ventana File→Macro Edit existen ya definidas secuencias básicas de macros para el procesamiento de espectros, que se pueden ir aplicando en partes (Figura A3.6)

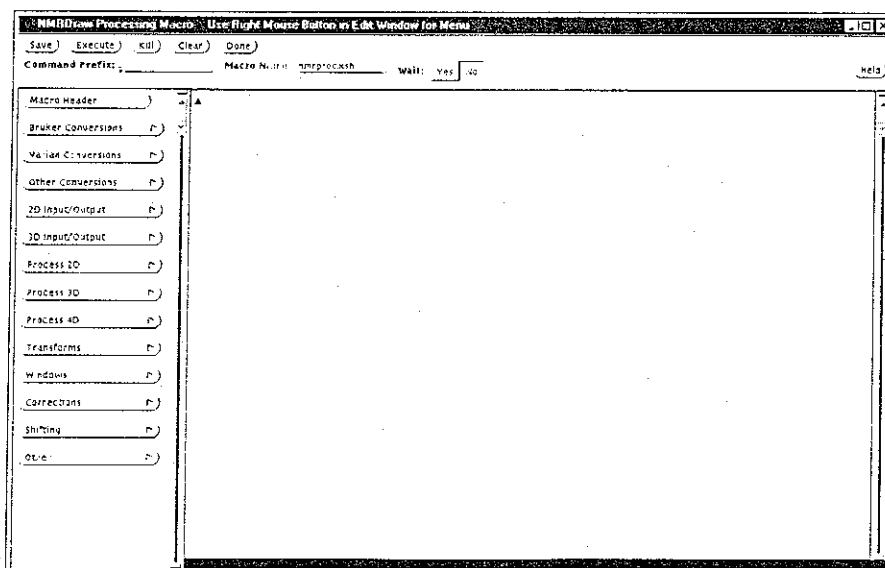


Figura A3.6. Ventana "Macro Edit"

Por ejemplo, al solicitar en Process 2D: Basic 2D, aparece lo siguiente en la ventana de edición de macros (las instrucciones deben estar entre | y \ para ser ejecutadas. Se describe la operación respectiva sobre el archivo al lado derecho):

```
#!/bin/csh

#
# Basic 2D Phase-Sensitive Processing:
#   Cosine-Bells are used in both dimensions.
#   Use of "ZF -auto" doubles size, then rounds to power of 2.
#   Use of "FT -auto" chooses correct Transform mode.
#   Imaginaries are deleted with "-di" in each dimension.
#   Phase corrections should be inserted by hand.

nmrPipe -in test.fid \ Leer el archivo de fids
| nmrPipe -fn SOL \ Ajustar las fids de la 1ª D para suprimir el efecto de los 1H del agua
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 2 -c 1.0 \ Apodización a la 1ª D
| nmrPipe -fn ZF -auto \ Llenado de ceros 1ª D
| nmrPipe -fn FT -auto \ Transformada de Fourier a la primera dimensión (1ª D)
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di -verb \ Corrección a la fase de la 1ª D
| nmrPipe -fn TP \ Transponer, para comenzar a trabajar con la segunda dimensión (2ª D)
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.00 -pow 2 -c 1.0 \ Apodización en la 2ª D
| nmrPipe -fn ZF -auto \ Llenado de ceros 2ª D
| nmrPipe -fn FT -auto \ Transformada de Fourier a la 2ª D
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0 0 -di -verb \ Corrección a la fase de la 2ª D
| nmrPipe -fn POLY -auto \ Corrección a la línea base de la 2ª D
| nmrPipe -fn TP \ Transponer, para volver a trabajar con la 1ª D
| nmrPipe -fn POLY -auto \ Corrección a la línea base de la 1ª D
  -ov -out test.ft2 Generar el archivo de salida
```

Nótese que es necesario hacer una corrección por la presencia del disolvente ya que a pesar de las estrategias operativas (es decir, la elección del experimento para minimizar la intensidad de la señal del agua en los espectros), al desarrollar el experimento en una disolución acuosa (80% H_2O , 20% D_2O), queda aún una alta interferencia por la señal de $^1\text{H}_2\text{O}$ Ver Figura A3.7 a). Después de hacer la corrección del disolvente la fid adquiere la forma más convencional (Figura A3.7 b):

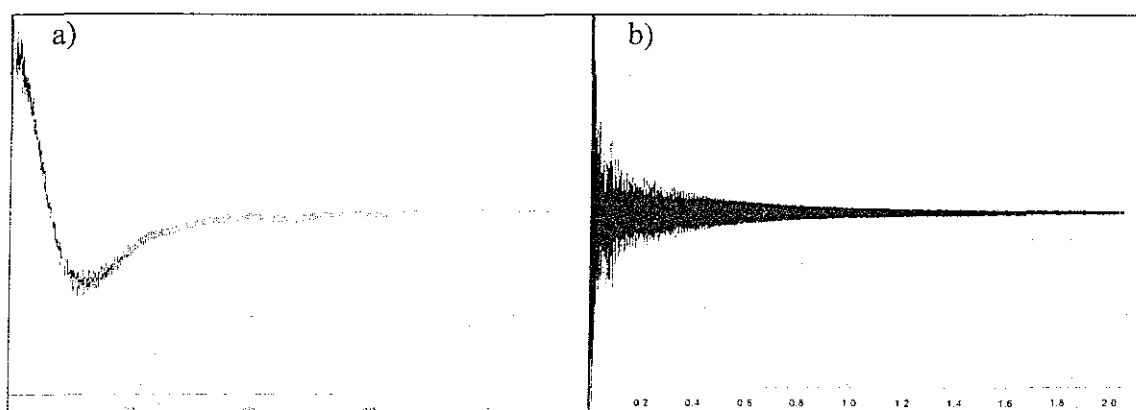


Figura A3.7. Fid original (a) y después de ser corregida por disolvente con una función de convolución (b).

Para dar forma a las señales se aplican las apodizaciones (las fids se multiplican por una función sinusoidal al cuadrado que comienza en $\pi/2$ y termina en π) maximizando la relación señal ruido, y para incrementar la resolución en el dominio de las frecuencias, se aplica el llenado de ceros.

Se recomienda aplicar estas operaciones y la transformación de Fourier, y postergar los siguientes pasos para establecer el valor de corrección en las fases de los espectros en la primera dimensión

Se visualiza el trazo horizontal del primer espectro en la primera dimensión y se ajustan los parámetros de fase de orden cero y primer orden -p0 y p1-, de tal manera que las señales del espectro se encuentren completas y con el mismo signo(ver Figura A3.8)

* Las instrucciones se postergan a través de la adición de un símbolo # al principio de la línea

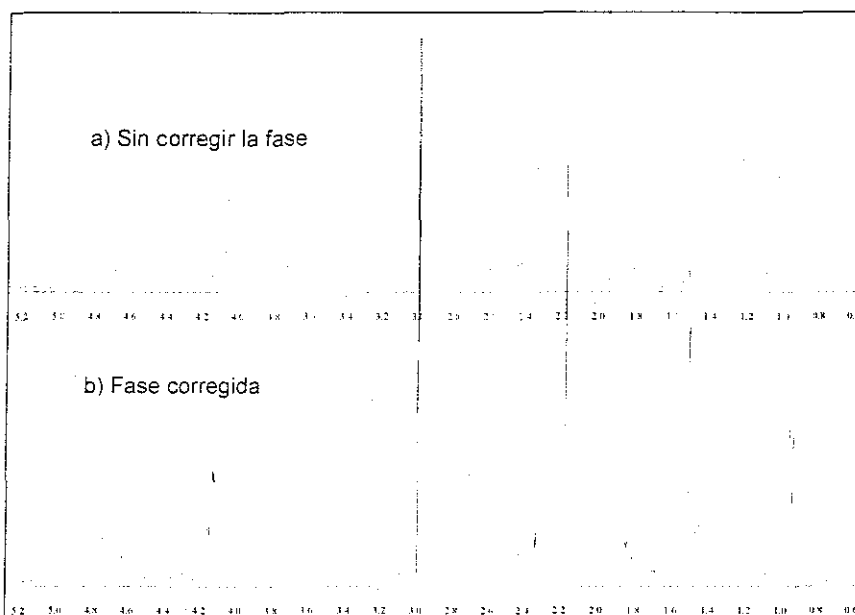


Figura A3.8. Efecto de la corrección de fase.

Los valores obtenidos con este ajuste se aplican al siguiente paso de las líneas de instrucciones sustituyendo a los valores 0.0 originales.

```
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di -verb \
```

Se puede entonces seguir con los pasos del proceso descritos a través de las líneas de comandos que siguen de acuerdo al protocolo presentado con anterioridad, hasta la línea correspondiente a los parámetros de corrección de fase para la 2ª dimensión. Para obtener los valores correspondientes se trabaja con la traza vertical, ubicándose en las regiones del espectro que contienen señales

Finalmente se hace la corrección de las líneas base aplicando una función polinomial a cada dimensión

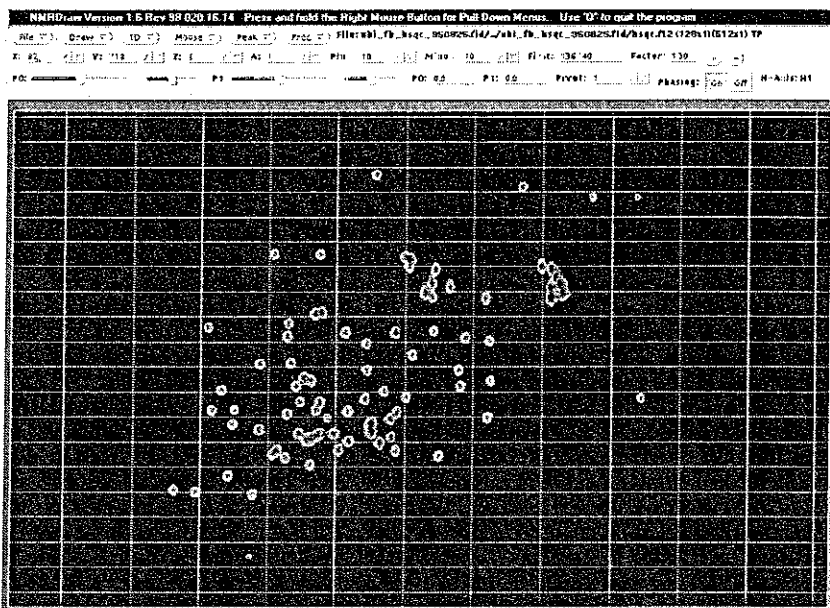


Figura A3.9. Espectro procesado y en fase

Una vez que el espectro se despliega adecuadamente (Figura A3.9), ya fuera del programa, en una ventana Unix o MSDOS, el archivo *test.ft2* se convierte al formato legible por Sparky (ucsf) mediante el uso del programa *pipe2ucsf* que se recomienda copiar al directorio en el que se tiene al archivo *test.ft2*, simplemente mediante la instrucción

```
% pipe2ucsf test.ft2 espectro.ucsf
```

donde % corresponde al símbolo de sistema, *test* puede haber sido sustituido por un nombre que describa al espectro de trabajo, al igual que *espectro*

A3.3. Asignación e integración. Archivos de entrada para cálculo de restricciones.

Debido a que los programas de cálculo de restricciones de distancias interatómicas requieren de archivos de entrada que contengan la asignación de las señales con su valor

de volumen en el espectro NOESY, es de gran utilidad el uso de un software denominado Sparky^{o4} que puede trabajar tanto en ambiente Unix como en Windows.

El programa lee el archivo *.ucsf y genera un archivo *.save (comando fs) que contiene las modificaciones como asignaciones, líneas, colores, altura de corte en las curvas de nivel, número de curvas, valores de integración.

Para que el espectro sea desplegado en pantalla, es indispensable contar con el archivo *.ucsf, que es automáticamente solicitado al abrir el archivo *.save (comando fo)

A la vez es posible generar archivos de texto con el formato necesario para actuar como archivos de entrada para programas como MARDIGRAS.

Con el programa viene el manual en formato html que resulta muy completo y práctico.

A continuación se describen las principales ventajas del uso de este programa, y algunas recomendaciones:

Todas sus funciones pueden ejecutarse con una combinación de 2 teclas.

Es posible desplegar gran cantidad de espectros simultáneamente, con lo que se puede comparar la presencia de una misma señal en diferentes espectros, por ejemplo entre TOCSY y NOESY.

Se puede registrar la **asignación** de las señales (comando **at**) Se sugiere poner como grupo el valor numérico de la posición del residuo en la secuencia, lo cual será útil para los pasos posteriores

En el campo correspondiente a átomo se describirá qué tipo de protón es, es decir H para el protón del grupo amido del enlace peptídico, HA# si es alfa, HB#, HG#, HD#, HE#, HZ#, respectivamente para los siguientes protones β , γ , δ , ϵ , ζ , donde # será 1 o 2 cuando los protones de ese grupo pueden ser diferenciados

^o Disponible como prueba por 3 meses o al solicitarlo mediante <http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky>

Cuando más de un protón son magnéticamente equivalentes, la letra H es cambiada por: M en el caso de metilo, Q en el caso de metileno y R en el caso de aromáticos

Se puede observar el movimiento del puntero del *ratón* de manera simultánea en las ventanas desplegadas lo cual facilita la localización de las señales análogas.

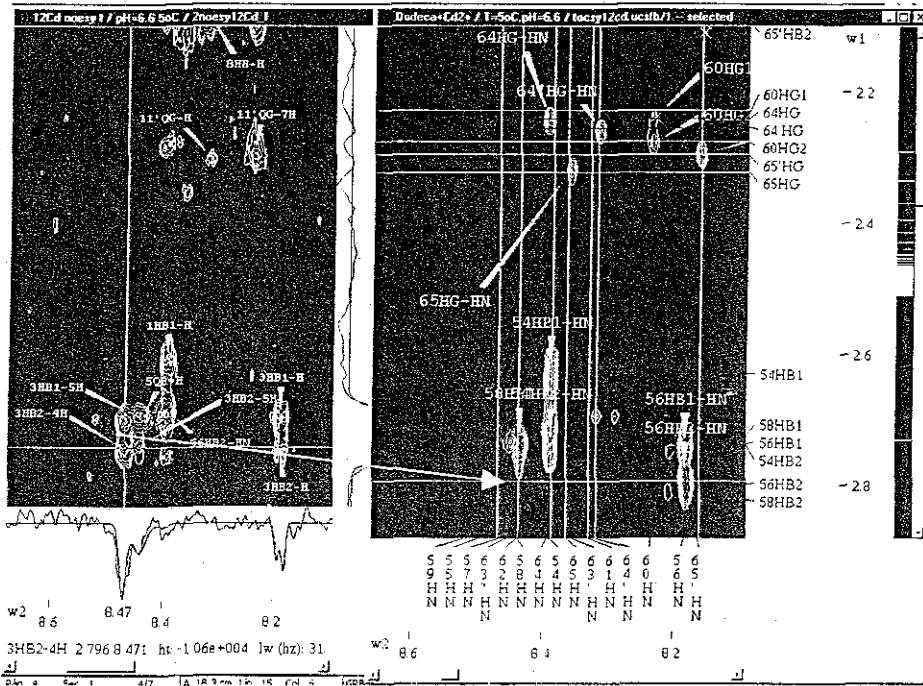


Figura A3.10. Comparación de señales entre un espectro TOCSY y un NOESY de la misma muestra

También se pueden copiar las asignaciones hechas en un espectro a uno que se esté analizando (comando **pd**). Usualmente se asignan primero las señales en un espectro dependiente de los acoplamientos directos como COSY o TOCSY. Para la asignación secuencial, es importante cotejar las señales con el espectro NOESY. (Figura A3.10) localizando las señales correspondientes a la interacción $H\alpha_i$ con el HN_{i+1} (i = número de residuo), observable en cualquier estructura secundaria del péptido,⁹ ya que el péptido que se trabajó contenía tres residuos de Ácido glutámico, dos residuos glicina, y dos de ácido aspártico y una asparagina -cuyo patrón de correlación total y desplazamientos químicos son equivalentes a los de los aspárticos-

Cuando se está trabajando con un grupo de espectros es recomendable **guardar al grupo como un proyecto** (comando `js`), con lo que se puede seguir trabajando con la misma distribución de ventanas que se decidió era útil.

Para **integrar** cada señal se debe mover el nivel de corte (comando `ct`, o con el *ratón* en la escala de contornos que se despliega al lado derecho del espectro con el comando `vC`) hasta una altura en que ésta se aisle. Una vez calculada la integral (comando `pi`) no importa que se vuelva a mover el nivel de corte.

El programa despliega junto con el trazo unidimensional (comando `vS`), la curva correspondiente a la integral calculada (en color azul), con lo cual es posible constatar si la integración se ajusta a la forma de la señal que se decide considerar (ver Figura A3.11).

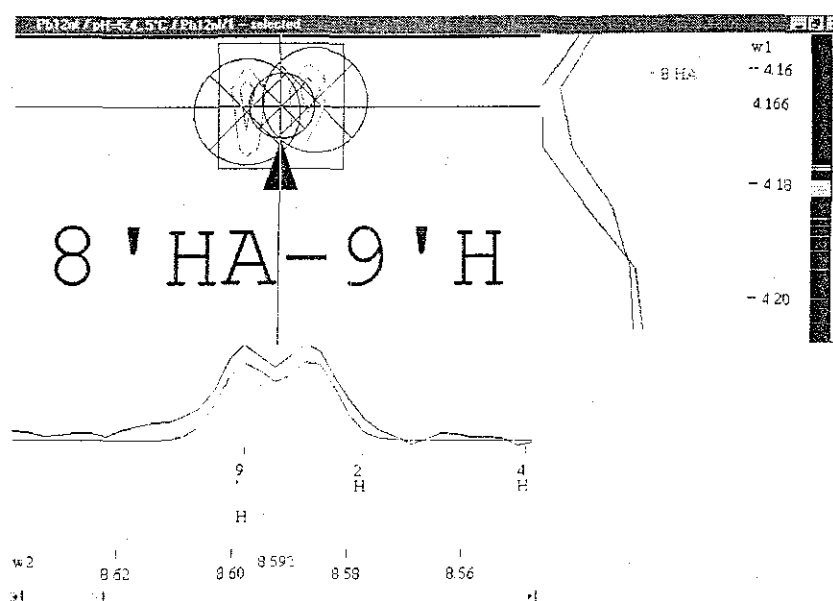


Figura A3.11. Visualización en Sparky de la traza y la integral calculada, así como de la escala de contornos

Una vez asignadas e integradas todas las señales que se encuentran fuera de la diagonal en el espectro NOESY se **genera el archivo en formato MARDIGRAS** (comando `mf`).

```

ATOM1  ATOM2  INTENSIY
HA     1 HB1   1 2.6550e+006
HA     1 HB2   1 3.0215e+006

```

En caso de existir más de una señal para varios átomos, que pudieran responder a la presencia de otra conformación de la molécula, es importante distinguirlas de tal manera que sea posible descartarlas de un archivo Mardigras y descartar las análogas en otro, para poder determinar ambas conformaciones. El uso de “ ’ ”, como *prima*, no es aconsejable pues en el archivo con formato para Mardigras se pierde este carácter.

Se recomienda revisar las asignaciones correspondientes a interacciones entre hidrógenos pertenecientes a aminoácidos a 2 o más residuos de distancia, buscando estas señales en el TOCSY, pues es posible que haya un error de asignación, y serán los que más repercutan en fijar una conformación.

Por otro lado, se puede generar un archivo de texto que contenga las características de los picos asignados, como relación señal:ruido, que puede ser utilizado como base para establecer el error en el volumen de las señales para el siguiente paso.

A3.4. Cálculo de restricciones

Al archivo de texto generado con formato Mardigras se le deben hacer algunas modificaciones. Se deben agregar a la derecha las columnas ERROR % y NORM. Para asignar un valor a ERROR % se puede calcular el inverso de la relación señal ruido y convertirlo a porcentaje. Para la normalización es mejor tomar en cuenta a aquellas señales lo suficientemente intensas para abatir la fuente de error en la normalización, por lo que se consideran los datos que se cuenten con un error debajo de cierto límite, 10 o 15% de error. Se pone un 1 en la columna NORM de las señales que serán consideradas en la normalización y 0 cuando no. El archivo tendrá la extensión INT.1

```
REMARK CORRELATION TIME: ISOIROPIC          2 000nsec
HEADER      Zn - 12 aa
MIXING TIME: 0 200
ATOM1  ATOM2  INTENSITY  ERROR%  NORM
HA      1  HB1   1 2.6550e+006    7.1    1
```


Posteriormente, se elabora un archivo de texto que contendrá los parámetros de entrada para que corra el programa *Mardigras*⁵. Su nombre será *INP.PARM*

Las líneas indicadas como “(para ROESY)” en esta secuencia de comandos serán excluidas en el caso de trabajar con NOESY, es decir, borradas

<pre> ROESY PDB FILE sitioII.pdb INT FILE Cd12.INT.1 PPM FILE Cd12.ppm JCP FILE Cd12.jc OUT FILE Cd12o FREQUENCY 500.139 CARRIER FREQUENCY 4.8 SPIN-LOCK FIELD 45.4545 MINIIN 2 MAXITN 20 NOISE ABSOLUTE UNNORMALIZED 2.1e+04 NORMALIZE ALL RANDMARDI 30 DYANA FORMAI </pre>	<p>Se escribe en caso de trabajar con ROESY</p> <p>Nombre del archivo PDB a utilizarse en el cálculo</p> <p>Nombre del archivo INT.1</p> <p>(para ROESY): δ de las señales del espectro en ppm</p> <p>(para ROESY): constantes de acoplamiento</p> <p>Prefijo para los archivos que se generarán.</p> <p>Frecuencia en que se desarrolló el experimento</p> <p>(para ROESY): Ubicación del transmisor (δ del agua)</p> <p>(para ROESY): Definido por el pulso de 90°, en μs</p> <p>Número mínimo de iteraciones</p> <p>Número máximo de iteraciones</p> <p>Cómo se considera el nivel de ruido</p> <p>Opción de normalización</p> <p>Ejecutar RANDMARDI con N modificaciones en el archivo INT.1</p> <p>Formato del archivo de salida para ser leído por Dyana.</p>
--	--

El archivo PDB que se usa en *Mardigras* se prepara a partir de un archivo PDB (secuencia y estructura) que es sometido a un programa incluido con *Mardigras*, *corma in*. Este a su vez incluirán la clave ISOTROPIC, LOCAL o MODELFREE, que denota el modelo de difusión de espín a aplicarse a la molécula

```

HEADER Dodeca + M c.t.=2
REMARK CORRELATION TIME: ISOIROPIC
ATOM 1 N ASP 1 -1.649 -1.731 4.639 1.00 4.00
ATOM 2 CA ASP 1 -0.237 -1.556 4.257 1.00 4.00
ATOM 3 C ASP 1 0.515 -2.890 4.227 1.00 4.00

```

Las últimas 2 columnas corresponden al factor de ocupación (en caso de que haya sustitución isotópica (valores de 0.0 a 1.0)) y a los tiempos de difusión atómicos en ns, respectivamente

⁵ El programa *Mardigras* se encuentra disponible desde la página <http://picasso.nmr.ucsf.edu/software>

Es recomendable correr cálculos con PDBs de tres diferentes tiempos de contacto y de los resultados de los 3 hacer un archivo conjunto de límites (se describirá en la siguiente sección)

Para el nivel de ruido existen 3 opciones:

NOISE ABSOLUTE NORMALIZED 0.0025

Considerando al ruido como absoluto y calculado de tal manera que la intensidad de una señal de la diagonal en un tiempo de mezclado de 0 sea 1.0.

NOISE ABSOLUTE UNORMALIZED 11000.0

Nuevamente el valor es absoluto, pero se encuentra en las mismas unidades de las intensidades experimentales, normalmente se considera al valor del volumen de la señal más pequeña observable en el espectro.

NOISE RELATIVE PERCENT 10.0

Es relativo pues el porcentaje se considera constante y se aplica a cada señal, siendo proporcional a la intensidad del pico. Esto es rara vez aplicable.

La instrucción **NORMALIZE** cuenta también con tres opciones.

NORMALIZE ALL

Que todas las intensidades experimentales marcadas en el archivo de entrada deben ser normalizadas, lo cual se hace a partir de intensidades calculadas.

NORMALIZE FIXED

LA normalización se hace sobre distancias fijas, como protones de metileno

NORMALIZE NON-COUPLED

La normalización se lleva a cabo con las intensidades de señales que no se encuentran involucradas en fuertes acoplamientos J. Esta opción se recomienda para espectros ROESY.

Respecto al proceso **RANDMARDI**, al declarar esta instrucción en el archivo de parámetros, se modificarán N-1 veces las intensidades de entrada, respecto al archivo original, dentro de los límites del ruido y los errores relativos. Con N=1 se trabajará únicamente con el archivo original, es decir como si no se incluyera la instrucción **RANDMARDI**.

Respecto a los archivos requeridos en caso de que el espectro con el que se trabaja sea ROESY, además de la línea aclaratoria al principio del archivo **INP PARM**, está el archivo de los desplazamientos químicos ***.ppm** cuyo formato es como sigue. El número de átomo corresponde al asignado en el archivo **PDB**

ATOM	4	HA	ASP	1	3.764
ATOM	6	HB1	ASP	1	2.443
ATOM	7	HB2	ASP	1	2.549

Así mismo se construye el archivo ***.jc**

ATOM1	ATOM2	COUPLINGCT
HA	1 HB2	1 5.470
HB1	1 HA	1 7.610
HB1	1 HB2	1 -16.300
HA1	2 HA2	2 -17.090

Para tener valores más precisos tanto de desplazamiento químico como de constantes de acoplamiento, en tanto sea posible contar con un espectro de una dimensión de alta resolución

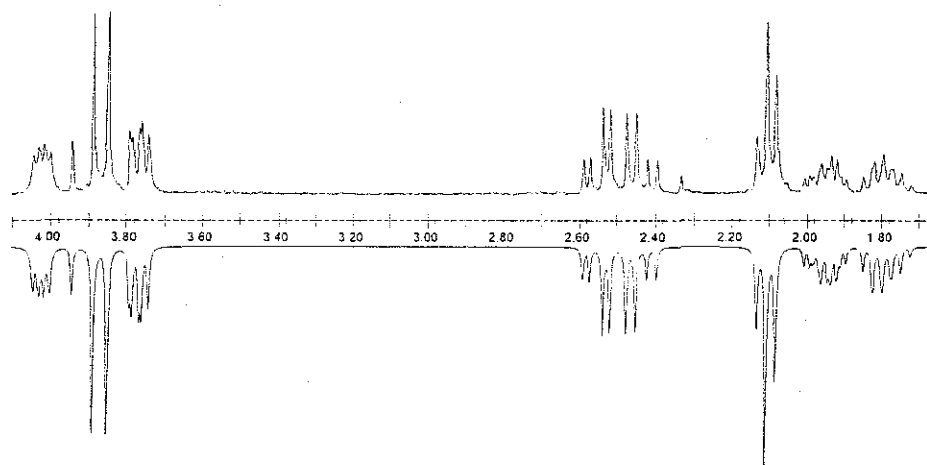


Figura A3.12. Simulación de un espectro de alta resolución,¹⁰ de la que se obtienen valores de desplazamiento químicos y constantes de acoplamiento.

Respecto a las siguientes líneas correspondientes al uso de espectros ROESY, dependen de cómo se desarrolló el experimento

CARRIER FREQUENCY se refiere a la posición en ppm en que se ubica el transmisor.

SPIN-LOCK FIELD es el valor en μs de la amplitud del pulso de 90° .

El programa corre al teclear la instrucción `mardigras` en el sistema

A3.5. Dinámica molecular restringida.

Los archivos de salida de los cálculos con `Mardigras` de formato DYANA son como sigue:

#	AIOM_i	AIOM_j	LOW_BNDS	UP_BNDS	SID	AVG_DSI	MIN_DSI	MAX_DSI	MODEL_DSI	#_of_DSI		
1	ASP	HA	1 ASP	H	2.99	3.06	0.03	3.03	2.96	3.08	2.86	30
1	ASP	HB2	1 ASP	H	2.80	2.88	0.04	2.84	2.77	2.92	3.24	30
1	ASP	HB2	1 ASP	HA	2.21	2.24	0.02	2.22	2.20	2.26	3.03	30
2	IYS	H	1 ASP	HA	2.60	2.63	0.02	2.61	2.53	2.65	2.23	30

De este archivo se deben extraer las columnas de los átomos junto con `LOW_BNDS` y

`UP_BNDS` en archivos denominados `*lol` y `*upl` respectivamente.

¹⁰ simulado con el programa `gNMR` ver 4.1, cortesía Dr. Jesús Gracia

La forma sencilla de eliminar las columnas que no se utilizarán a continuación en ambiente Windows es en MS-Word con la tecla Alt arrastrar el puntero del *ratón* por las columnas seleccionándolas para posteriormente borrarlas

Así se puede también seleccionar cada una de las columnas de interés para las restricciones de la geometría y copiarlas a una hoja de MS-Excel, en la que se pueden tener los valores de distancia mínima y máxima de los cálculos para los diferentes tiempos de correlación utilizados y entonces ordenar los valores entre los tres de tal manera que en una columna queden todos los valores menores de límite inferior y todos los valores mayores de límite superior en otra. Esas columnas se pueden volver a pegar en Word, sustituyendo a una columna ya seleccionada, de tal manera que queden junto al par de átomos a los que describen. De esta manera se le da más flexibilidad al cálculo de Dinámica.

Algunas distancias al no ser restringidas tienen como valores de límites 0.000. Esos renglones deben ser eliminados.

Debe notarse que el formato con el que se genera el archivo *DYANA no es del todo apropiado. Se deben, por tanto, hacer algunas modificaciones:

- Sustituir ASP por ASP-, GLU por GLU-, LYS por LYS+.
- La numeración de los hidrógenos de metileno a partir del β no son 1 y 2 sino 2 y 3, por lo que se sustituye B2 por B3, G2 por G3 y posteriormente B1 por B2 y G1 por G2.
- Los hidrógenos de amida peptídica se denominan HN en lugar de H.
- Todos los pseudoátomos en Dyana se caracterizan por Q, por lo que hay que cambiar R y M por Q (en Valina los metilos serán QG1 y QG2).

Después de estas modificaciones, el archivo deberá ser guardado en formato texto (ASCII). Hay que notar que al transferirlo al sistema Unix, habrá errores de lectura debido a la presencia de un carácter al final de cada línea (^M) que queda como resultado de la edición de los archivos en Windows. Esto se puede eliminar abriendo el archivo con el editor de Unix: *vi*. Dentro de este editor se teclea la instrucción:

```
:1,$s / $//
```

Que buscará del principio al final el último carácter de cada línea y lo sustituirá por “nada”. Finalmente con

```
:x
```

Se guardan los cambios y se sale del archivo

Los archivos *.lol y *.upl serán utilizados por el programa Dyana²⁶ siguiendo las instrucciones de cálculo que deben estar contenidas en el archivo ANNEAL.dya

Dyanalib	Archivo que contiene parámetros para el cálculo
#tf_type=2	Método de aproximación al mínimo
read seq archivo.seq	Archivo que contiene la secuencia del péptido
#read cco archivo.cco	Archivo con los valores de constantes de acoplamiento
read upl archivo.upl	Archivo con las restricciones superiores en las distancias
read lol archivo.lol	Archivo con las restricciones inferiores en las distancias
distance modify	Instrucción por la que las distancias que no requieren restricción son eliminadas
write upl Zn12_01ct1out.upl	Las modificaciones hechas por el paso anterior se almacenan en estos archivos que se convierten en las restricciones reales
write lol Zn12_01ct1out.lol	
nproc=1	Número de procesadores que se utilizarán en el cálculo
calc_all 50 steps=6000	Número de conformeros que generará el “templado simulado” y número de pasos de “cambio de temperatura”
overview Zn12_01ct1 info=full	Nombre y tipo del archivo de información del cálculo
write_all name=Zn12_01ct1.pdb	Prefijo y formato de los archivos de estructura calculados

El archivo **dyana.lib** contiene parámetros energéticos para los tipos de átomos y sus enlaces en aminoácidos y bases nucleicas, de acuerdo con el campo de fuerza ECEPP

²⁶ Programa solicitable a Peter Güntert: dyana@mol.biol.ethz.ch. Costo de 200USD para uso académico

El método de aproximación al mínimo de energía en las estructuras definido por el número en **tf_type** relaciona a d (distancia calculada) con b (distancia normal) de la forma que se muestra en la siguiente tabla. Para el tipo 3, β corresponde a un límite de tolerancia que se debe definir en el archivo ANNEAL.dya bajo la función **tf_beta**.

Tabla A3.1. Variables de tipo de funciones de minimización en Dyana.

Tipo	Término para límites máximos violados $(d > b)$	Casos límite	
		Pequeñas violaciones $(d \approx b)$	Grandes violaciones $(d \gg b)$
1	$\left(\frac{d^2 - b^2}{2b}\right)^2$	$(d - b)^2$	$\frac{1}{4b^2}d^4$
2	$(d - b)^2$	$(d - b)^2$	d^2
3	$\frac{\beta^2}{2} \left[\sqrt{1 + \left(\frac{d^2 - b^2}{\beta b^2}\right)^2} - 1 \right]$	$\left(\frac{d - b}{b}\right)^2$	$\frac{\beta}{2} \left(\frac{d}{b}\right)^2$
4	$2\beta^2 b^2 \left[\sqrt{1 + \left(\frac{d - b}{\beta b}\right)^2} - 1 \right]$	$(d - b)^2$	$2\beta b d$

El archivo *seq simplemente menciona a los aminoácidos (o bases nucleicas) que forman parte de la secuencia que se calcula, poniendo junto al primer aminoácido, el número correspondiente al primer residuo del archivo de restricciones (en caso de que se quieran analizar fragmentos de macromoléculas) y separándolos por un espacio o en diferente línea cada uno. Se presenta por ejemplo el archivo SitioII.seq:

```
ASP- 1 LYS+ ASN GLY ASP- GLY GLU- VAL SER PHE GLU- GLU-
```

En caso de pretender utilizar como restricción para la geometría, valores obtenidos de constantes de acoplamiento escalar, se construye el archivo *cco:

1	ASP-	HA	HB2	5	4		
1	ASP-	HA	HB3	4	1		
2	GLU-	HA	HB2	12	3	2	0 5 0
2	GLU-	HA	HB3	4	1	2	0 5 0
2	GLU-	HN	HA	5	1	1	0
3	CYSS	HN	HA	6	2	1	0

Mediante la instrucción `calc_all N steps=n` se desarrolla un cálculo de dinámica molecular en que un quinto de los n pasos declarados se desarrollarán a una temperatura inicial alta, para posteriormente ser enfriados lentamente por los pasos restantes. Se propondrán N estructuras iniciales que serán minimizadas en un espacio de ángulos de torsión.

El programa corre con la instrucción `rundyana < ANNEAL.dya`

Además de las estructuras que se almacenarán en formato PDB, se genera un archivo *.ovw que contendrá la información estadística de violaciones a las restricciones impuestas durante el cálculo de las conformaciones

A3.6. Visualización de las estructuras y parámetros de ajuste.

Las estructuras generadas se pueden observar mediante diversos programas de visualización e incluso de cálculo de estructuras químicas como Molmol,⁸⁷ Web Lab Viewer,⁸⁸ Mercury,⁸⁹ ya que el formato *.pdb es muy versátil. El programa Molmol ofrece la posibilidad de revisar varias estructuras a la vez, con lo cual se puede ajustar a todas las estructuras a que coincida mayormente la conformación de su cadena peptídica o a una posición promedio. De aquí se podrá obtener un valor de ajuste que se denominará RMSD y que se explica en la sección 6.2.1.

⁸⁷ Gratuito en <http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>

⁸⁸ Versiones de prueba disponibles en www.msi.com

⁸⁹ Gratuito en www.ccdc.cam.ac.uk/prods/mercury/index.html

La lectura de estructuras múltiples se consigue mediante dos posibles estrategias: abriendo uno a uno los archivos pdb: [File]→[Read Mol]→[PDB...]; o escribiendo en un archivo de texto con extensión .NAM la lista de nombre de archivos pdb que se desea leer simultáneamente, e invocando ese archivo .NAM mediante [File]→[Read Mol List]→[PDB...].

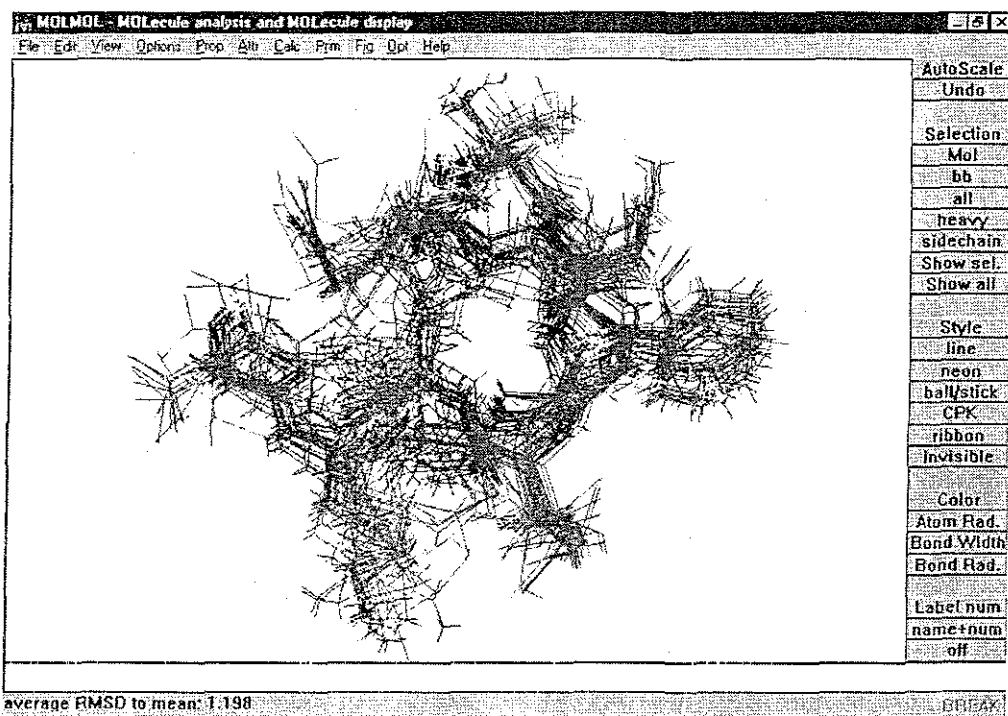


Figura A3.13. Pantalla del programa Molmol (visualización de estructuras moleculares)

El ajuste de las estructuras respecto a la cadena peptídica se logra al pulsar el botón [bb] y en [Edit]→[Fit.]→ to_first. Las moléculas se arreglarán de tal forma que minimicen su desviación respecto a la cadena peptídica de la primera de las moléculas. Si en lugar de seleccionar [bb] se seleccionan todas las moléculas completas [all], y se sigue el mismo procedimiento de ajuste, se sobrepondrán las estructuras con una mínima desviación respecto a la primera molécula. En ambos casos se despliega el valor de ajuste en la parte inferior de la ventana.

A3.7. Inclusión del catión en los complejos.

El mayor problema ha sido lograr incluir de manera confiable al catión en el entorno de coordinación que conforma el péptido. Finalmente se ha logrado, partiendo de la estructura más representativa de las múltiples arrojadas por el cálculo de dinámica molecular descrito anteriormente.

Se cambia la extensión del archivo de PDB a ENT (el formato es el mismo) para que pueda ser leído por el programa Hyperchem⁸ (Figura A3.14).

Es necesario suprimir los pseudoátomos que permanecen después de la determinación estructural, lo cual se logra mediante [Select]→[Molecules], se hace clic sobre la molécula del péptido, y con [Select]→[Complement Selection], quedan únicamente seleccionados los pseudoátomos que pueden borrarse con la tecla suprimir.

Después de asegurarse que los grupos terminales del péptido correspondan con los reales (que estén amidados, por ejemplo), se puede nuevamente seleccionar toda la molécula y establecer su carga mediante [Build]→[Set Charge]→-4, por ejemplo

Después se escoge de la tabla periódica al catión con el que se encuentra coordinada experimentalmente la molécula: [Build]→[Default element], y se coloca mediante un clic en una posición cercana al ligante. Se selecciona al ion y se le asigna la carga de la misma forma que se hizo con el ligante

Se mantiene seleccionado al ion para que en la optimización de geometría la conformación del ligante se mantenga constante. Se puede optimizar primeramente por mecánica molecular (MM+: [Setup]→[Molecular Mechanics]→MM+), en la que el ión se ubicará de acuerdo a las cargas electrostáticas. Posteriormente se puede proceder a

una optimización basada en un método semiempírico (PM3: [Setup]→Semi-empirical]→PM3)

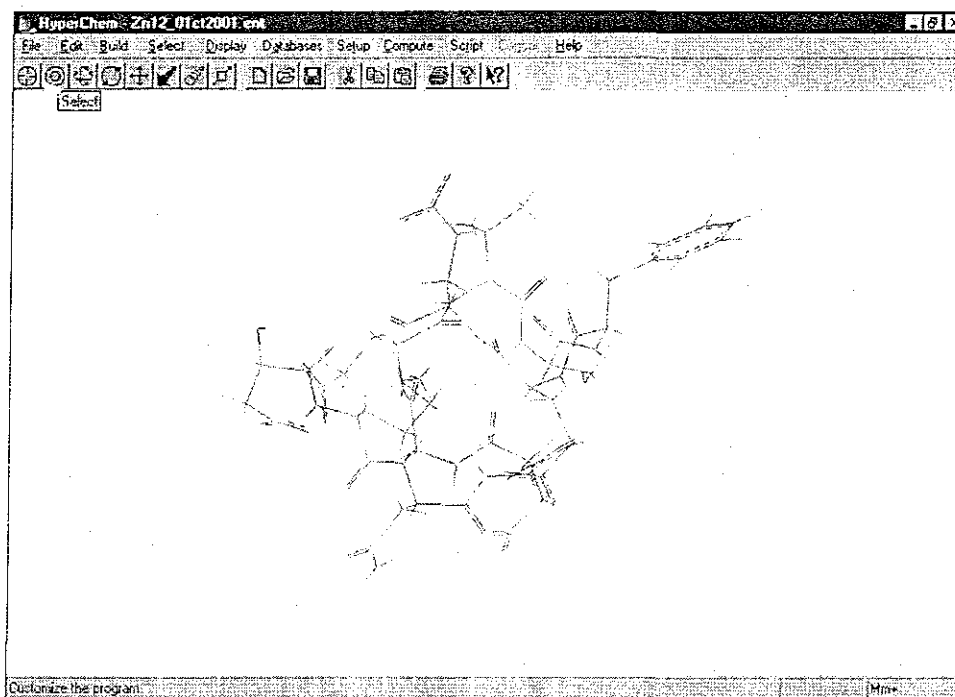


Figura A3.14. Pantalla de Hyperchem. Optimización con centro metálico.

A3.8. Referencias

1. J.N.S.Evans; Biomolecular NMR Spectroscopy; ED Oxford University Press, 1a ed, (1996) p138
2. F Delaglio, S.Grzesiek, G Vuister, G Zhu, J Pfeifer, A.Bax; *J Biomol. NMR*, 277-293 (1995)
3. VARIAN; VNMR ver. 6.1C
4. T.D.Goddard, D.G.Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco
5. B.A.Borgias, T.L.James; *J Magn Reson* . **79** (1990), 475-87
6. P.Güntert, C Mumenthaler, K Wüthrich; *J. Mol Biol* **273**, 283-298 (1997)
7. R.Koradi; Molmol 2K.1, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Zürich
8. Hypercube, Inc ; Hyperchem 5.02 for Windows; Gainesville, Fl
9. K.Wüthrich; NMR of Proteins and Nucleic Acids; ED Wiley Interscience, 1a ed (1986) p127
10. P.H.M. Budzelaar; gNMR Ver 4 1 0; Cherwell Scientific Publishing, (1999)